

THÈSE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade académique de

DOCTEUR DE L'INSTITUT INTERNATIONAL D'INGENIERIE DE L'EAU ET DE L'ENVIRONNEMENT (2iE)

École Doctorale Sciences et Technologies de l'Eau, de l'Énergie et de l'Environnement
Spécialité : Environnement

DOCTORAT EN SCIENCES

Faculté des Sciences
Université de MONS

Réf : 2iE/2024-02

Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de deux plantes pesticides au Burkina Faso : cas de *Eucalyptus* *camaldulensis* Dehnh. et *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Par

Bassalia OUATTARA

Présentée et soutenue publiquement le 12 février 2024

JURY

Mme. BONZI/COULIBALY Libona Yvonne, Professeure Titulaire, UJKZ, Burkina Faso,	(Présidente)
M. TCHOBO Fidèle Paul, Professeur Titulaire, EPAC, Bénin,	(Rapporteur)
M. KINI Félix, Directeur de Recherches, IRSS, CNRST, Burkina Faso,	(Rapporteur)
M. ASSIDJO Nogbou Emmanuel, Professeur Titulaire, INP-HB, Côte d'Ivoire,	(Examineur)
Mme. LAURENT Sophie, Professeure Ordinaire, Université de Mons, Belgique,	(Examinatrice)
M. GERBAUX Pascal, Professeur Ordinaire, Université de Mons, Belgique,	(Co-Directeur de thèse)
M. OUEDRAOGO Wennd Kouni Igor, Professeur Titulaire, Institut 2iE, Burkina Faso,	(Co-Directeur de thèse)
M. DE WINTER Julien, Chercheur, Chef de travaux, Université de Mons, Belgique,	(Invité)

Laboratoire Energies Renouvelables et Efficacité Énergétique (LabEREE), 2iE, Burkina Faso
Laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs), UMONS, Belgique

DÉDICACE

A la mémoire de mon père,

A la mémoire de ma mère,

Je vous exprime ici toute mon affection et tout mon amour. J'aurais tant aimé partager ces moments avec vous. Mais hélas ! Que vos âmes reposent en paix !

A toute la grande famille OUATTARA

A tous mes frères et sœurs, cousins et cousines

A tous mes amis

Ce travail vous est dédié !!!

REMERCIEMENTS

Mes travaux de thèse ont été effectués dans le cadre d'une codirection entre l'Institut Internationale d'Ingénierie de l'Eau et de l'Environnement (2iE) et l'Université de Mons (UMONS). Les travaux expérimentaux ont été réalisés entre le Laboratoire Energies Renouvelables et Efficacité Energétiques (LabEREE) et le laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs). Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et au succès de ce travail.

Tout d'abord je tiens à réitérer mes sincères remerciements à l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur - Commission de la Coopération au Développement (ARES-CCD) de la Fédération Wallonie Bruxelles (Belgique) pour le financement de cette thèse à travers le Projet BIORAF-MA. Je remercie tous les partenaires du projet pour leur accompagnement et leur soutien multiformes.

J'adresse ma profonde gratitude à Mme Yvonne Libona BONZI/COULIBALY, Professeure Titulaire à l'Université Joseph KI-ZERBO, et par ailleurs coordonnateur Sud du projet PRD-BIORAF-MA. Merci pour votre disponibilité, votre rigueur pour le travail bien fait ainsi que pour votre implication sans faille dans l'aboutissement des travaux de cette thèse.

Mes plus sincères remerciements et ma plus profonde gratitude vont tout particulièrement à Monsieur Igor Wennd Kouni OUEDRAOGO, Professeur Titulaire à l'Institut 2iE, mon directeur de thèse ainsi qu'à Monsieur Pascal GERBAUX, Professeur Ordinaire à l'UMONS et responsable du laboratoire S²MOs, mon co-directeur de thèse et coordonnateur Nord du projet BIORAF-MA, qui m'ont donné l'opportunité de mener ma thèse jusqu'à son terme en faisant disparaître toutes les embûches qui se sont manifestées. Je vous dis merci pour vos sages conseils, pour votre disponibilité, pour vos orientations et surtout pour votre enthousiasme au-delà même du cadre académique. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de vos conseils. Cette thèse doit beaucoup à vos soutiens et à vos encouragements. Merci.

Par anticipation, je vous voudrais adresser mes vifs remerciements au Président du jury ainsi que les éminents membres du jury qui me feront l'honneur de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Marie TIEMTORE/SAWADOGO, Maître de Conférences (CAMES) à l'Institut 2iE et par ailleurs, responsable du Laboratoire Energie Renouvelables et Efficacité Energétique (LabEREE) de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je dis merci à tous les membres, à tous les enseignants chercheurs, à tous les techniciens et à tous les doctorants du LabEREE.

A tous mes aînés et anciens collègues doctorants : Brice, Ahmed, Leatitia, Marelle, Adéline, Rock, Fanta, Hector, Kodami, etc.

A tous mes collègues doctorants et cadets : Sabba, Fernand, Tano, Roger, Yasmina, Sara, Maïga, Moya, Fabrice, Boniface, Atilago, Pinto, Aminata, Mame, Lionel, Alida, Lamine, etc.

A toute l'équipe du laboratoire LCAEBiO de l'UJKZ, notamment aux Dr Jean Claude W. OUEDRAOGO, Dr Assétou SANKARA, Dr OUEDA, Dr Benjamin OUEDRAOGO, HIEN Gildas, MANO Jonas, etc. pour leurs soutiens multiformes.

Mes différents voyages de mobilités au sein de l'UMONS m'ont permis de côtoyer des personnes formidables. Je tiens à remercier vivement tous les actuels et anciens membres de l'équipe S²MOs pour l'accueil, la sympathie et les encouragements. Mes sentiments de reconnaissance vont à l'endroit de Dr. Julien DE WINTER, Chercheur, Chef des travaux pour ses encouragements, pour sa disponibilité pour des échanges enrichissants et aussi pour sa bonne humeur tous les jours au sein du labo. Je remercie particulièrement Dr. Irène SEMAY qui avait la responsabilité de m'initier aux analyses et interprétations des spectres LC-MS. Merci pour ton accompagnement et ton aide précieuse dans la correction de la publication. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Grand merci aux Dr. Antoine NITELET, Dr. Phillipe SAVARINO, et Dr. Périne WEBER, ainsi qu'à Benjamin, Gwendal, Louis, Thomas, Emma et M. Eric, pour leur accompagnement et leur assistance à chaque fois que j'en avais besoin. Ces mobilités ont aussi été l'occasion pour moi de rencontrer d'autres doctorants venus en mobilité au sein de l'équipe S²MOs. Je pense notamment à Sarajit et à Andra, venus respectivement de l'Inde et de la Roumanie. Merci pour le partage d'expérience.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes enseignants de l'Université Nazi BONI, de l'Université de Dédougou et de l'Université Joseph KI-ZERBO. Je pense notamment aux Professeurs Roland N.T. MEDA, Nabéré OUATTARA, Lassina OUATTARA, Constantin DABIRE et Adama HILOU. Chers Professeurs, mes sincères remerciements à vous pour vos conseils et accompagnements sans faille.

Merci à tous mes anciens camarades du département Biochimie Substances Naturelles de l'Université Nazi BONI avec qui j'entretiens toujours de fructueuses relations académique et extra-académique.

RÉSUMÉ :

Dans ce travail, l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* et de *Cymbopogon citratus* a été optimisée en appliquant une approche de méthodologie de surface de réponse (MSR). L'influence de trois variables indépendantes, à savoir, le rapport liquide-solide, la température et le temps d'extraction, a été simultanément étudiée. Un plan composite centré a été appliqué et les résultats expérimentaux ont été transcrits sous forme de modèle polynomial du second ordre. L'efficacité de l'extraction a été quantifiée via les mesures des rendements d'extraction, des teneurs en composés phénoliques totaux (TPT) et flavonoïdes majeurs (TFM), ainsi que par la détermination de l'activité antioxydante (DPPH et FRAP) des extraits. L'optimisation d'extraction des composés bioactifs a permis d'obtenir des extraits dont les TPT sont respectivement d'environ 343 et 227 mg EAG/g des extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. L'analyse des extraits par la HPLC-ESI-MS et la spectrométrie de masse en tandem (MSⁿ) a permis d'identifier respectivement huit (8) et dix (10) flavonoïdes glycosylés majeurs dans les extraits. Les teneurs en principaux flavonoïdes dans les conditions optimales d'extraction étaient d'environ 25 mg/g et 51 mg/g respectivement pour *E. camaldulensis* et *C. citratus*. Les extraits ont montré des corrélations significatives de 80,2% et 56,5% entre les TPT et leurs activités antiradicalaires DPPH, respectivement pour *E. camaldulensis* et *C. citratus*. L'étude de stabilité a montré que les extraits secs ont exhibé une meilleure stabilité comparativement aux extraits conditionnés dans les solvants B (éthanol 70%) et A (eau). Les résultats ont révélé une meilleure stabilité (>90%) des composés phénoliques ainsi que les propriétés antioxydantes des extraits secs (>120 jours) ou solubilisés dans le solvant B (>60 jours), lorsqu'ils sont conservés à T = 4 °C. Enfin, un plan de formulation d'un mélange constitué de 0,66 µg/mL de *E. camaldulensis* et de 0,25 µg/mL de *C. citratus* a présenté une activité antioxydante maximale. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'une diversité de flavonoïdes dans les extraits pouvant induire des effets biocides chez les ravageurs des cultures maraichères.

Mots clés : *E. camaldulensis*, *C. citratus*, MSR, Optimisation, Composés phénoliques, Flavonoïdes, Analyse LC-MS, Activité antioxydante, Stabilité

ABSTRACT:

In this work, the phenolic compound extraction from the of *Eucalyptus camaldulensis* and *Cymbopogon citratus* leaves was optimized by applying a response surface methodology (RSM) approach. The influence of three independent variables, i.e., liquid-to-solid ratio, temperature and extraction time, was jointly studied. A centered composite design was applied and the experimental results were transcribed into a second-order polynomial model. Extraction efficiency was quantified by measuring the extraction yields, the total phenolic compound (TPT) and the major flavonoid (TFM) contents, and by determining the antioxidant activity (DPPH and FRAP) of the extracts. Optimization of the extraction of bioactive compounds resulted in extracts with TPT of approximately 343 and 227 mg EAG/g of *E. camaldulensis* and *C. citratus* extracts, respectively. Analysis of the extracts by LC-MS and tandem mass spectrometry (MS/MS) allowed identifying eight (8) and ten (10) major glycosylated flavonoids in the of *E. camaldulensis* and *C. citratus* extracts, respectively. The levels of major flavonoids under optimal extraction conditions were approximately 25 mg/g and 51 mg/g for *E. camaldulensis* and *C. citratus*, respectively. The extracts showed significant correlations of 80.2% and 56.5% between TPT and their DPPH antiradical activities, for *E. camaldulensis* and *C. citratus*, respectively. The stability study showed that dry extracts exhibited better stability compared with extracts conditioned in 70% aqueous ethanol. The results revealed better stability (>90%) of phenolic compounds and antioxidant properties for extracts dried (>120 days) or solubilized in aqueous ethanol (>60 days), when stored at T = 4°C. Finally, a formulation of a mixture consisting of 0.66 µg/mL *E. camaldulensis* and 0.25 µg/mL *C. citratus* showed maximum antioxidant activity. This study highlighted the presence of a diversity of flavonoids in the extracts capable of inducing biocidal effects in market garden pests.

Keywords: *E. camaldulensis*, *C. citratus*, RSM, Optimization, Phenolic compounds, LC-MS analysis, Flavonoids, Antioxidant activity, Stability

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ :	iv
ABSTRACT:.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xvi
SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....	xvii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	4
Introduction	4
I. Cultures maraîchères au Burkina Faso	4
I.1. Productions maraîchères.....	4
I.2. Contrôle des ravageurs en culture maraîchère	5
I.2.1. Ravageurs des cultures maraîchères.....	5
I.2.2. Méthodes de lutte contre les ravageurs des cultures	6
I.2.2.1. Méthodes de lutte préventive	6
I.2.2.2. Méthodes de lutte curative	7
I.2.2.2.1. Gestion intégrée des ravageurs.....	7
I.2.2.2.2. Lutte chimique	8
I.2.2.2.3. Plantes comme alternative à la lutte chimique	11
II. Présentation des espèces de plantes étudiées	12
II.1. <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.....	12
II.1.1. Description botanique	12
II.1.2. Taxonomie et systématique	12
II.1.3. Usages traditionnels et propriétés biologiques	13
II.3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	14
II.3.1. Description botanique	14
II.3.2. Taxonomie et systématique	15
II.3.3. Usages traditionnels et propriétés biologiques	15
III. Composés phénoliques des extraits des plantes.....	16
III.1. Principaux groupes chimiques présents dans les extraits bruts	16
III.2. Sources des composés phénoliques.....	17
III.3. Classification des composés phénoliques	18
III.3.1. Flavonoïdes	19

III.3.1.1. Anthocyanidines	20
III.3.1.2. Isoflavones.....	21
III.3.1.3. Flavanones.....	21
III.3.1.4. Flavanols	22
III.3.1.5. Flavones.....	22
III.3.1.6. Flavonols	23
III.3.2. Non-flavonoïdes	24
III.3.2.1. Acides phénoliques, alcools phénoliques et stilbènes	24
III.3.2.2. Les tanins.....	25
III.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques	26
III.4.1. Activité antioxydante.....	28
III.4.1.1. Antioxydants enzymatiques.....	28
III.4.1.2. Antioxydants non-enzymatiques	28
III.4.2. Effets pesticides.....	29
III.4.2.1. Antibactérien	30
III.4.2.2. Antifongique.....	30
III.4.2.3. Insecticide.....	31
III.4.2.4. Flavonoïdes en tant que molécules allélochimiques : relation plante-plante, plante-insecte et plante-environnement.	32
IV. Extraction des molécules bioactives de plantes aux propriétés pesticides	32
IV.1. Extraction des huiles essentielles	33
IV.2. Préparation des extraits bruts	33
IV.2.1. Techniques d'extraction conventionnelles	34
IV.2.2. Techniques d'extraction dites modernes ou plus innovantes	34
IV.2.2.1. Extraction aux ultrasons - sonication	34
IV.2.2.2. Extraction assistée par micro-ondes.....	35
IV.2.2.3. Extraction au CO ₂ supercritique.....	35
V. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques	35
V.1. Paramètres influençant l'extraction des molécules bioactives	35
V.2. Méthodes d'optimisation de l'extraction des molécules bioactives	36
V.2.1. Approche conventionnelle classique	36
V.2.2. Approche par plans d'expérience	37
VI. Description de plan d'expérience.....	37
VI.2. Types de plans d'expérience.....	38
VI.2.1. Plan factoriel complet à deux niveaux	38
VI.2.2. Plan factoriel fractionnaire à deux niveaux.....	39

VI.1.3. Plans de surface	39
VI.1.3.1. Plans de Box-Behnken	39
VI.1.3.2. Plans de Doehlert	39
VI.1.3.3. Plans composites	39
VII. Méthodes de caractérisation des composés phénoliques	40
VII.1. Analyse qualitative	40
VII.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	40
VII.1.2. Spectroscopie Infrarouge (IR).....	40
VII.2. Analyse quantitative : dosage au spectrophotomètre UV-vis	40
VIII. Identification des flavonoïdes par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS).....	41
VIII.1. Aperçu de l'analyse LC-MS et principe.....	41
VIII.2. Dissociations Induites par Collision (Collision-Induced Dissociation, CID) et spectrométrie de masse en tandem.	42
VIII.2.1. Description de la CID	42
VIII.2.2. CID appliquée aux flavonoïdes	43
VIII.2.2.1. Flavonoïdes O-glycosylés.....	44
VIII.2.2.2. Flavonoïdes C-glycosylés.....	46
IX. Analyse critique, formulation des questions de recherche, objectifs de la thèse	48
Chapitre 2 : Détermination des niveaux des facteurs clés d'extraction des molécules bioactives	50
Introduction	50
I. Matériel et méthodes	50
I.1. Présentation du matériel	50
I.1.1. Matériel végétal.....	50
I.1.2. Matériel de laboratoire	51
I.2. Description des méthodologies.....	52
I.2.1. Méthodes de caractérisation des biomasses brutes	52
I.2.1.1. Taux d'humidité.....	52
I.2.1.2. Teneur en matières volatiles.....	52
I.2.1.3. Teneur en cendres totales	53
I.2.2. Procédure d'extraction conventionnelle.....	53
I.2.2.1. Effet de la variation de la proportion en éthanol et du temps sur l'extraction	53
I.2.2.2. Effet de la variation du ratio liquide-solide sur l'extraction	53
I.2.2.3. Effet de la variation de la température sur l'extraction	54
I.2.2.4. Effet de la variation du temps d'extraction	54
I.2.3. Mesure des rendements d'extraction.....	54

I.2.4. Dosages des composés bioactifs dans les extraits par spectrophotométrie UV-visible	55
I.2.4.1. Dosage des flavonoïdes totaux.....	55
I.2.4.2. Dosage des phénoliques totaux	55
I.2.5. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante	56
I.2.5.1. Capacité antiradicalaire par DPPH.....	56
I.2.5.2. Pouvoir réducteur des ions ferriques « Ferric Reducting Antioxidant Power » (FRAP)	58
II. Résultats et discussion.....	59
II.1. Caractérisation du matériel végétal brut	59
II.1.1. Taux d'humidité.....	59
II.1.2. Matière volatile.....	59
II.1.3. Teneurs en cendres totales	60
II.2. Extraction conventionnelle classique par variation d'un seul paramètre à la fois.....	60
II.2.1. Effets du temps d'extraction et de la proportion en éthanol sur le rendement d'extraction	61
II.2.2. Effets du temps et de la proportion en éthanol sur les teneurs en phénoliques totaux (TPT)	62
II.2.3. Effets du temps et de la proportion en éthanol sur les teneurs en flavonoïdes totaux	63
II.2.4. Effets de la proportion en éthanol sur l'activité antioxydante	63
II.3. Identification des niveaux des facteurs d'extraction des composés bioactifs de <i>E. camaldulensis</i> 	64
II.3.1. Effet du ratio liquide-solide	65
II.3.2. Effet de la température d'extraction	66
II.3.3. Effet du temps d'extraction.....	68
Conclusion.....	70
Chapitre 3 : Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. et de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	71
Introduction	71
I. Matériel et méthodes	71
I.1. Matériel.....	71
I.2. Description de la méthode d'optimisation de l'extraction par méthodologie de surface de réponse (MSR)	72
II. Résultats et discussion.....	73
II.1. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. 	73
II.1.1. Influence des variables indépendantes sur les réponses étudiées	73
II.1.1.1. Réponse 1 = rendement d'extraction	73
II.1.1.2. Réponse 2 = TPT	74
II.1.1.3. Réponse 3 = TFM.	75

II.1.1.4. Réponse 4 = DPPH	77
II.1.1.5. Réponse 5 = FRAP	78
II.1.2. Détermination des conditions optimales d'extraction et vérification expérimentale.....	83
II.1.3. Corrélation entre les TPT et l'activité antioxydante (DPPH & FRAP)	87
II.2. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	88
II.2.1. Influence des variables indépendantes sur les réponses étudiées	88
II.2.1.1. Réponse 1 = rendement d'extraction	88
II.2.1.2. Réponse 2 = TPT	90
II.2.1.3. Réponse 3 = TFM	91
II.2.1.4. Réponse 4 = DPPH	92
II.2.1.5. Réponse 5 = FRAP	93
II.2.2. Détermination des conditions optimales d'extraction.....	98
II.2.3. Corrélation entre les TPT et l'activité antioxydante (DPPH & FRAP) des extraits des feuilles de <i>C. citratus</i>	102
Conclusion	103
Chapitre 4 : Caractérisation des extraits et identification des principaux flavonoïdes	104
Introduction	104
I. Matériel et méthodes	104
I.1. Matériel	104
I.2. Description des méthodes de caractérisation	104
I.2.1. Caractérisation qualitative.....	104
I.2.1.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	104
I.2.1.2. Analyse par spectroscopie infrarouge (IR).....	105
I.2.1.3. Analyse au spectrophotomètre UV-visible à balayage.....	105
I.2.1.4. Analyse thermogravimétrique (ATG)	105
I.2.2. Caractérisation quantitative.....	106
I.3. Identification des composés flavonoïdes par analyses LC-MS	106
I.3.1. Séparation des composés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	106
I.3.2. Spectromètre de masse Waters QToF API-US	107
II. Résultats et discussion	108
II.1. Caractérisation des extraits	108
II.1.1. Méthodes qualitatives	108
II.1.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	108
II.1.1.2. Spectres d'analyse infrarouge (IR)	110
II.1.1.3. Spectres UV-vis de quelques standards flavonoïdes en comparaison avec les extraits bruts des deux plantes.....	111

II.1.1.4. Analyse thermogravimétrique (ATG) : étude de la stabilité thermique des constituants par pyrolyse	114
II.2. Caractérisation quantitative.....	117
II.2.1. Teneurs en phénoliques totaux par spectrophotométrie UV-visible.....	117
II.2.2. Teneurs en flavonoïdes majeurs par analyse LC-MS	118
II.3. Identification des flavonoïdes majeurs par analyse LC-MS.....	118
II.3.1. Flavonoïdes des extraits de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	119
II.3.2. Flavonoïdes des extraits de <i>Cymbopogon citratus</i>	121
Conclusion.....	127
Chapitre 5 : Etude de la stabilité des extraits et proposition d'une formulation optimisée	128
Introduction	128
I. Matériel et méthodes	128
I.1. Matériel.....	128
I.2. Méthodes.....	129
I.2.1. Description de la méthodologie d'étude de la stabilité	129
I.2.1.1. Dosage des teneurs résiduelles et mesure des activités résiduelles au spectrophotomètre UV-Vis	130
I.2.1.2. Quantification des teneurs restantes en flavonoïdes majoritaires par analyses LC-MS	131
I.2.2. Description de la méthodologie du plan de formulation	131
II. Résultats et discussion.....	132
II.1. Etude de la stabilité des composés bioactifs des extraits.....	132
II.1.1. Variation des teneurs en phénoliques totaux	132
II.1.2. Variation des teneurs en flavonoïdes totaux déterminées par dosage au spectrophotomètre UV-vis	135
II.1.3. Variation des teneurs en flavonoïdes majoritaires (TFM) par analyse LC-MS	138
II.1.4. Variation de l'activité antioxydante des extraits.....	143
II.1.4.1. Activité antiradicalaire DPPH	143
II.1.4.1. Pouvoir réducteur FRAP	145
II.2. Proposition d'un plan de formulation à partir des extraits optimisés des deux plantes .	148
II.2.1. Réponse DPPH	148
II.2.2. Réponse FRAP.....	149
Conclusion.....	152
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	154
Références :	156
Annexe.1. Extrait optimisé de <i>E. camaldulensis</i> (EC)	a
Annexe.2. Extrait optimisé de <i>C. citratus</i> (CC)	e

Annexe.3. Productions scientifiques	k
--	----------

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Quantités de pesticides utilisés dans l'agriculture au Burkina Faso au cours des années 1990-2020 [23].....	9
Figure 2. <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	13
Figure 3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	15
Figure 4. Classification générale des composés phénoliques [60, 62, 63].....	18
Figure 5. Mécanisme de la biosynthèse des flavonoïdes à travers les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine [66]	19
Figure 6. Squelette de base et sous-familles des flavonoïdes [68, 69].....	20
Figure 7. Structures de quelques anthocyanidines (ex : cyanidine et delphinidine)	21
Figure 8. Structure d'un isoflavone (ex : la génistéine)	21
Figure 9. Structures de quelques flavanones (ex : naringine et hespéridine).....	22
Figure 10. Structures des stéréoisomères (+) catéchine, (-) épicatechine et (-) catéchine, et (+) épicatechine	22
Figure 11. Structures de quelques flavones (ex : Apigénine 6-C-glucoside et Lutéoline 7-O-glucoside)	23
Figure 12. Structures de quelques flavonols (ex : Rutine et Kaempférol 7-O-rhamnoside)	24
Figure 13. Structures de quelques alcools phénoliques (ex : tyrosol et hydrotyrosol).....	24
Figure 14. Exemple de structure d'un stilbène (ex : le resvératrol)	25
Figure 15. Exemples de tanins	26
Figure 16. Quelques propriétés biologiques des composés phénoliques	27
Figure 17. Hypothèse de la pression oxydative comme concept évolutif de la distribution et de l'abondance des flavonoïdes.	27
Figure 18. Système de boîte noire d'un plan d'expérience	38
Figure 19. Mécanisme simplifié de l'ionisation Electrospray (ESI) en mode positif.	42
Figure 20. Nomenclature des ions fragments de flavonoïde glycosylé.....	44
Figure 21. Schéma illustratif de la rupture de la liaison O-glycosidique appliquée à la Robinine déprotonée (Kaempférol-3-O-robinoside-7-O-rhamnoside).	45
Figure 22. Schéma illustratif de la formation des ions Y_0^+ et Y_1^+ à partir de l'apigénine 7-O-néohespéridoside en mode positif (CE=5 ev).	46
Figure 23. Ions fragments caractéristiques issus du clivage croisés des cycles saccharides en cas de C-glycosylation en analyse CID [134]	47
Figure 24. Schéma illustratif de la perte d'une molécule observée pour un flavonoïde 6-C-glycosyl en établissant des liaisons hydrogènes entre le groupement hydroxyle en position 2'' du sucre avec celui de la position 5 ou 7 de l'aglycone.	47
Figure 25. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	55
Figure 26. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	56
Figure 27. Structure du radical DPPH•	57
Figure 28. Courbe d'étalonnage du trolox	59
Figure 29. Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir des feuilles de <i>E. camaldulensis</i> en fonction du solvant et de la durée d'extraction.....	61

Figure 30. Teneurs en phénoliques totaux (TPT) en fonction de la composition du solvant et de la durée d'extraction.....	62
Figure 31. Teneurs en flavonoïdes totaux (TFT) en fonction du solvant et de la durée d'extraction.....	63
Figure 32. Activité antioxydante (DPPH & FRAP) des extraits.....	64
Figure 33. Effets de la variation du facteur ratio liquide-solide sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c)	66
Figure 34. Effets de la variation de la température sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c).....	68
Figure 35. Effets de la variation du facteur temps sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c).....	69
Figure 36. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse rendement (%) ; $\alpha=0,05$) ..	74
Figure 37. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TPT (mg EAG/g) ; $\alpha=0,05$)	75
Figure 38. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TFM (mg EQ/g) ; $\alpha=0,05$)	77
Figure 39. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse DPPH ($\mu\text{g/mL}$) ; $\alpha=0,05$) .	78
Figure 40. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse FRAP (mg $\mu\text{g/mL}$) ; $\alpha=0,05$)	79
Figure 41. Surfaces de réponse 3D avec le facteur temps (C) fixé au centre (a- Rendement ; b- TPT ; c- Composés Flavo. Majoritaires (TFM) ; d- DPPH ; e et f- FRAP).....	82
Figure 42. Régression linéaire entre les TPT et l'activité antioxydante (a-DPPH ; b-FRAP).	88
Figure 43. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse rendement d'extraction (%) ; $\alpha=0,05$)	89
Figure 44. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TPT (mg EAG/g) ; $\alpha=0,05$)	90
Figure 45. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse Composés Flavonoïdes majeurs (mg/g) ; $\alpha=0,05$).....	92
Figure 46. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse DPPH ($\mu\text{g/mL}$) ; $\alpha=0,05$) .	93
Figure 47. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse FRAP (mg ET/g) ; $\alpha=0,05$)	94
Figure 48. Surfaces de réponse 3D avec le facteur temps (C) fixé au centre (a- Rendement ; b- TPT ; c- Composés Flavonoïdes (TFM) ; d- DPPH ; e et f- FRAP)	97
Figure 49. Régression linéaire entre les TPT et l'activité antioxydante (a-DPPH ; b-FRAP)	102
Figure 50. Analyseur thermogravimétrique SETSYS-1750 CSEVOL	106
Figure 51. Représentation schématique de la HPLC couplée au spectromètre de masse Waters QToF API-US [195].....	108
Figure 52. Photo de la plaque CCM.	109
Figure 53. Spectre IR des extraits optimisés (EC- <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; CC- <i>Cymbopogon citratus</i>)	111
Figure 54. Structures des composés standards analysés	112
Figure 55. Spectres UV-visibles de quelques standards phénoliques	113

Figure 56. Spectres UV-visibles des extraits optimisés de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (EO) et de <i>Cymbopogon citratus</i> (CO)).....	114
Figure 57. Thermogrammes des extraits optimisés des deux plantes en conditions de pyrolyse (a- <i>E. camaldulensis</i> ; b- <i>C. citratus</i>)	116
Figure 58. Flux analytique général utilisé pour l'analyse des extraits de plantes [195]).....	119
Figure 59. Variation des TPT au cours du stockage (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	134
Figure 60. Variation des TPT au cours du stockage (<i>Cymbopogon citratus</i>)	134
Figure 61. Variation des TFT au cours du temps (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>).....	137
Figure 62. Variation des TFT au cours du temps (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	137
Figure 63. Proportions restantes en flavonoïdes majoritaires obtenues après 5 mois de stockage (a- <i>E. camaldulensis</i> ; b- <i>C. citratus</i>).	141
Figure 64. Variation de l'activité antiradicalaire DPPH au cours du stockage (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>).....	144
Figure 65. Variation de l'activité antiradicalaire DPPH au cours du stockage (<i>Cymbopogon citratus</i>)	144
Figure 66. Variation du pouvoir réducteur FRAP au cours du stockage (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>).....	147
Figure 67. Variation du pouvoir réducteur FRAP au cours du stockage (<i>Cymbopogon citratus</i>)	147
Figure 68. Graphique 3D de l'activité antiradicalaire DPPH en fonction des deux variables A et B	149
Figure 69. Graphique 3D du pouvoir réducteur FRAP en fonction des deux variables A et B.	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: caractérisation des poudres végétales.....	60
Tableau 2 : domaine d'étude avec les niveaux des paramètres codés et non codés.....	73
Tableau 3 : base de données avec les variables indépendantes et les variables réponses	80
Tableau 4 : coefficients des régressions polynomiales du second ordre avec analyse ANOVA du modèle	81
Tableau 5 : analyse ANOVA des modèles de régression.....	83
Tableau 6 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponse	84
Tableau 7 : vérification et confirmation des conditions optimales d'extraction	85
Tableau 8 : comparaison des résultats d'optimisation de l'extraction des composés bioactifs de <i>E. camaldulensis</i>	86
Tableau 9 : base de données avec les variables indépendantes et les variables réponses	95
Tableau 10 : coefficients des régressions polynomiales du second ordre avec analyse ANOVA du modèle	96
Tableau 11 : analyse ANOVA des modèles de régression.....	98
Tableau 12 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponses.....	99
Tableau 13 : vérification et confirmation des conditions optimales d'extraction	100
Tableau 14 : comparaison des résultats d'optimisation de l'extraction des composés bioactifs de <i>C. citratus</i>	101
Tableau 15 : rapports frontaux des standards de flavonoïdes analysés.....	109
Tableau 16 : paramètres thermiques obtenus par pyrolyse sous atmosphère inerte (N ₂) des extraits optimisés de <i>E. camaldulensis</i> et de <i>C. citratus</i>	117
Tableau 17 : Informations structurales des flavonoïdes identifiés dans l'extrait optimisé de <i>E. camaldulensis</i>	120
Tableau 18 : informations structurales des flavonoïdes identifiés dans l'extrait optimisé de <i>C. citratus</i>	126
Tableau 19 : domaine d'étude avec les niveaux des variables indépendantes	131
Tableau 20 : concentrations restantes des 8 flavonoïdes majoritaires identifiés dans l'extrait optimisé de <i>E. camaldulensis</i>	139
Tableau 21 : concentrations restantes (après 150 jours) des 10 flavonoïdes majoritaires identifiés dans l'extrait optimisé de <i>C. citratus</i>	140
Tableau 22 : base de données présentant les variables indépendantes et les variables dépendantes	150
Tableau 23 : coefficients des régressions polynomiales des modèles et leurs significativités	151
Tableau 24 : analyse ANOVA des modèles de régression.....	151
Tableau 25 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponses.....	152
Tableau 26 : vérification et confirmation des conditions optimales des activités antioxydantes évaluées	152

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ANOVA : analyse de la variance

ASS : Afrique subsaharienne

ATG : analyse thermogravimétrique

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : hydroxytoluène butylé

CC : *Cymbopogon citratus*

CCM : chromatographie sur couche mince

CID : collision-induced dissociation

CO : Cymbopogon optimisé

CSP : Conseil sahélien des pesticides

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EC : *Eucalyptus camaldulensis*

EO : Eucalyptus optimisé

ERO : espèce réactive de l'oxygène

ESI : Electrospray ionisation

EtOH : ethanol

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FCR : Folin-ciocalteu reagent

FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*

HPLC-MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse

LabEREE : Laboratoire Energies Renouvelables et Efficacité Energétique

LC-HRMS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

LMR : Limite Maximale des résidus

MAAH : Ministère en charge de l'agriculture et des aménagements hydro-agricoles

MeOH : methanol

mg EAG/g : milligramme équivalent acide gallique par gramme

mg EQ/g : milligramme équivalent quercétine par gramme.

MSR : Méthodologie de surface de réponse

PED : Pays en voie de développement

PEG : polyéthylène glycol

QToF : quadrupole time of flight

S²MOs Lab : Laboratoire de Synthèse et de Spectrométrie de Masse Organiques

SDR : Stratégie de développement rural

SOD : superoxyde dismutase

TFM : Teneur en composés flavonoïdes majoritaires

TFT : Teneur en flavonoïdes totaux

TIC : total ionic current

TPT : Teneur en polyphénols totaux

TPTZ : 2,4,6-tripyrindyl-s-triazine

UCR : Union Nationale des Coopératives

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Le secteur agricole du Burkina Faso emploie plus de 80% de la population active et constitue sa principale source de revenus. Malgré les efforts déployés par les autorités burkinabè en vue d'élaborer et de mettre en œuvre de nombreuses politiques agricoles, la production agricole n'arrive généralement pas à satisfaire les besoins alimentaires des populations, notamment ceux des communautés paysannes vivant dans les zones rurales qui sont les plus vulnérables aux déficits alimentaires [1]. Comme dans la plupart des pays en voie de développement, l'agriculture burkinabè est une agriculture de subsistance, extensive et fortement dépendante de la pluviométrie. Depuis les années 1990, la filière fruits et légumes est apparue comme un secteur important qui vient en complément à l'agriculture pluviale et contribue efficacement à la lutte contre la pauvreté et l'insécurité alimentaire dans les ménages. Il a été estimé à près de 400 000 emplois créés dont 100 000 au profit des femmes. La filière engendre des revenus substantiels pour les exploitants et contribue à près de 5% par an, à la balance commerciale du pays. Les cultures maraîchères sont dominées par la production d'oignon, de la tomate, du haricot vert, du chou, du gombo, de la pomme de terre, et contribuent à près de 17% à la production agricole totale [2].

L'action des microorganismes et des ravageurs, en plus des contraintes environnementales liées aux changements climatiques, a été identifiée comme une menace majeure au développement du secteur maraîcher. L'impact des bioagresseurs sur les rendements de production a donc nécessité l'application intensive d'une diversité de pesticides chimiques de synthèse dans le but de protéger les cultures. A cela, s'ajoute l'importation et l'usage d'importantes quantités de produits chimiques non homologués et parfois nocifs pour l'environnement et la santé humaine. Ces mauvaises pratiques causent des risques accrus d'intoxications et développent des résistances chez les ravageurs [3–5]. Dans la Vallée du Sourou (région du Mouhoun), une des régions à forte production maraîchère, une étude a rapporté que plus de 64% des pesticides utilisés par les producteurs ne figurent pas parmi les produits à usage maraîcher, et que plus de 31% ne sont pas homologués par le Conseil Sahélien des Pesticides (CSP) [6]. En outre, des analyses sur 120 échantillons de légumes collectés sur des marchés de Ouagadougou ont montré la présence de 20 pesticides et 4 métaux lourds dont environ 58% à des concentrations en résidus de pesticides sont supérieures à la Limite Maximale de Résidus (LMR) [7].

Il existe plusieurs méthodes alternatives de contrôle des ravageurs et de protection intégrée des cultures basées sur des principes agroécologiques notamment l'adoption des techniques de rotation et d'association des cultures, la sélection variétale ou le développement du maraîchage

biologique par l'utilisation des biopesticides [4, 8, 9]. L'option de l'utilisation des biopesticides est prometteuse, d'autant plus que le marché des pesticides naturels est toujours à l'état embryonnaire dans la plupart des pays d'Afrique Subsaharien (ASS) et particulièrement au Burkina Faso.

Les extraits de plantes à propriétés pesticides obtenus à partir des savoirs endogènes, ont souvent été efficacement utilisés contre les bioagresseurs. En effet, les végétaux renferment de nombreux métabolites spécialisés encore appelés métabolites secondaires qui assurent des fonctions spécifiques chez la plante [10, 11]. Ils se répartissent en trois grandes familles principales à savoir les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques. La famille des composés phénoliques constitue un très large groupe de molécules organiques dont la particularité structurale la plus commune est la présence d'au moins d'un noyau aromatique lié à un groupement hydroxyle (libre ou engagé) à savoir un phénol [12, 13]. Ils sont présents en abondance dans tous les organes des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits) et sont synthétisés d'avantages par des plantes soumises à des facteurs biotiques et abiotiques difficiles. Ce sont principalement des tanins, des acides phénoliques, des flavonoïdes, les anthocyanes, les coumarines, les anthraquinones, etc. [11]. Cette famille de composés fait l'objet d'une attention particulière du fait qu'ils seraient responsables de diverses propriétés biologiques telles que des activités antioxydante, antifongique, antibactérienne, insecticide, insectifuge, antivirale, etc. Par conséquent, elle est considérée comme une source prioritaire pour le développement d'un biopesticide efficace et accessible par tous à moindre coût [14, 15]. Parmi les plantes biopesticides recensées au Burkina Faso, *Eucalyptus camaldulensis* et *Cymbopogon citratus* ont été citées comme des sources potentielles de composés phénoliques à haute activité antioxydante. Des travaux ont permis l'analyse des constituants chimiques des extraits bruts obtenus par des méthodes conventionnelles. L'acétone et le méthanol, souvent utilisés pour l'extraction de composés phénoliques, sont synthétisés à partir de ressources fossiles. Ces solvants organiques sont potentiellement nocifs pour la santé humaine et l'environnement. De plus, les procédés d'extraction sont considérés comme difficilement transposables au niveau industriel car ces solvants sont chers à importer pour les pays dépourvus de raffineries de pétrole. Par contre, l'eau et l'éthanol sont considérés comme des solvants verts car ils présentent l'avantage d'être respectueux de l'environnement et de sources naturelles. L'optimisation des conditions d'extraction avec la variation de plusieurs facteurs à la fois pourrait avoir un impact positif sur l'extraction des composés phénoliques et sur le pouvoir antioxydant de extraits. En effet, contrairement à l'approche d'extraction conventionnelle, la

méthode de surface de réponse (MSR) présente l'avantage d'étudier les effets conjoints de plusieurs variables à optimiser tout en réduisant significativement le coût de l'expérimentation. L'objectif principal de la présente étude a été de contribuer au développement du maraîchage agroécologique au Burkina Faso en mettant à la disposition des producteurs des pesticides naturels efficaces à base d'extraits de plantes locales.

De façon spécifique, le travail consistera à :

- ✓ optimiser l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *E. camaldulensis* et *C. citratus*, deux plantes à propriétés pesticides ;
- ✓ caractériser les flavonoïdes majoritaires présents dans les différents extraits ;
- ✓ évaluer la stabilité des extraits et proposer une formulation optimisée à partir du mélange des extraits optimisés de ces deux plantes.

Le présent manuscrit comporte 5 chapitres répartis comme suit :

- ❖ le premier chapitre est une revue de la littérature relative à l'objet de la recherche. Elle présente dans un premier temps les cultures maraîchères et l'impact de l'utilisation des pesticides dans la production maraîchère au Burkina Faso. Ensuite, les techniques alternatives de contrôle des ravageurs, plus spécifiquement les plantes biopesticides ainsi que les composés phénoliques, supposés responsables des propriétés pesticides ont été décrits. Enfin, une analyse critique a permis de faire le choix des plantes et des méthodologies utilisées dans cette étude ;
- ❖ le second chapitre consiste à la collecte et la caractérisation de la matière végétale, et la détermination des niveaux des facteurs clés d'extraction des composés phénoliques ;
- ❖ le troisième chapitre présente les résultats de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et de l'étude des propriétés antioxydantes des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. L'influence de trois paramètres clés a été évaluée sur plusieurs réponses telles que le rendement d'extraction, la teneur en phénoliques totaux, la teneur en flavonoïdes majeurs et l'activité antioxydante (DPPH & FRAP). Au terme de ce chapitre, les conditions permettant une extraction optimale des composés phénoliques seront clairement définies pour chacune des deux plantes étudiées ;
- ❖ le quatrième chapitre présente la caractérisation des composés phénoliques contenus dans les extraits et à l'identification des flavonoïdes majoritaires qui y sont présents ;
- ❖ le cinquième chapitre est relatif à l'étude du vieillissement des extraits et à la proposition d'une formulation optimisée obtenue sur la base du mélange des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*.

Chapitre 1 : Revue de la littérature



Chapitre 1 : Revue de la littérature

Introduction

Les productions agricoles sont menacées par des agents nuisibles et cela occasionne des pertes considérables préjudiciables à l'autosuffisance alimentaire et nutritionnelle. Comme toutes les autres cultures, la maraîcher-culture au Burkina Faso repose le plus souvent sur une utilisation intensive, voire abusive, d'intrants chimiques et des déchets toxiques (engrais minéraux, produits phytosanitaires, déchets organiques et industriels, eaux usées, etc.), présentant des conséquences assez néfastes pour l'environnement ainsi que pour la santé humaine. Si les réglementations en matière de techniques de production, de suivi de la qualité sanitaire des productions agricoles et celle des produits phytosanitaires chimiques de synthèses existent, elles ne s'accompagnent pas d'un contrôle rigoureux sur le terrain des pratiques, des intrants et des produits alimentaires.

Face aux méfaits de plus en plus préoccupants de ces pratiques, certains producteurs pratiquent la production « agroécologique » en développant des formulations biopesticides traditionnelles à base d'extraits de plantes locales. Pour une formulation biopesticide de qualité et à grande échelle, plusieurs paramètres essentiels doivent être pris en compte afin d'aboutir à un produit efficace et accessible à un coût abordable. De ce fait, en plus du critère d'efficacité, la sélection du matériel végétal, le choix du solvant d'extraction ainsi que le procédé d'extraction doivent respecter l'intégrité des molécules extraites et garantir l'innocuité des formulations.

Dans la première partie de cette étude, il sera question dans un premier temps la problématique liée à l'usage des intrants phytosanitaires chimiques de synthèse dans la production maraîchère au Burkina Faso. Dans un second temps, les espèces de plantes retenues dans le cadre de la présente étude seront décrites. Enfin, ce chapitre se terminera par une brève description des méthodes d'extraction et d'optimisation des molécules bioactives présentes dans les plantes, notamment les composés phénoliques qui sont potentiellement responsables des activités biologiques recherchées.

I. Cultures maraîchères au Burkina Faso

I.1. Productions maraîchères

La culture maraîchère se distingue des autres formes de cultures en ce sens qu'elle s'intéresse en général à la production de légumes destinés à la vente en détail. Cependant, il n'existe pas de définition claire à cette forme de production. Néanmoins, selon Autissier, (1994) il s'agit de

« la production d'un ensemble de spéculations annuelles ou pérennes, arbustives ou herbacées dans un espace agraire délimité, généralement exploité de façon intensive, dont la récolte est totalement ou en partie vendue » [17].

L'introduction de la culture maraîchère au Burkina Faso est contemporaine et a été, d'une part, motivée par l'administration coloniale et, d'autre part, par les missions catholiques vers les années 1920-30 [18]. A cette période, la production était exclusivement destinée à la consommation familiale. L'apparition de la crise alimentaire essentiellement liée à la sécheresse survenue dans les années 1970 a favorisée l'introduction de la « culture de contre-saison » autour des grandes retenues d'eau dans les provinces comme le Sourou, le Yatenga, le Bam, etc. Au début des années 90, le secteur a été redynamisé par l'Union Nationale des Coopératives (UNC) à travers l'exportation du haricot vert [18].

Au regard de l'importance grandissante du secteur fruits et légumes parmi les filières porteuses de revenus, le maraîchage a été inscrit à partir des années 2003 dans la Stratégie de Développement Rural (SDR) à l'horizon 2015 par le ministère en charge de l'agriculture [2].

De nos jours, du fait de l'extension des centres urbains et de la recherche permanente par le consommateur d'un régime alimentaire assez diversifié (typiquement plus riche en nutriments), la demande d'approvisionnement en produits maraîchers ne cesse de croître entraînant une augmentation considérable des superficies des périmètres irrigués. La production maraîchère est perçue comme un pilier essentiel à la relance économique du pays à travers la création de nombreux emplois, en contribuant à la lutte contre le chômage saisonnier et l'extrême pauvreté. Elle constitue sans doute une base arrière pour l'agriculture pluviale et contribue indéniablement à la lutte contre le déficit alimentaire dans le pays. La proportion des femmes actives dans ce secteur en 2020 a atteint 51,3% comparativement aux estimations faites en 2007 par le ministère en charge de l'agriculture qui n'étaient que de 35% [19]. Une large gamme de spéculations maraîchères est produite au Burkina Faso parmi laquelle on peut citer la tomate, l'oignon, le haricot vert, le chou pommé, le concombre, le piment, la carotte, la pomme de terre, la fraise, l'aubergine européenne, la courgette, le poivron, l'ail, le gombo, le melon, la courge, la pastèque, le chou-fleur, le radis, la laitue, le poireau, etc.

I.2. Contrôle des ravageurs en culture maraîchère

I.2.1. Ravageurs des cultures maraîchères

Malgré l'engouement suscité par ce secteur, la production maraîchère est aujourd'hui confrontée à de nombreuses difficultés qui limitent son potentiel. Parmi ces contraintes, l'action

des bioagresseurs a été identifiée comme l'une des principales menaces pouvant compromettre son développement. En effet, une diversité d'insectes ravageurs a fait l'objet d'identification en production maraîchère au Burkina Faso et dans plusieurs autres pays de la sous-région Ouest-africaine dont le Mali, le Sénégal, le Benin, le Niger, la Mauritanie, etc. *Liriomyza trifolii*, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, *Tetranychus urticae*, *Aphis gossypii*, *Zonocerus variegatus*, *Bemisia tabaci*, *Thrips tabaci*, ont été identifiés comme les principaux insectes les plus nuisibles sur les cultures maraîchères avec différents degrés d'infection qui est fonction des spéculations. La culture de la tomate par exemple qui occupe le deuxième rang des différentes spéculations produites au Burkina Faso derrière l'oignon bulbe, a connu une baisse significative des rendements de production passant de 11,3 tonnes/ha en 2010 à 9,7 tonnes/ha en 2014 [20]. Cette baisse significative a été attribuée à l'action de nombreux ravageurs parmi lesquels *Tuta absoluta* (Meyrick), *Bemisia tabaci* (Genn.), *Fusarium oxysporum* (Scheldt), *Helicoverpa armigera* (Hub) et *Ralstonia solanacearum* (Smith) [4]. Plusieurs autres ravageurs ont été également identifiés dans les champs notamment les Noctuidae, les Arctiidae, les Aphididae, les Acrididae, les Gelechiidae, les Agromyzidae, les Aleyrodidae et les Tephritidae [4, 20].

I.2.2. Méthodes de lutte contre les ravageurs des cultures

Les techniques de lutte couramment utilisées par les producteurs en matière de lutte contre les ravageurs des cultures au Burkina Faso, peuvent être regroupées en deux grandes catégories à savoir les méthodes préventives et les méthodes curatives [21].

I.2.2.1. Méthodes de lutte préventive

Les méthodes de lutte préventive consistent au respect et à l'application d'un certain nombre de principes susceptibles de réunir chez la plante des conditions favorables à son développement optimale. Ce sont entre autres la période de semis qui doit être adaptée à chaque culture, la qualité du sol (riche en éléments nutritifs), le choix des variétés résistantes, l'élimination des pieds ou parties de plante déjà infectés par les nuisibles, la rotation culturale, l'association culturale, etc. Une étude réalisée dans la région de Bobo Dioulasso par Ouédraogo et al. (2019) [3] ont rapporté que plus de 90% des producteurs maraîchers pratiquent la technique de rotation culturale et que près de 72, 75 et 90% des producteurs semi-urbains, ruraux et urbains, respectivement, appliquent aussi la technique d'association culturale. Ces pratiques ont permis une meilleure protection des cultures et une amélioration de la production.

I.2.2.2. Méthodes de lutte curative

On fait appel à la lutte curative suite à la prolifération intense des nuisibles sur des cultures. Elle consiste donc à éliminer totalement ou à limiter considérablement les nuisibles et leurs impacts combinés sur les cultures. Au Burkina Faso, elle consiste essentiellement à l'application des méthodes de gestion intégrée des ravageurs, à l'usage des pesticides chimiques de synthèse, ou dans une moindre mesure à l'utilisation des préparations à base d'extraits de plantes à effets pesticides.

I.2.2.2.1. Gestion intégrée des ravageurs

Le système de gestion intégrée est une approche écosystémique de la protection des cultures et de la production basée essentiellement sur la combinaison de différentes méthodes de lutte respectueuses de l'environnement dont l'objectif est de limiter l'action des bioagresseurs et réduire l'usage des pesticides chimiques de synthèse [21]. L'objectif n'est pas d'éliminer tous les nuisibles d'une culture, mais de réduire considérablement la densité de sorte qu'ils ne puissent plus provoquer des dégâts économiques désastreux. Ce sont essentiellement la lutte physique, la lutte chimique raisonnée, la lutte biologique, etc.

- **La lutte chimique raisonnée** : elle consiste en l'usage des substances phytosanitaires les plus spécifiques possibles aux ravageurs ciblés et n'ayant pas ou peu d'effets sur les insectes utiles.
- **La lutte physique** : cette méthode de lutte fait référence à l'utilisation des dispositifs adéquats empêchant le passage des ravageurs, tels que les serres, les filets anti-insecte, les plastiques de serre anti-UV, la récolte manuelle, etc.
- **La lutte biologique** : elle consiste à utiliser des ennemis naturels des nuisibles pour combattre les ravageurs des cultures de façon respectueuse de l'environnement. Elle vise à utiliser soit des toxines dérivées des microorganismes comme substances biocides, soit à exploiter des biocides autonomes tels que des entomophages microbiens (champignons, bactéries, protozoaires, virus) ou des prédateurs et des parasitoïdes [22]. Il y'a de cela quelques années, cette méthode de lutte était considérée très couteuse. De nos jours, avec l'accroissement du nombre d'entreprises dans ce domaine de développement des biopesticides, on note une légère diminution des coûts sur le marché. Cependant, l'un des inconvénients majeurs demeure le temps d'action qui semble relativement plus long comparé à celui des pesticides chimiques de synthèse [22].

I.2.2.2.2. Lutte chimique

❖ Usages des pesticides chimiques de synthèse

La lutte chimique repose sur l'utilisation des produits chimiques de synthèse contre les ravageurs de cultures. Le Burkina Faso dépense en moyenne près de 55 milliards de Francs CFA pour l'importation des intrants agricoles chaque année, dont 37% pour les produits phytosanitaires de synthèse. De 2018 à 2021, le Burkina Faso a importé officiellement 16,7 millions de kg de pesticides (Ministère de l'Agriculture des Ressources Animales et Halieutiques, 2022). Ce chiffre représente 1/3 de la quantité totale de pesticides utilisés dans le pays. En effet, malgré l'existence de textes juridiques qui encadrent leur utilisation, l'importation frauduleuse de ces produits reste incontrôlable dans le pays au détriment de la santé publique et de l'environnement. Plusieurs catégories de pesticides sont importées au Burkina Faso parmi lesquels les herbicides qui sont de loin les plus abondants, suivies des insecticides et les fongicides + bactéricides. L'utilisation intensive des herbicides est actuellement le moyen le plus sûr pour lutter contre le développement des adventices et des mauvaises herbes. Ils sont appliqués sur toutes les cultures, y compris les cultures maraîchères, et à différents stades de développement des cultures, c'est-à-dire avant les semis, pendant la croissance des plantes et même souvent pendant le stockage et la conservation. Quant aux insecticides, ils sont non seulement utilisés en agriculture, mais aussi en production animale. Le graphique de la Figure 1 indique une augmentation brutale de la quantité des pesticides importée au Burkina Faso à partir des années 2008. Cette augmentation pourrait s'expliquer par la culture du coton et à l'avènement des nouvelles souches des ravageurs (mouche blanche, insectes piqueurs, criquet pèlerin, etc.). Selon la FAO, les pesticides importés en 2020 sont essentiellement constitués d'herbicides (77,9%), d'insecticides (22,1%) et de fongicides/bactéricides dont la proportion est considérée très faible comparativement aux deux précédente.

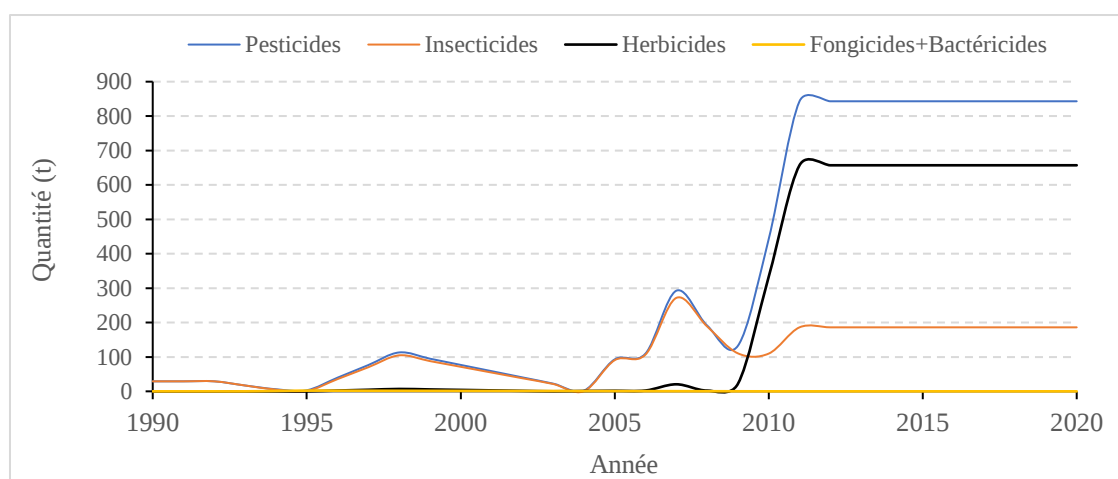


Figure 1. Quantités de pesticides utilisés dans l'agriculture au Burkina Faso au cours des années 1990-2020 [23]

(<https://www.fao.org/home/en/>)

L'utilisation intensive des pesticides chimiques a certainement contribué à l'amélioration des rendements agricoles, mais cette pratique serait aussi associée aux problématiques sanitaires et environnementales. En effet, la lutte chimique classique induit de nombreux problèmes, notamment les risques de pollution, l'accumulation des résidus toxiques de pesticides dans les légumes consommés, les pertes des organismes auxiliaires (prédateurs, fongicides, parasitoïdes, pollinisateurs, etc.), le risque de développement des mécanismes de résistance aux insecticides et acaricides chimiques de synthèse, etc. [4, 5, 7, 20].

❖ Conséquences des pesticides chimiques en culture maraîchère

Des récents travaux [24] ont indiqué qu'environ 95% des producteurs maraîchers de la province du Houet pratiquent une production conventionnelle et utilisent souvent de manière incontrôlée des pesticides chimiques de synthèse, ainsi que des engrais minéraux et organiques. Ainsi, dans plusieurs régions du Burkina Faso, de nombreux cas d'intoxication ont été rapportés suite à l'ingestion d'aliments contaminés par des pesticides. En septembre 2017, 5 personnes d'une même famille sont décédées après avoir présenté les mêmes symptômes de trouble de digestion suivis de troubles neurologiques [25]. En 2019, 21 autres personnes auraient été victimes d'intoxication alimentaire, dont 11 décès enregistrés dans la commune de Didyr, province de Sanguié (<https://lefaso.net/spip.php?article91769>, consulté le 20-08-23).

Au regard de l'augmentation des cas de maladies ou des décès en lien avérés ou suspectés avec les pesticides chimiques de synthèse, plusieurs chercheurs ont investigué sur l'accumulation possible des résidus de pesticides dans les légumes, les sols, les eaux de surface et les eaux

souterraines. Ainsi, les travaux de Son et al. (2017) [4] ont rapporté que la λ -cyhalothrine de la famille des pyréthrinoïdes est l'une des substances actives la plus utilisée par les maraîchers sur les cultures de la tomate. Ces résultats ont permis de relever qu'une bonne partie des pesticides initialement destinés à la protection du coton est détournée pour les cultures maraîchères.

Naré et al. (2015) [26] ont montré que l'utilisation intensive des pesticides chimiques par les maraîchers était une source potentielle de dégradation de la qualité des sols et de la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines. Ils ont rapporté une corrélation négative entre la forte utilisation des substances telles que l'endosulfan, la deltaméthrine et le profénofos et la baisse significative de la déshydrogénase présente dans les sols. En outre, en procédant par analyse des cheveux comme indicateur pour évaluer l'exposition humaine aux pesticides, Lehmann et al. (2018) [27] ont mis en évidence chez des producteurs maraîchers au Burkina Faso la présence de 17 résidus de pesticides dont les plus abondants étaient de l'acétamipride, de la déséthylatrazine, du carbofuran et de la deltaméthrine.

D'autres études ont également évalué les teneurs en résidus de pesticides présents dans les légumes récoltés dans plusieurs régions du Burkina Faso. C'est le cas des travaux de Lehmann et al. (2017) [28] qui ont révélé la présence des résidus toxiques de pesticide dans des échantillons de légumes et d'eau collectées autour du lac de Loumbila (Burkina Faso). Plus de 36% des échantillons analysés ont présenté des résidus de pesticide supérieurs au LMR. Les substances actives les plus abondantes retrouvées étaient entre autres de l'acétamipride, carbofuran, chlorpyrifos, lambda-cyhalothrine, dieldrine, imidaclopride et profénofos. Ces auteurs ont souligné que les hautes teneurs en résidus dans les échantillons constituent un risque potentiel pour le consommateur et un frein majeur aux possibilités d'exportation des récoltes. De plus, Sanou et al. (2020) [29] ont étudié les pratiques culturales et les niveaux de contamination de la tomate par des pesticides sur des sites maraîchères de la Boucle du Mouhoun. Au total, 16 substances actives (principalement des organophosphorés) ont été mises en évidence parmi lesquelles les teneurs en diméthoate, malathion et cyperméthrine étaient supérieures aux LMR. Environ 62,5% des molécules détectées n'étaient pas homologuées par le Conseil Sahélien des Pesticides (CSP). Une étude semblable a été conduite par Rouamba et al. (2021) [30] sur des échantillons de tomate et laitue prélevés sur plusieurs sites maraîchers dans la ville de Ouagadougou (Boulmiougou, Tanghin 1 & 2, Bissigin et à l'Ecole Nationale de Santé Publique (ENSP)). La tomate a présenté en particulier des teneurs élevées en résidus de pesticides dont majoritairement des molécules de la famille des organophosphorés.

I.2.2.2.3. Plantes comme alternative à la lutte chimique

Les méthodes alternatives à la lutte chimique (application intensive des pesticides chimiques de synthèse) contre les ennemis des cultures reposent essentiellement sur l'utilisation des substances bioactives qui sont issues de sources naturelles (microbienne, animale ou végétale) et présentant des effets pesticides intrinsèques. Parmi les approches de lutte contre les ravageurs qualifiées *a priori* d'être respectueuses de l'environnement, figure l'utilisation des principes actifs dérivés des plantes [31]. En effet, l'usage des propriétés pesticides des végétaux contre les ravageurs des cultures date de l'antiquité. Au Burkina Faso, plusieurs producteurs ont souvent recours aux plantes pesticides pour lutter contre les ravageurs des cultures. Elles sont exploitées de façon traditionnelle sous plusieurs formes : (i) sous forme de bouillie (extrait) à épandre sur les cultures, (ii) sous forme d'extrait d'huile essentielle, (iii) sous forme de poudre utilisée dans la conservation des denrées alimentaires, ou (iv) en associant des cultures sur une même parcelle entre plantes à propriétés pesticides et cultures à protéger.

Les plantes regorgent de composés bioactifs, dont les triterpènes, les tanins, les anthraquinones, les flavonoïdes, les stéroïdes, les glycosides, les saponines, les sucres, les composés phénoliques et les alcaloïdes [32–34]. Ces métabolismes spécifiques (secondaires) sont généralement obtenus par entraînement à la vapeur (hydrodistillation) ou par dissolution à l'aide de solvants (macération, infusion, décoction ou percolation) en utilisant des plantes entières ou des parties spécifiques (feuilles, fleurs, tige, etc.). Si ces pratiques permettent d'extraire de manière efficace les composés bioactifs de la biomasse végétale, l'efficacité biologique de ces métabolites spécifiques est influencée par la nature des composés présents dans les extraits.

Diverses recherches ont montré l'intérêt de plusieurs plantes locales comme biomasse source de biopesticides [31]. En effet, ces recherches ont rapporté des propriétés antibactérienne, insecticide, fongicide, larvicide ou antioxydante de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Cassia nigricans*, *Cleome gynandra*, *Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita*, *Azadirachta indica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Euphorbia hirta*, *Thymus vulgaris*, *Lippia multiflora*, *Citrus sinensis*, etc. Cependant, la disponibilité et le coût de certaines plantes réputées efficaces sont des facteurs limitant leur exploitation quantitative. Si certaines biomasses sont accessibles car abondantes à l'état naturel, facilement cultivables ou constituées de résidus agricoles, d'autres le sont moins ou subissent une pression face à leurs multi-usages. Un exemple typique concerne la production de biopesticides à base des espèces comme *Azadirachta indica* ou de *Jatropha curcas*, qui subit la concurrence de nombreuses applications à haute valeur ajoutée [35–37].

Les espèces *Cymbopogon citratus* et *Eucalyptus camaldulensis* sont deux plantes aromatiques cultivées et répandues aussi bien dans des régions tropicales que des régions tempérées douces (climat méditerranéen ou subtropical). Elles sont largement exploitées pour la production d'huiles essentielles bien connues pour être biologiquement actives. L'eucalyptol et le citral ont été trouvés comme étant les constituants phytochimiques majeurs contenus dans les huiles essentielles extraites respectivement de *Eucalyptus camaldulensis* et de *Cymbopogon citratus*.

II. Présentation des espèces de plantes étudiées

II.1. *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., 1832

II.1.1. Description botanique

Le genre *Eucalyptus* fait partir de la famille des Myrtaceae. Il a été décrit pour la première fois en 1788 par le botaniste Français L'Héritier après une analyse des échantillons de *Eucalyptus obliqua*, récoltés en Australie. De nos jours, ce genre regroupe près de 600 espèces. *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt, arbre au tronc lisse et cendré, est une plante originaire d'Australie et largement répandue dans le monde (régions aride, semi-aride, tropicale et subtropicale, etc.). C'est une plante à croissance rapide pouvant atteindre 20 et rarement 50 mètres de hauteur. L'espèce possède une forte capacité d'adaptation aux conditions climatiques difficiles, *i.e.* feux de brousse, salinité et haute température, et capable de se régénérer rapidement même quand l'arbre est coupé. Les feuilles sont minces et pendent de façon perpendiculaire par rapport au soleil de sorte à réduire au maximum le phénomène d'évapotranspiration. Elles dégagent un parfum caractéristique lorsqu'elles sont froissées. *E. camaldulensis* présente une inflorescence de fleurs blanchâtres donnant naissance à des fruits sous forme de baies ou de capsules ligneuses [38].

II.2.2. Taxonomie et systématique

La Figure 2 est la photo des feuilles, fruits et fleurs de *E. camaldulensis*.

La classification botanique de l'espèce *E. camaldulensis* selon Cronquist, (1981) est donnée comme suit :



- ♦Règne : Plantae
- ♦Classe : Magnoliopsida
- ♦Ordre : Myrtales
- ♦Famille : Myrtaceae
- ♦Genre : Eucalyptus
- ♦Espèce : *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

Figure 2. *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

Photo de l'auteur, novembre 2020)

II.2.3. Usages traditionnels et propriétés biologiques

E. camaldulensis est exploitée par les tradithérapeutes et herboristes contre plusieurs maladies, notamment des infections respiratoires, le rhume, la grippe, la congestion des sinus, etc. De plus, elle intervient également dans le traitement des maladies comme la fièvre, la dysentérie, le paludisme, la diarrhée, l'indigestion et le choléra [39]. Récemment lors de l'épidémie de la maladie à Coronavirus apparue en Chine en 2019, l'utilisation de l'espèce avait été recommandée par plusieurs tradithérapeutes et herboristes au Burkina Faso.

Dans la littérature, plusieurs extraits (huile essentielle et extrait brut) de *E. camaldulensis* ont montré diverses propriétés biologiques telles que antiparasitaire, antifongique, larvicide, antivirale, antibactérienne, insecticide, nématocide, schistosomicide, etc. [39–41].

Ghareeb et al. (2018) [42] ont décrit les propriétés antimicrobiennes des extraits d'acétate d'éthyle et aqueux des feuilles de *E. camaldulensis* contre plusieurs souches fongiques notamment *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Aussi, une fraction issue de l'extrait à l'acétate d'éthyle avait présenté des propriétés larvicides contre des miracidia et des cercariae de *Schistosoma mansoni*. Selon ces auteurs, l'extrait d'acétate d'éthyle serait un bon candidat pour des perspectives de développement d'antibiotiques du fait de son potentiel antimicrobien et schistosomicide

observé. Ils formulent l'hypothèse que les activités biologiques enregistrées pourraient être attribuées à la présence des composés phénoliques identifiés dans les extraits, notamment à l'acide gallique, le taxifoline, le méthyle gallate, la quercétine, la lutéoline et l'hespéridine. Une autre étude a également rapporté le pouvoir antiparasitaire des extraits de *E. camaldulensis* administrés à des souris infectées par le *Plasmodium chabaudi*. Les résultats ont révélé une baisse de la parasitémie d'environ 84%. Le screening phytochimique des extraits utilisés a indiqué des teneurs importantes en phénoliques et en flavonoïdes [43]. Il a également été rapporté que des extraits à base de plusieurs organes (feuilles, écorces, racines) de *E. camaldulensis* ont induit une inhibition significative de la croissance du *F. solani*, un champignon responsable de la pourriture des racines des cultures (tomate, pomme de terre, etc.). Les extraits des feuilles se sont montrés plus actifs comparativement à ceux des écorces et racines [44]. Le potentiel antimicrobien de différents extraits (eau, éthanol, chloroforme, acétate d'éthyle, et l'éther de pétrole) à base des feuilles de *E. camaldulensis* a été évalué sur 5 souches microbiennes, à savoir *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Les résultats ont révélé que les extraits aqueux et éthanoliques étaient les plus efficaces sur les souches microbiennes comparativement aux autres extraits. Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence une diversité de groupes chimiques dont principalement des tanins, des saponines, , des stéroïdes, des flavonoïdes et des composés phénoliques [45]. Des propriétés anti-termite des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* sur l'espèce *Reticulitermes flavipes* ont aussi été rapportées par Sankara et al. (2020) [46] en testant des extraits hydro-éthanoliques. Les concentrations à 5% et 10% (w/w) ont induit les activités anti-termite les plus élevées.

II.3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, 1906

II.3.1. Description botanique

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf. est une espèce de plante herbacée évoluée appartenant à la famille des Poacées communément appelée la citronnelle ou lemongrass. Les feuilles sont de forme linéaire et dégagent une odeur caractéristique de citron qui a un effet insectifuge sur certains insectes, notamment les moustiques. Le genre *Cymbopogon* regroupe environ une cinquantaine d'espèces originaires d'Asie. Les feuilles de la citronnelle peuvent atteindre jusqu'à 100 cm de long et 1,25 cm de largeur et sont engainantes vers le bas. La plante s'adapte bien en milieu tropical et se reproduit par rhizomes [47, 48].

II.3.2. Taxonomie et systématique

La Figure 3 représente la photo de *C. citratus*. La classification botanique de l'espèce selon Cronquist, (1981) est rapporté ci-dessous.



♦**Règne** : Plantae
 ♦**Classe** : Liliopsida
 ♦**Ordre** : Poales
 ♦**Famille** : Poaceae
 ♦**Genre** : Cymbopogon
 ♦**Espèce** : *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

Figure 3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

(Photo de l'auteur, novembre 2020)

II.3.3. Usages traditionnels et propriétés biologiques

Les feuilles de la citronnelle sont exploitées traditionnellement pour leurs nombreuses vertus médicinales. Son huile essentielle est utilisée pour ses propriétés répulsives des insectes (moustiques). Cette même huile essentielle est utilisée en cosmétique du fait de ses propriétés adoucissantes et protectrices contre les rayons UV. Elle est aussi utilisée dans l'industrie alimentaire pour la conservation de plusieurs aliments du fait de son potentiel antiparasitaire. En cas d'indigestion ou de troubles gastro-intestinaux, la citronnelle est conseillée en infusion ou en décoction par les tradithérapeutes. La citronnelle fait partie des plantes à effets pesticides qui produisent des composés bioactifs capables de repousser les ravageurs des cultures [46, 48, 49].

En termes d'activités biologiques, les travaux de Dabiré et al. (2016) [49] ont rapporté un pouvoir inhibiteur significatif de plusieurs souches fongiques à partir des extraits aqueux de plusieurs plantes locales récoltées au Burkina Faso dont l'espèce *C. citratus*. Les espèces du genre *fusarium* ont été plus sensibles aux extraits de *C. citratus* avec des pourcentages

d'inhibition compris entre 42,8 et 92,0%, tandis qu'un effet stimulant de la croissance mycélienne a été observé chez l'espèce *Aspergillus niger*. Ces auteurs ont aussi constaté que le traitement des semences à base des extraits de *C. citratus* réduisait de près de 50% le taux d'infection des cultures induit par les champignons. Ainsi, l'activité observée a été attribuée à la diversité des groupes phytochimiques identifiés dans les extraits, notamment les monoterpènes, des composés phénoliques et des flavonoïdes. Le pouvoir antifongique des extraits bruts de *C. citratus* a également été investigué sur deux souches de fusarium (*Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* sp tulipae) à partir des extraits méthanolique et éthanolique [50]. Les résultats ont révélé pour chacun des champignons une égalité entre MIC (concentration minimale inhibitrice) et MFC (concentration minimale fongicide) indiquant une activité fongicide des extraits bruts. L'analyse HPLC a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques dans les extraits parmi lesquels l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide sinapique, l'acide protocatéchique, l'acide caféique, la rutine, l'acide *p*-coumarique, le kaempférol et la quercétine. Dans le même sens, les travaux de Srihom et al. (2021) [51] ont rapporté un pourcentage d'inhibition de 83,27% et 73,67%, respectivement contre *Fusarium solani* et *Fusarium falciforme* après 7 jours d'incubation dans des extraits bruts de *C. citratus*. Les activités ont été associées en partie aux constituants phytochimiques présents dans les extraits, principalement des composés phénoliques. Ces études démontrent ainsi des possibilités de développement de fongicide naturel efficace à base des extraits de cette plante et en considérant d'autres aspects tels que l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et la nature du solvant d'extraction.

III. Composés phénoliques des extraits des plantes

III.1. Principaux groupes chimiques présents dans les extraits bruts

Les extraits bruts obtenus après une extraction solide-liquide renferment une grande diversité de groupes chimiques dont les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les saponines, les composés phénoliques.

- ✓ **Les alcaloïdes** : les alcaloïdes représentent l'une des plus grandes familles de molécules naturelles. Le caractère fondamental des alcaloïdes est la formation de sels en présence des acides minéraux ou organiques. La classification des alcaloïdes la plus admise repose sur leur répartition selon la structure principale, à savoir le squelette C-N [52].
- ✓ **Les terpénoïdes** : ce sont des métabolites spécialisés présents dans tous les organismes vivants. Ils sont présents en abondance chez les plantes vertes en particuliers les plantes

à fleurs. Les terpénoïdes interviennent dans les mécanismes naturels de défense de la plante. Ils jouent le rôle d'hormone, d'agents de modification des protéines, d'antioxydant, d'antibactérien, d'antifongique et de déterminant dans la fluidité membranaire. La présence d'une unité isoprène, un composé à cinq atomes de carbone constitue leur particularité structurale la plus commune [53].

- ✓ **Les saponines** : les saponines sont une classe de molécules assez diversifiées et sont présentes dans plusieurs espèces végétales. Leur particularité structurale fondamentale est la présence d'un précurseur oxidosqualène à 30 atomes de carbone sur lequel sont greffés des résidus glycosylés. Elles sont en général réparties en glycosides triterpénoïdes et stéroïdes [54]. Leur caractère amphiphile leur confère d'énormes propriétés biologiques (hémolytiques, antibactériennes, antifongiques, antivirales, etc.) [55, 56].
- ✓ **Les stéroïdes** : les stérols végétaux et les hormones stéroïdiennes, les brassinostéroïdes (BR), sont des molécules qui exercent une diversité d'activités biologiques. Ces composés semblent essentiels à la croissance et à la reproduction des plantes ainsi qu'à la défense des plantes contre différents stress biotiques et abiotiques [57].
- ✓ **Les composés phénoliques** : ce sont l'une des plus grandes familles de métabolites secondaires que l'on retrouve principalement chez les végétaux [32, 58]. Ils renferment une diversité structurale dont la caractéristique majeure est la présence d'au moins un noyau phénolique. Ils peuvent exister sous la forme de glycoside ou d'aglycone, et sont des composés matriciels ou libres [32].

III.2. Sources des composés phénoliques

Les métabolites secondaires ou spécialisés des plantes sont des petites molécules spécialisées, synthétisées par les plantes, ne participant pas aux processus du métabolisme primaire mais sont indispensables à la survie de cette dernière au sein de son biotope [59]. On distingue principalement trois grandes familles de métabolites secondaires parmi lesquelles la famille des composés phénoliques qui sont des composés comportant un ou plusieurs cycles aromatiques liés à un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ainsi, le terme « composé phénolique » englobe à la fois les mono, di, et les polyphénols. Durant ces dernières décennies, l'intérêt pour cette famille n'a cessé de croître et compte, à ce jour, plus de 8000 structures chimiques identifiées [11, 32].

Les composés phénoliques jouent plusieurs rôles essentiels pour la plante, tels que la défense contre les agresseurs (biotiques et abiotiques), l'attraction des pollinisateurs, la maturation des

fruits, la chute des feuilles, etc. [32, 60]. Ils sont omniprésents dans tous les organes de la plante (feuilles, racines, écorces, fruits, fleurs, etc.). Plusieurs facteurs environnementaux, biotiques ou intrinsèques, peuvent influencer leur biosynthèse, leur biodisponibilité et leur distribution au sein de la plante. Des composés phénoliques tels que les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les lignanes, les stilbènes, ont été quantifiés dans les raisins, les fraises, la pêche, les oranges, le thé, la pomme de terre, dans les céréales, les légumineuses, etc.

III.3. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques comportent une diversité structurale allant du plus simple comme les acides phénols aux structures complexes hautement polymérisées tels que les tanins et les lignanes. Leur biosynthèse est essentiellement assurée par la voie shikimique. Ils peuvent être répartis en deux grandes sous-familles, à savoir les flavonoïdes et les non flavonoïdes comme présenté sur la Figure 4 [61].

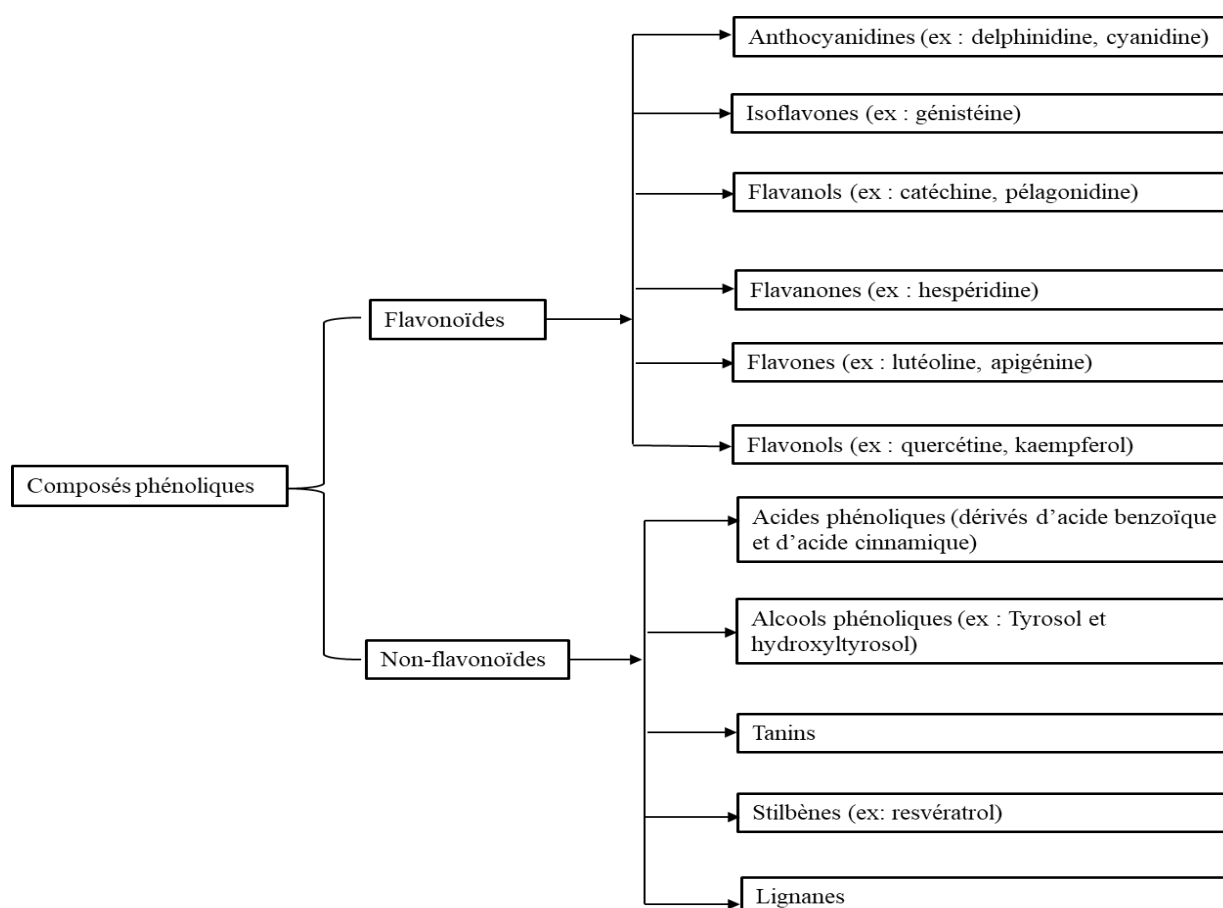


Figure 4. Classification générale des composés phénoliques [60, 62, 63]

III.3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une sous famille des composés phénoliques largement répandus dans le règne végétal. Ils sont constitués d'un squelette de base composé de 15 atomes de carbone dont deux cycles benzéniques (cycle A et cycle B) reliés entre eux par une chaîne carbonée en C3 (C6-C3-C6) [64]. Ce sont des composés naturels constitutifs du groupe des molécules phénoliques les plus diversifiées avec plus 9000 structures identifiées et dérivent d'une même origine biosynthétique [65]. Les flavonoïdes sont synthétisés à partir du métabolisme du glucose par la voie shikimate en transformant la phénylalanine en *p*-coumaroyl-Coenzyme A (formation des cycles B et C) (Figure 5). Le cycle A est formé à partir de la condensation de trois molécules de malonyl-Coenzyme A issues du métabolisme du glucose. Grâce à la chalcone synthase, les deux entités (3 malonyl-CoA et *p*-coumaroyl-CoA) se condensent en une molécule de chalcone (4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone), puis forment de la naringénine. Ce processus permettra la formation des principales classes des flavonoïdes [66].

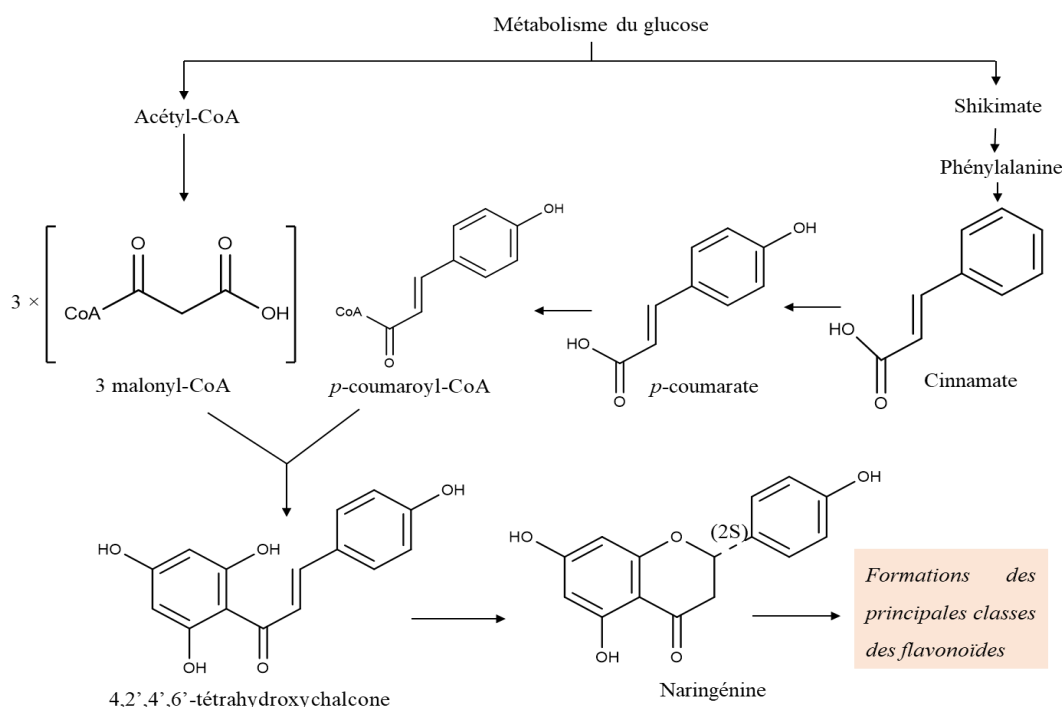


Figure 5. Mécanisme de la biosynthèse des flavonoïdes à travers les voies de l'acétyl CoA et de la phénylalanine [66]

Les flavonoïdes constituent une classe importante de métabolites secondaires qui attirent beaucoup d'intérêts du fait du large éventail d'effets biologiques qui leur sont attribués (antioxydant, anti-inflammatoire, anticancéreux, antifongique, antibactérien, antiviral, etc.) [61, 65, 67]. De par leur capacité à absorber des rayonnements UV, les flavonoïdes contribuent non

seulement à la protection des végétaux mais aussi sont indispensables pour la sécrétion du nectar, substance essentielle à l'attraction des pollinisateurs.

Ces molécules peuvent être subdivisées en plusieurs sous-familles, à savoir les anthocyanidines, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, les flavonols et les flavones (Figure 6). Elles sont abondantes dans les feuilles, les fleurs, les fruits, les céréales, les légumes, les tubercules, les écorces, les racines, etc.

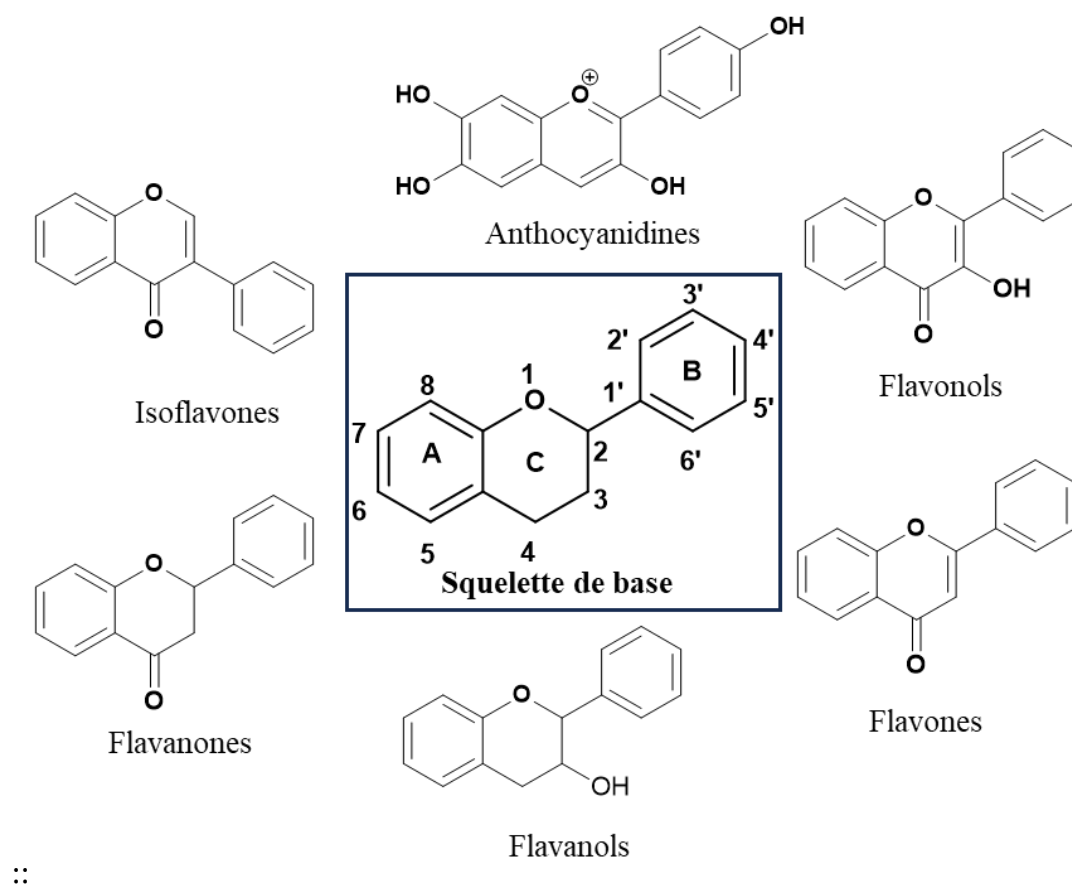


Figure 6. Squelette de base et sous-familles des flavonoïdes [68, 69]

III.3.1.1. Anthocyanidines

Ce sont des pigments responsables de la couleur des fleurs et des fruits des plantes supérieures et se caractérisent par leur forte solubilité dans l'eau. Les formes glycosylés sont souvent désignées par le terme anthocyanine ou anthocyanoside (ex : la cyanidine, la malvidine, la pelargonidine, la delphinidine (Figure 7)) [33, 70].

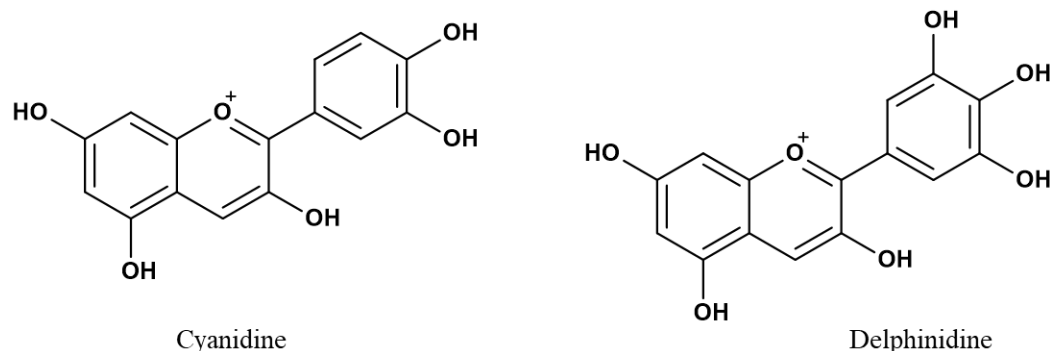


Figure 7. Structures de quelques anthocyanidines (ex : cyanidine et delphinidine)

III.3.1.2. Isoflavones

Avec une distribution limitée chez certains végétaux, les isoflavones représentent une sous classe des flavonoïdes assez particulière pour leurs propriétés oestrogéniques. Ils sont abondants surtout dans les légumineuses telle que le soja [33]. Les isoflavones interviennent dans les interactions plantes-microorganismes en jouant le rôle de précurseur pour la synthèse des phytoalexines. La génistéine est l'un des composés les plus abondants de cette classe de flavonoïdes (Figure 8).

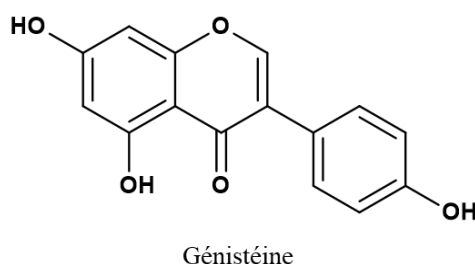


Figure 8. Structure d'un isoflavone (ex : la génistéine)

III.3.1.3. Flavanones

Les flavanones encore appelés dihydroflavones, constituent l'une des sous classes des flavonoïdes que l'on retrouve principalement dans les agrumes (raisin, orange, citron, etc.). Ils présentent des caractéristiques structurales similaires à celles des flavones sauf qu'ils ne possèdent pas d'une double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 du cycle C. La naringine, l'héspéridine, l'ériodictyol sont quelques composés les plus abondants de cette famille (Figure 9).

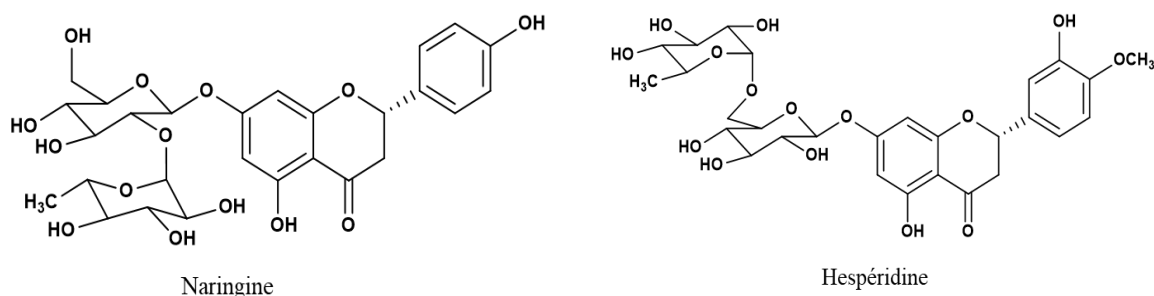


Figure 9. Structures de quelques flavanones (ex : naringine et hespéridine)

III.3.1.4. Flavanols

Également appelés dihydroflavonols ou flavan-3-ols du fait de la présence du groupe hydroxyle en position 3, les flavanols constituent un groupe de composés très diversifiés. L'une des caractéristiques structurales majeures observée est l'absence du groupement carbonyle en position 4 du cycle C et de la double liaison entre les carbones C2 et C3 [68]. Il en résulte la présence de deux carbones stéréogéniques et donc la présence potentielle de quatre stéréoisomères [71, 72]. Ils comprennent essentiellement de la catéchine, du gallate d'épicatéchine, du gallate d'épigallocatechine, de l'épigallocatechine, et leurs oligomères, les procyanidines ou les proanthocyanidines (Figure 10) [72]. On les retrouve dans les fruits comme la banane, les pêches, les poivres, les plantes médicinales etc.

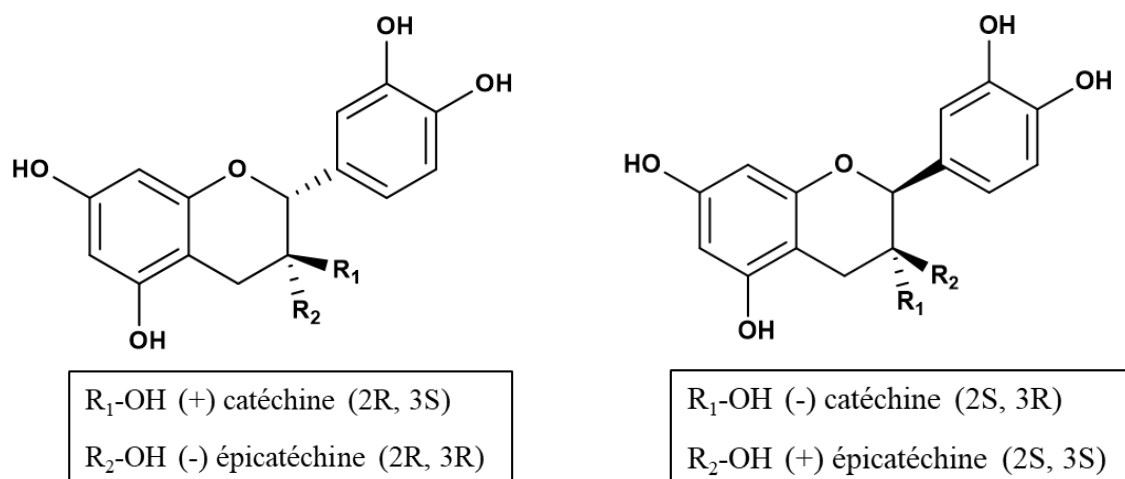


Figure 10. Structures des stéréoisomères (+) catéchine, (-) épicatechine et (-) catéchine, et (+) épicatechine

III.3.1.5. Flavones

Les flavones constituent l'une des sous classes les plus importantes des composés flavonoïdes et sont largement répandus dans les différentes parties de la plante (feuille, fleurs, tige, racine, fruits, etc.). Ils sont synthétisés par plus de 70 familles du règne végétal avec une forte proportion attribuée aux angiospermes [73, 74]. Tout comme d'autres classes de flavonoïdes,

les flavones participent activement à l'absorption des rayonnements UV surtout dans la gamme nuisibles aux acides nucléiques permettant ainsi une protection des plantes contre les effets des radiations UV [74, 75]. Ils jouent également un rôle essentiel dans les mécanismes d'interactions plantes-insectes et sont efficaces contre une diversité de souches bactériennes, fongiques, des nématodes et d'insectes ravageurs [76–78]. L'apigénine et la lutéoline sont quelques aglycones flavones parmi les plus abondantes (Figure 11). Les flavones présentent de nombreux dérivés glycosylés, notamment des *O*-glycosylés mais surtout des *C*-glycosylés (particulièrement en positions 6 et 8) et souvent des dérivés acétylés.

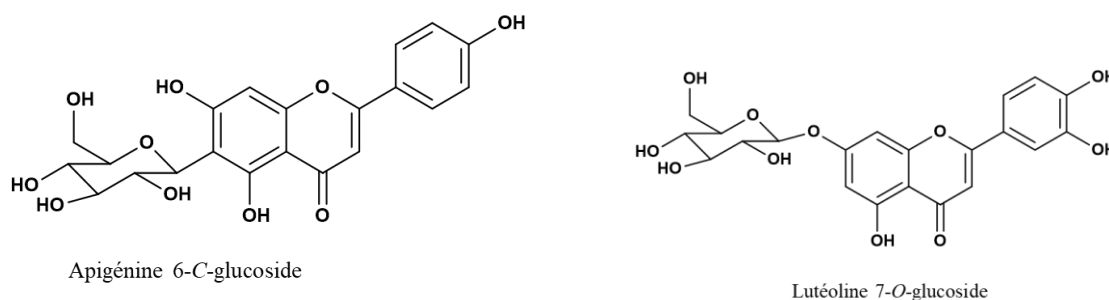


Figure 11. Structures de quelques flavones (ex : Apigénine 6-C-glucoside et Lutéoline 7-O-glucoside)

III.3.1.6. Flavonols

Les flavonols constituent la classe des flavonoïdes la plus diversifiée, la plus étudiée et la plus importante. L'aglycone flavonol présente des caractéristiques structurales similaires à celle des flavones à la différence du groupement hydroxyle présent sur le carbone 3 du cycle C des flavonols justifiant les dénominations 3-hydroxyflavone et 3-déoxyflavonol souvent rencontrées qui désignent respectivement des flavonols et des flavones [33, 75]. Tout comme les flavones, les flavonols comportent une diversité structurale liée aux hydroxylation, méthylation et glycosylation [33]. On rencontre aussi bien des dérivés *O*-glycosylés et *C*-glycosylés avec parfois des positions privilégiées sur l'aglycone en fonction du type de glycosylation. Les dérivés de quercétine, du kaempférol, de l'isorhamnétine, de la myricétine, etc. sont les plus fréquemment rencontrés (Figure 12) [14]. Les unités saccharides sont essentiellement composées de glucose et de rhamnose et parfois de galactose ou de xylose. Les flavonols sont présents dans les fruits, les feuilles, les légumes, les plantes médicinales, etc.

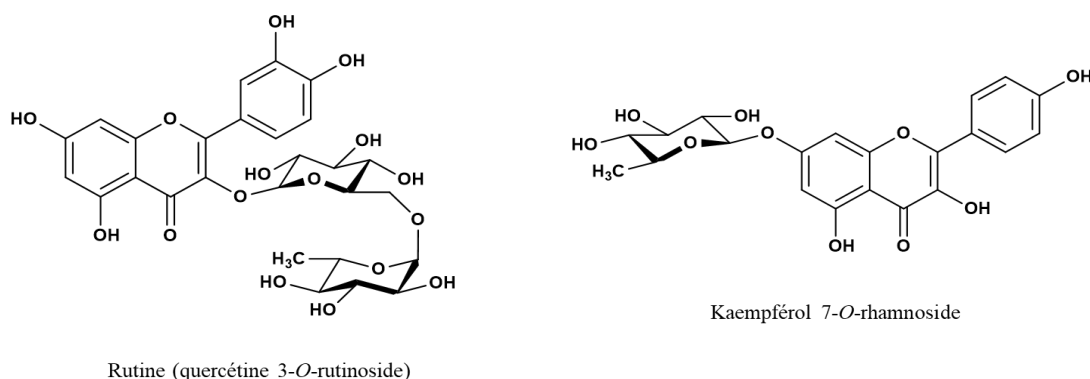


Figure 12. Structures de quelques flavonols (ex : Rutine et Kaempférol 7-*O*-rhamnoside)

III.3.2. Non-flavonoïdes

Les non-flavonoïdes regroupent l'ensemble des composés phénoliques autres que les flavonoïdes, c'est-à-dire essentiellement les acides phénols, les alcools phénoliques, les tanins, les stilbènes, les coumarines, les anthraquinones et les lignanes.

III.3.2.1. Acides phénoliques, alcools phénoliques et stilbènes

Les acides phénols sont l'une des principales sous famille des composés phénoliques et sont largement répandus dans les tissus végétaux. Ils sont fréquemment obtenus sous forme de glycoside, d'amides ou d'ester et rarement sous forme libre [58]. Tous les acides phénols sont issus de l'acide hydroxycinnamique (C3-C6), (ex : acides caféique, *p*-coumarique, férulique et sinapique) et de l'acide hydroxybenzoïque (C1-C6) (ex : acides gallique, vanillique, syringique et *p*-hydroxybenzoïque) [70].

Les alcools phénoliques sont des molécules organiques comportant au moins un alcool aliphatique rattaché à un noyau phénolique. Les molécules les plus connues de cette classe sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol (Figure 13).



Figure 13. Structures de quelques alcools phénoliques (ex : tyrosol et hydroxytyrosol)

Les stilbènes représentent l'une des sous classes des polyphénols dont le composé le plus connu est le resvératrol (Figure 14). Ce composé est impliqué dans la prévention des maladies

cardiovasculaires, du cancer, dans la vasoprotection et la neuroprotection. Ils sont présents dans les raisins, les arachides, le vin, etc.

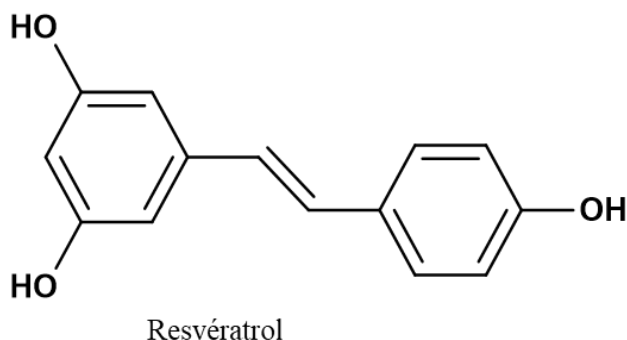


Figure 14. Exemple de structure d'un stilbène (ex : le resvératrol)

III.3.2.2. Les tanins

Les tanins sont aussi des composés phénoliques dont la particularité réside dans leur capacité à établir avec les protéines des complexes insolubles dans l'eau (Figure 15). Ces molécules sont impliquées activement dans la défense et la protection des végétaux contre les herbivores et autres agresseurs en tant qu'agents antimicrobiens [79]. Ce sont des structures macromoléculaires avec un degré élevé d'hydroxylation et de poids moléculaires estimés entre 500 à 3000 Da. Les tanins sont responsables de l'astringence de plusieurs produits végétaux. Ils ont aussi la capacité de précipiter des protéines notamment les glycoprotéines salivaires entraînant une diminution du pouvoir lubrifiant [79]. Les tanins peuvent être répartis en deux principales sous-familles à savoir les tanins hydrolysables et les tanins condensés. La sous-familles des tanins hydrolysables dérivent de la voie shikimate et produisent des esters d'acide gallique (gallotanins) et d'acide ellagique glycosylé (ellagitanins), tandis que les tanins condensés sont issus d'une polymérisation des flavan-3-ols et/ou flavan-3,4-diols. Ils présentent des structures assez complexes en fonction des degrés de polymérisation et d'hydroxylation ou encore du type de liaison flavanique [80]. Les tanins sont présents en abondance dans les légumes, les feuilles, les fruits, les plantes médicinales, le vin rouge, le cacao, etc.

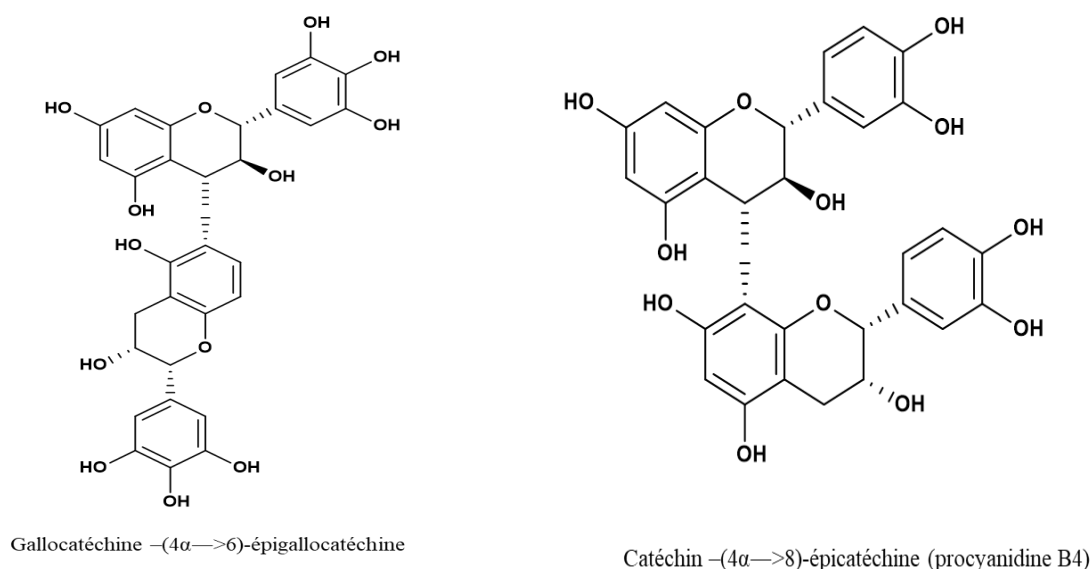


Figure 15. Exemples de tanins

(ex : gallocatéchine $-(4\alpha \rightarrow 6)\text{-épigallocatéchine}$ et catéchine $-(4\alpha \rightarrow 8)\text{-épicatéchine}$
(procyanidine B4)

III.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques

Depuis plusieurs décennies jusqu'à nos jours, l'intérêt pour les composés phénoliques n'a cessé de croître en raison de leurs multiples applications dans divers secteurs industriels. En effet, selon des études récentes, ils offrent des perspectives nouvelles pour l'industrie agroalimentaire en tant qu'antioxydants et conservateurs naturels, à l'industrie pharmaceutique en tant que principes actifs de nombreux médicaments, en cosmétique en raison de leurs propriétés adoucissantes et protectrices contre les rayonnements UV et enfin en agroécologie en tant que pesticides naturels du fait de leurs capacités à lutter efficacement contre les ravageurs des cultures (insecticide, bactéricide, fongicide, etc.). La

Figure 16 présente quelques propriétés biologiques des composés phénoliques.

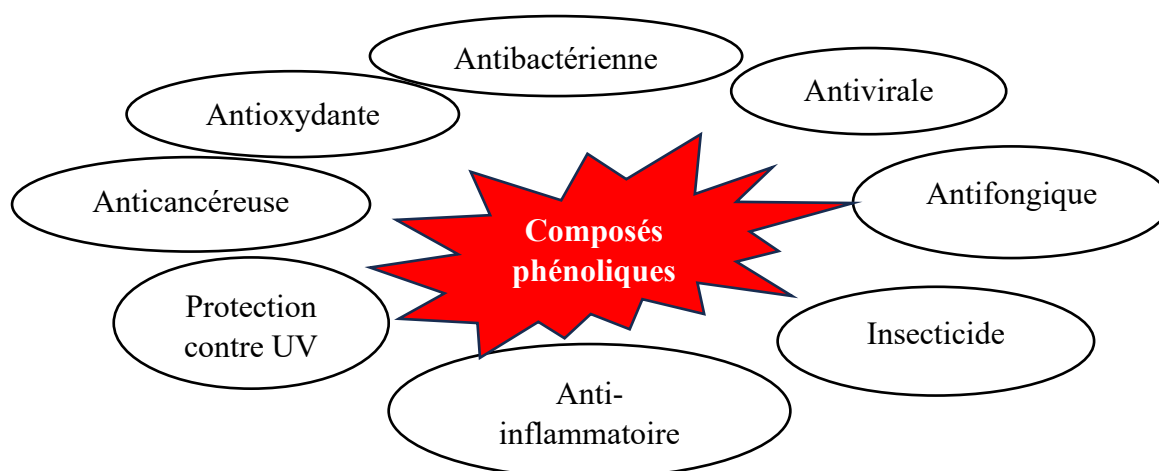


Figure 16. Quelques propriétés biologiques des composés phénoliques

Plusieurs hypothèses ont montré l'existence d'une forte corrélation entre la biodisponibilité des composés phénoliques chez des plantes et les conditions de stress biotique ou abiotique qui leurs sont appliquées. Selon les travaux de Treuter [81], les plantes accumuleraient, sous l'influence des facteurs biotiques et abiotiques, de fortes concentrations en composés phénoliques par un processus oxydatif (Figure 17).

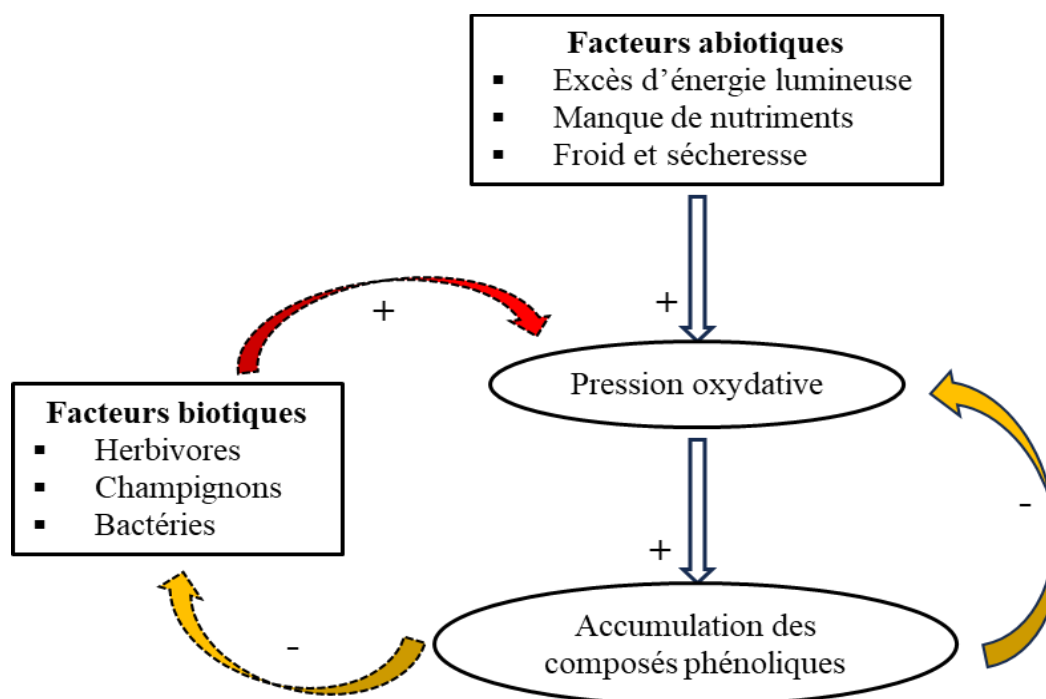


Figure 17. Hypothèse de la pression oxydative comme concept évolutif de la distribution et de l'abondance des flavonoïdes.

(Schéma adapté à partir des travaux de Close et McArthur, (2002) [82])

III.4.1. Activité antioxydante

Un antioxydant peut être défini comme étant un composé naturel ou synthétique ayant la capacité de ralentir ou de limiter un processus d'oxydation lorsqu'il est ajouté à faible dose à une substance naturellement oxydable à l'air libre [83]. Les molécules antioxydantes agissent en piégeant les radicaux peroxydes, en désactivant les espèces réactives d'oxygène (ERO) (radicaux $\text{OH}^\bullet$, Oxygène singulet, ion superoxyde), en limitant la lipoxygénase et en chélatant les métaux lourds [84]. Les molécules antioxydantes sont d'origine endogène (enzymatique) dans la cellule humaine ou exogène (apportées par l'alimentation). Le mécanisme d'action des antioxydants peut être résumé en deux étapes principales :

- ✓ la première consiste en une rupture de la chaîne d'oxydation, mécanisme par lequel l'antioxydant cède un électron au radical libre ;
- ✓ la deuxième consiste en une élimination des initiateurs des ERO.

III.4.1.1. Antioxydants enzymatiques

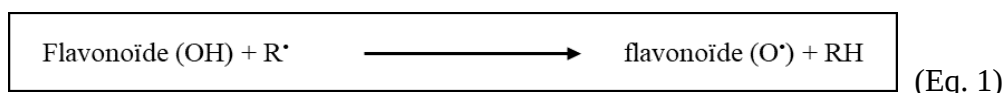
Ce sont des enzymes naturellement synthétisées par l'organisme et constituent la première ligne de défense de ce dernier en cas de production excessive des ERO. Elles sont principalement constituées de la Superoxyde dismutase (SOD), la Catalase et le Glutathion peroxydase [85].

III.4.1.2. Antioxydants non-enzymatiques

Un régime alimentaire riche en produits végétaux (fruits et légumes, etc.) apporte à l'organisme une diversité de métabolites spécialisés capable de limiter le phénomène d'oxydation en neutralisant les ERO. Ce sont principalement des composés phénoliques, certaines vitamines, et des caroténoïdes, etc. Plusieurs travaux ont rapporté le caractère antioxydant fort de plusieurs molécules phénoliques telles que les flavonoïdes [64, 81, 86]. En effet, ces composés de par leurs caractéristiques structurales libèrent facilement des électrons ou des radicaux hydrogène et se transformant en des radicaux intermédiaires phénoxyles stabilisés [87]. Les électrons ainsi libérés interagissent avec les radicaux libres en les inactivant suivant le processus indiqué par l'équation 1 (Eq.1). Ce processus protège non seulement l'organisme contre le stress oxydant, mais aussi joue un rôle important dans la conservation et donc le conditionnement de divers produits alimentaires au cours du stockage.

Il a été démontré qu'une configuration structurale comportant une double liaison entre les carbones C2 et C3 en conjugaison avec le carbonyle en position 4 et la présence sur le cycle B, d'un groupe catéchol ou méthoxyle avec un faible degré de ramification saccharidique, confère aux flavonoïdes une plus grande activité antioxydante [88]. En général, si la glycosylation

entraîne une baisse du pouvoir antioxydant des flavonoïdes, il convient de signaler qu'en fonction du type de glycosylation, l'activité diffère [89]. En effet, des travaux ont montré qu'une C-glycosylation serait plus active en terme d'activité antioxydante comparativement à une O-glycosylation [90]. Kumaran et Karunakaran, (2007) [91] ont rapporté des corrélations linéaires entre les teneurs en composés phénoliques présents dans les extraits de plante et l'activité antioxydante mesurée.



$R^{\bullet}$: Radical libre instable ; RH : "Radical" inactivé.

Le potentiel antioxydant des extraits de feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* a été démontré par plusieurs auteurs en établissant des corrélations positives entre plusieurs tests de mesure de l'activité antioxydante et les contenus en composés phénoliques. En guise d'exemple, les travaux de Nasr et al. (2019) [92] avait rapporté une corrélation positive de 0,52 entre les teneurs en phénoliques totaux (TPT) contenus dans les extraits des feuilles de *E. camaldulensis* et l'activité antioxydante mesurée.

Des constats similaires avaient été rapportés par Muala et al. (2021) [93] en utilisant les feuilles de *C. citratus*. Des corrélations positives ont été établies entre les TPT et la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH avec la variation des facteurs tels que le ratio liquide-solide et la température. Plus les teneurs en phénoliques sont importantes, plus l'activité antiradicalaire est meilleure.

III.4.2. Effets pesticides

Un pesticide est considéré comme un produit chimique naturel ou synthétique (ou mélange de substances) destiné à prévenir, éliminer, tuer, contrôler ou limiter l'action des parasites [94]. Il englobe les bactéricide, fongicide, insecticide, herbicide, nématicide, etc. utilisés pour leurs capacités biocides. Le terme « biopesticide » plus récemment fait référence à des phytopesticides, c'est-à-dire des substances bioactives issues du règne végétal susceptibles d'être utilisées contre divers ravageurs tout en ayant le moins d'effet négatif possible sur l'environnement et la santé humaine. Le terme prendra un sens beaucoup plus général en associant plusieurs autres substances produites par des microorganismes ou d'origine animale [94]. Cependant, le potentiel biopesticide des plantes médicinales semblent être le plus accessible et exploitable à moindre coût par rapport à celui des autres organismes. A ce titre, sur la base des extraits bruts ou purifiés de certaines plantes, plusieurs chercheurs ont mis en

évidence des pouvoirs antibactérien, antifongique, antiviral, insecticide et nématicide, etc. Ces extraits sont dès lors considérés comme des alternatives agroécologiques à la lutte chimique contre les ravageurs des cultures. Aussi, dans plusieurs cas, des corrélations ont été établies entre les composés bioactifs présents dans les extraits tels que les composés phénoliques et les activités biologiques observées.

III.4.2.1. Antibactérien

L'usage des plantes médicinales dans le traitement des infections bactériennes remonte à des périodes très anciennes. Selon plusieurs études scientifiques, cette pratique s'expliquerait du fait de la présence dans les extraits végétaux de nombreuses molécules issues du métabolisme secondaire des plantes et qui sont responsables des activités désirées.

Les composés phénoliques sont l'une des familles des métabolites spécialisés sans doute les plus diversifiés dans le règne végétal. De nombreux travaux ont montré l'efficacité de ces composés contre diverses souches bactériennes affectant la santé humaine, animale ou même celle des plantes. Le pouvoir antibactérien des polyphénols serait dû à leur capacité à inhiber la formation des biofilms bactériens, à détruire la paroi et la membrane cellulaire, ou encore à neutraliser les différentes enzymes synthétisées par ces pathogènes [95–98]. Selon les travaux de Xie et al. (2017) [99], la structure des composés phénoliques est un facteur important qui aurait une influence significative sur leur pouvoir antibactérien. En effet, sur 15 composés phénoliques testés, la sous-famille des acides phénoliques s'est révélée la plus active. De plus, les composés phénoliques ont induit une activité sélective en fonction des bactéries gram positif et négatif. Ceci constituerait potentiellement une piste exploitable dans le cadre du développement d'un biopesticide spécifique ou à un spectre d'activité réduit dont l'impact épargnerait les organismes non cibles (bénéfiques). Aussi, un des avantages d'utiliser des composés phénoliques en tant qu'agent antibactérien serait d'éviter le développement des phénomènes de résistance aux antibiotiques du fait de leur caractère biodégradable [99].

III.4.2.2. Antifongique

L'action des champignons pathogènes sur les rendements des cultures demeure jusque-là l'une des préoccupations majeures dans le secteur agricole mondial et plus particulièrement celui de la production maraîchère en Afrique Subsaharienne et au Burkina Faso. Au regard des impacts négatifs des fongicides de synthèse sur la santé humaine et l'environnement, des essais allant dans le sens du développement des phytofongicides naturels semblent se multiplier.

A ce titre, Kumar et Kumar, (2015) [100] ont rapporté des efficacités fongicides de 78,33%, 75,00% et 70,33% respectivement des extraits de *Solanum indicum*, *Azadirachta indica* et *Oxalis latifolia* contre un champignon ravageur de la tomate (*Fusarium oxysporum*). Ces valeurs obtenues sont relativement comparables à celles enregistrées pour des fongicides synthétiques utilisés comme référence : mancozeb (82,66%), oxychlorure de cuivre (79,33%), et sulfate de cuivre (82,33%).

Dans le même sens, Abdelkhalek et al. (2020) [101] ont mis en évidence des activités fongicides des extraits d'écorces de *E. camaldulensis* à différentes concentrations (1% ; 2% et 3%) contre trois souches de champignons à savoir *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani* et *Botrytis cinerea*. Les résultats ont indiqué une forte inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium culmorum* et *Rhizoctonia solani*, tandis qu'aucune inhibition de la croissance de *Botrytis cinerea* n'a été observé. Ces auteurs suggèrent que la richesse des extraits en composés phénoliques (principalement des acides phénols, des flavonoïdes, des composés aldéhydes) serait à l'origine du potentiel antimicrobien observé. De plus, Bashir et Tahira [44] ont observé un potentiel antifongique des extraits de feuilles de *E. camaldulensis* plus important par rapport à celui des écorces et des tiges contre le *Fusarium solani*.

III.4.2.3. Insecticide

Les insectes, les acariens, les mollusques, les rongeurs, les nématodes, sont des animaux prédateurs qui s'attaquent à des cultures ou des récoltes stockées. Ces ravageurs font partie des bioagresseurs des cultures et sont susceptibles de causer des pertes économiques importantes. Ils sont dès lors combattus au quotidien par les agriculteurs essentiellement au moyen de pesticides chimiques de synthèse. Au regard du danger sanitaire et environnemental lié à ces produits phytosanitaires, de nombreuses recherches visent à isoler de nouvelles molécules issues de sources naturelles telles que botanique par exemple.

Dans ce contexte, l'effet insecticide des extraits d'écorce de *E. camaldulensis* a été investigué par Abdelkhalek et al. (2020) [101] contre des insectes *Tribolium castaneum* (Herbst) et *Sitophilus oryzae* L. en procédant par contact et par fumigation. Les résultats ont montré qu'en 24h, toutes les concentrations (1, 5, 10, 20 et 30 ppm) testées en utilisant la méthode par contact ont provoqué 100% de toxicité chez les deux parasites étudiés. Avec l'essai par fumigation, la mortalité la plus élevée a été enregistrée pour ces deux ravageurs avec des concentrations respectives de 20 ppm (61,66 %) et 30 ppm (57,77 %). Ces auteurs ont suggéré que l'activité insecticide observée serait probablement due aux composés phénoliques dans les extraits

marqués par la présence de l'acide benzoïque, du quinol, de l'acide salicylique, de la myricetine, et de la rutine. Il a également été rapporté que l'extrait éthanolique des feuilles de *C. citratus* provoquait une forte activité répulsive antimoustique à 100% chez l'homme pendant environ plus de 6h de temps d'exposition à *Anopheles arabiensis*, un vecteur du paludisme [102].

III.4.2.4. Flavonoïdes en tant que molécules allélochimiques : relation plante-plante, plante-insecte et plante-environnement.

L'allélopathie est définie comme un ensemble de réactions biochimiques, positives ou négatives, réalisées par les plantes entre elles, ou avec d'autres organismes vivants [103]. C'est un phénomène naturel par lequel une plante sécrète des molécules biochimiques qui sont susceptibles d'influencer soit la germination, la croissance, la survie, la reproduction d'autres plantes, ou d'autres organismes tels que les nématodes par exemple [103]. Ces molécules allélopathiques, une fois synthétisées, sont libérées dans l'environnement via des processus de lixiviation, de volatilisation, par sécrétion d'exsudat racinaire ou par simple décomposition des résidus de la plante. L'acide férulique, utilisé en cosmétique pour ses potentialités à limiter le vieillissement précoce de la peau et également pour ses capacités à limiter les processus d'oxydation, est l'un des composés les plus connus pour ses effets allélopathiques. Bais et al. (2003) [104] dans leurs travaux sur l'influence allélopathique de *Centaurea maculosa* une espèce envahissante ont montré que cette espèce éloigne les plantes indigènes en exsudant de la phytotoxine dans le sol à partir de ses racines. Les résultats des investigations indiquent une libération de la (-)-catéchine à des teneurs élevées entraînant ainsi une inhibition de la germination et de la croissance des plantes indigènes. En 2004, Deng et al. [105] ont également rapporté l'effet inhibiteur de la naringine sur la croissance de certaines graminées comme le maïs, le riz et le *Echinochloa oryzicola* manifesté par un état de brunissement des racines, le retard du développement des feuilles et le nanisme des pousses.

IV. Extraction des molécules bioactives de plantes aux propriétés pesticides

Les extractibles représentent essentiellement les molécules organiques de faible poids moléculaire que l'on trouve dans la structure poreuse de la matière végétale. Ce sont des composés solubles dans l'eau et dans les solvants organiques (d'où le nom d'extractible) contrairement aux constituants structuraux du bois (cellulose, hémicelluloses, lignine) qui nécessitent des traitements plus sévères pouvant entraîner des modifications chimiques importantes. Ils sont généralement obtenus par entraînement à la vapeur, la dissolution ou le

pressage. Les extractibles regroupent toute une gamme de composés dont la plupart sont des métabolites secondaires ou spécifiques à savoir les composés azotés, les terpénoïdes et composés phénoliques.

IV.1. Extraction des huiles essentielles

Couramment appelées essences sécrétées par les plantes aromatiques, les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de molécules volatiles contenues dans le cytoplasme des cellules sécrétrices [106]. La composition chimique d'une huile essentielle dépend du patrimoine génétique de la plante, du biotope (nature du sol, bilan hydrique, des conditions climatiques, etc.), de l'âge de la plante, de l'organe producteur (feuilles, écorces, tiges ou rhizomes, fleurs, racines), de la période de récolte et de la méthode d'extraction utilisée [107].

Plusieurs procédés d'obtention des huiles essentielles des plantes aromatiques sont décrites dans la littérature. Parmi elles, l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau a fait l'objet de nombreuses évolutions menant à différentes variantes dont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion [108]. La plupart des huiles essentielles est constituée de deux principaux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée. Il s'agit des composés terpéniques, prépondérants dans les essences, et des dérivés du phénylpropane majoritairement retrouvés dans quelques essences telles que celles d'anis, de cannelle et de girofle [106, 109].

Des travaux sur les compositions chimiques et l'évaluation des propriétés pesticides des huiles essentielles de nombreuses plantes aromatiques sont rapportés dans la littérature [40, 110–113]. Malgré les bio-activités prouvées des huiles essentielles, leur utilisation reste limitée à l'état libre (en milieu réel) du fait de leur sensibilité à l'oxydation, à l'exposition aux rayonnements UV et de leur volatilité relativement élevée [114–116].

IV.2. Préparation des extraits bruts

On a recours à ce type de procédé quand les principes actifs de la plante sont solubles dans des solvants et peuvent être extraits à partir du tissu de la plante. Les extraits obtenus sont généralement solides ou liquides et sont non-volatiles à température ordinaire. Ils existent plusieurs procédés d'extraction généralement répartis en techniques d'extraction conventionnelles et techniques d'extraction modernes.

IV.2.1. Techniques d'extraction conventionnelles

Les principales techniques d'extraction conventionnelles des plantes sont la percolation, la décoction, l'infusion et la macération.

Encore nommé lixiviation, la percolation consiste à recouvrir de la matière végétale finement broyée par un solvant pendant environ une journée. Le passage du solvant au travers de la matrice végétale s'effectue très lentement de sorte à entraîner avec lui tout composé soluble.

Le principe de l'infusion repose sur l'extraction des principes actifs hydrosolubles de la plante dans un solvant préalablement chauffé. De l'eau chaude (80°C) est ajoutée à la matière végétale broyée ; puis le mélange est laissé au repos sous légère agitation pendant quelques minutes à une demi-heure. Le liquide contenant le principe actif est obtenu par filtration du mélange final.

La décoction est un procédé d'extraction qui consiste à porter à ébullition dans l'eau de la matière végétale pour en extraire les principes actifs. Elle présente l'avantage d'extraire plus aisément les composés actifs des parties les plus dures du végétal (racines, écorces, etc.) ou mène à des rendements d'extraction relativement élevés.

Les techniques d'extraction par infusion et par décoction nécessitent de la chaleur et sont donc susceptibles de détériorer certaines molécules bioactives notamment les composés thermosensibles. D'autre part, elles sont consommatrices d'énergie et nécessitent de grand volume de solvants lorsque la durée de l'extraction est prolongée.

La macération est une méthode d'extraction douce qui consiste à dissoudre à froid les principes actifs d'une matière végétale dans un solvant sous une agitation permanente. C'est une technique peu coûteuse, efficace et facile à mettre en œuvre. Cependant, elle est souvent confrontée à quelques difficultés tels que la consommation importante de solvant et nécessite des durées d'extraction souvent plus longues que l'infusion et la décoction [58, 117]

IV.2.2. Techniques d'extraction dites modernes ou plus innovantes

IV.2.2.1. Extraction aux ultrasons - sonication

L'extraction aux ultrasons est une technologie utilisée dans plusieurs domaines. Son principe repose sur le phénomène de cavitation qui, créant une forte vibration entre les molécules, entraîne ainsi le transfert de masse vers le solvant [118]. Une augmentation significative des rendements d'extraction des matières végétales en appliquant cette méthode a été rapportée dans la littérature [119–121]. Cependant, son utilisation nécessite non seulement des étapes de

filtration, mais peut aussi entraîner des dénaturations possibles des extraits du faite de la forte pression appliquée [60].

IV.2.2.2. Extraction assistée par micro-ondes

Le procédé d'extraction assistée par micro-ondes est également une technologie utilisée dans la récupération des composés bioactifs des plantes dont le principe repose sur l'application d'ondes électromagnétiques pour chauffer rapidement et de manière homogène le solvant [118, 122]. L'extraction est effectuée en trois étapes essentielles : (i) une première étape où l'on assiste à une séparation des solutés de la matrice sous l'effet de la forte pression et de la température élevée créées par les micro-ondes, (ii) une deuxième étape qui concerne la pénétration du solvant dans la matrice et (iii) enfin la dernière étape qui est la séparation des solutés de la matrice et de leur transfert vers le solvant [118]. Par ailleurs, elle est aussi confrontée à certaines contraintes notamment l'utilisation des températures élevées et des durées d'extraction relativement longues. Elle peut présenter des risques d'explosion et est grande consommatrice de solvant. En outre, il s'agit d'une méthode relativement coûteuse [60].

IV.2.2.3. Extraction au CO₂ supercritique

Elle consiste à faire circuler du CO₂ supercritique ($T > 304,25 \text{ K}$ et $> 72,9 \text{ atm}$) à travers une matière végétale pour en récupérer l'extrait par un processus de décompression. Elle présente une bonne sélectivité, est rapide, ne requiert pas d'étapes de filtration, offre des rendements d'extraction relativement élevés et le solvant est non toxique et chimiquement inerte [60, 118]. L'un de ses inconvénients est le nombre important de paramètres à contrôler pour une optimisation de l'extraction [60]. Aussi, le CO₂ est apolaire avec un faible pouvoir de dissolution ce qui pourrait limiter son utilisation dans le cadre de l'extraction des solutés polaires comme les composés phénoliques par exemples. Pour lever cet obstacle, il est quelques fois accompagné d'un co-solvant qui pourrait être de l'éthanol ou du méthanol.

V. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques

V.1. Paramètres influençant l'extraction des molécules bioactives

Plusieurs techniques d'extraction sont appliquées pour extraire les composés bioactifs des plantes. Le choix d'une technique est généralement fait en fonction des caractéristiques de la biomasse et des molécules cibles.

Les composés phénoliques ont fait l'objet d'une attention considérable ces dernières années pour plusieurs raisons dont le développement des pesticides botaniques au profit du secteur

agricole. Ce processus suppose l'obtention des extraits enrichis de ces molécules bioactives, ce qui est aussi fortement dépendant des conditions d'extraction. En effet, certains auteurs ont souligné que de nombreux paramètres clés que sont la température, la nature du solvant, la polarité du solvant, le ratio solvant-biomasse, la durée d'extraction, la vitesse d'agitation, la taille des particules, la période de collecte de la biomasse, l'organe de la plante, le stade de développement, etc. ont des influences sur la quantité et la qualité des composés bioactifs extraits [119, 123–126].

V.2. Méthodes d'optimisation de l'extraction des molécules bioactives

V.2.1. Approche conventionnelle classique

L'extraction des composés bioactifs en appliquant une méthode d'extraction conventionnelle classique repose essentiellement sur le principe de variation d'un seul paramètre et en maintenant fixe les autres paramètres. Selon certains auteurs, cette méthode d'extraction ne permet pas une optimisation adéquate de l'extraction. Aussi, il faut noter que cette méthode entraîne un nombre considérable d'essais à réaliser avec des consommations importantes d'énergie, de solvant d'extraction, des durées de travail assez longues et occasionnant des coûts élevés de production.

Cette approche a été appliquée par de nombreux auteurs dans l'extraction des composés bioactifs à partir de la biomasse telle que les feuilles de *C. citratus* et de *E. camaldulensis*. Singab et al. (2011) [127] ont rapporté un rendement d'extraction de 10% à partir des feuilles de *E. camaldulensis* extrait par macération sous agitation continue avec un solvant constitué de l'acétone aqueuse (70%). Des teneurs de 364,1 milligrammes Equivalent Acide Gallique par gramme (mg EAG/g) et 80,5 milligrammes Equivalent Quercétine par gramme (mg EQ/g) ont été respectivement enregistrées pour les teneurs en polyphénols totaux (TPT) et les teneurs en flavonoïdes totaux (TFT). De même Wong-Paz et al. (2015) ont rapporté un rendement d'extraction de 14,8% et une teneur en TPT de 12,8 mg EAG/g obtenus à partir des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* obtenus par chauffage à reflux durant 2h avec un mélange éthanol-eau comme solvant d'extraction. Dans les deux cas d'études, on note une différence importante en termes de teneurs en composés phénoliques, ce qui pourrait être justifié par les différences entre les méthodes d'extraction ainsi que par la variation des paramètres clés (nature du solvant, durée d'extraction, effet du chauffage, etc.).

Des extractions sur *C. citratus* réalisées par reflux durant 45 min en utilisant un ratio liquide-solide de 10 mL/g et avec comme solvant d'extraction de l'éthanol et du méthanol ont permis

d'avoir des rendements d'extraction respectifs pour ces deux solvants de 11,2% et 15,2%. Des TPT de 118,1 et 35,4 mg EAG/g ont été respectivement enregistrées pour ces extraits [50]. En outre, en travaillant sur l'influence de la période de collecte des feuilles de *C. citratus* par rapport à la variation de leur contenu phénolique par la méthode d'extraction par infusion, Costa et al. (2015) [128] ont montré que la période de collecte des feuilles aurait une influence significative sur les teneurs en composés phénoliques majoritaires identifiés dans les extraits. Ces auteurs ont noté une baisse significative des composés phénoliques à partir du mois d'août suggérant que la biosynthèse de ces composés chez cette plante serait affectée par la lumière du soleil. Par contre, la teneur en flavonoïdes totaux avait augmenté durant cette période.

V.2.2. Approche par plans d'expérience

L'extraction des composés phénoliques en appliquant une approche par plan d'expérience semble constituer une alternative permettant d'améliorer les rendements d'extraction. Cette approche permet une optimisation de façon simultanée de plusieurs paramètres à la fois. Elle a été utilisée dans plusieurs études d'optimisation de l'extraction à partir de la biomasse végétale notamment des feuilles de *C. citratus* et de *E. camaldulensis*.

En effectuant l'extraction aux ultrasons appliquée à la méthodologie de surface de réponse (MSR), Wong-Paz et al. (2015) ont étudié l'influence conjointe du ratio liquide-solide, de la concentration du solvant et de la durée d'extraction des composés bioactifs à partir des feuilles de *E. camaldulensis*. Les conditions optimales d'extraction qu'ils ont obtenues sont : 12 mL/g, 46,8 min et éthanol-eau 35%, respectivement pour le ratio liquide-solide, le temps et la concentration en éthanol. La teneur en phénoliques totaux (TPT) sous cette condition était de 13,9 mg/g. Une étude similaire réalisée avec des feuilles de *C. citratus* en utilisant un plan de type Box-Behnken a permis d'optimiser simultanément trois facteurs, à savoir le temps, la température et le ratio solvant-biomasse [129]. Les solvants d'extraction utilisés étaient des solvants eutectiques profonds. Aux conditions optimales d'extraction, les TPT et TFT étaient respectivement de 116 mg EAG/g et 98 mg EQ/g. Cependant, en procédant par décoction appliquée à une méthodologie de surface de réponse, Muala et al. (2021) [93] avait obtenu comme conditions optimales : ratio solide-liquide 5 g/100 mL, température 93,8°C et temps d'extraction de 11,3 min. Les TPT sous cette condition étaient de 71,9 mg EAG/100 mL à partir des feuilles de *Cymbopogon citratus*.

VI. Description de plan d'expérience

VI.1. Présentation schématique d'un plan d'expérience

La mise en place d'un processus d'extraction bien maîtrisé constitue l'une des étapes les plus déterminantes dans l'étude des composés bioactifs issus des extraits de plantes. La méthodologie du plan d'expérience est une approche mathématique utilisée pour planifier une expérimentation et est applicable aux études scientifiques. Plusieurs types de plan d'expérience sont appliqués dans des processus d'optimisation de l'extraction des composés bioactifs d'une plante. Les *plans d'expérience* ont pour rôle principale de planifier au mieux l'expérimentation qui accompagne une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont donc applicables à tous les processus de production industrielle. De façon simplifiée, un plan d'expérience peut être schématisé sous la forme d'un phénomène de type boîte noire (Figure 18).

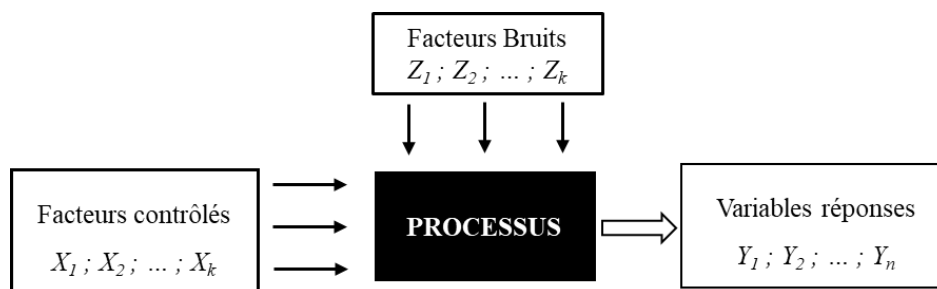


Figure 18. Système de boîte noire d'un plan d'expérience

L'utilisation des plans d'expériences peut avoir plusieurs avantages. Ils permettent de :

- ✓ réaliser un nombre d'essais assez réduit sans pour autant réduire la qualité des résultats ;
- ✓ faire varier plusieurs facteurs à la fois ;
- ✓ étudier les interactions entre les facteurs ;
- ✓ faire une modélisation mathématique du phénomène étudié ;
- ✓ réduire les coûts liés à l'expérimentation et gagner en temps.
- ✓ Etc.

VI.2. Types de plans d'expérience

VI.2.1. Plan factoriel complet à deux niveaux

Un plan factoriel complet est un plan dans lequel l'opérateur mesure les réponses pour toutes les combinaisons de niveaux des facteurs. Le nombre d'essais total est donné par la relation 2^k où k est le nombre de facteurs.

Par exemple pour une expérience comportant 4 facteurs, le nombre d'essai sera de $2^4 = 16$ essais. Cette relation montre clairement que plus il y'a des facteurs à étudier, plus le nombre d'essais va croître de façon exponentielle vers des situations inimaginables en terme du nombre

d'essais pour une expérience. Pour contourner cette difficulté, on passe au plan factoriel fractionnaire [130].

VI.2.2. Plan factoriel fractionnaire à deux niveaux

Tout comme le plan factoriel complet, le plan factoriel fractionnaire permet d'étudier l'influence de tous les paramètres de l'expérimentation mais seulement avec un nombre d'essai très réduit donné par la relation 2^{k-1} , où 2 indique le nombre de niveau de chacun des facteurs, et k le nombre de facteur à étudier [130]. Le nombre d'essai est donc divisé de moitié comparativement au plan analogue factoriel complet.

VI.1.3. Plans de surface

Pour une bonne modélisation des phénomènes étudiés, on fait appel à des plans de surface. En effet, ces types de plan utilisent des modèles polynomiaux du second ordre et étudient également l'influence entre les facteurs. Ils sont appliqués dans le cas des variables continues [130].

VI.1.3.1. Plans de Box-Behnken

Pour ce type de plan, tous les facteurs prennent trois niveaux : -1 ; 0 ; +1. Ces plans sont faciles à mettre en place et obéissent aux critères d'isovariance par rotation (erreur de prévision des réponses est identique pour chaque point). Le plus couramment utilisé est celui permettant d'étudier l'influence de trois facteurs.

VI.1.3.2. Plans de Doehlert

Les plans de Doehlert obéissent à une caractéristique majeure qui est la répartition uniforme des points expérimentaux dans le domaine d'étude. Tous les points sont à équidistance par rapport au centre du domaine d'étude ou domaine d'intérêt.

VI.1.3.3. Plans composites

Les plans composites comprennent trois parties, d'où l'appellation « composite » :

Partie 1 : est un plan factoriel complet à deux niveaux : 2^n (n = nombre de facteur)

Partie 2 : constitue les points centraux et le nombre d'essais est fonction de l'opérateur (minimum 3 répétitions pour des prédictions de qualité).

Partie 3 : constitue les points axiaux ou essais en étoiles. Ce sont des points situés sur les axes de chacun des facteurs en dehors du domaine d'étude et le nombre d'essais est donné par la relation $2 \times n$.

Par conséquent, le nombre total d'essais est obtenu en faisant la somme des essais des trois parties :

$N = 2^n + p + 2 \times n$ (avec N : nombre d'essais total ; n : nombre de facteurs ; p : le nombre d'essais effectués au centre du domaine).

Ce type de plan obéit au critère d'optimalité, c'est-à-dire la position des points expérimentaux pour laquelle l'erreur prédite sur les réponses est la plus faible.

VII. Méthodes de caractérisation des composés phénoliques

VII.1. Analyse qualitative

VII.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une technique analytique utilisée en laboratoire pour la caractérisation de mélanges complexes. Son principe repose sur la migration des composés contenus dans une phase mobile (éluant) sur une phase stationnaire (la silice) en fonction de leur affinité pour les deux phases. Elle est utilisée pour mettre en évidence la présence des composés phénoliques dans un extrait brut. La CCM est effectuée en trois étapes principales : le repérage (préparation de la plaque et dépôt du spot), le développement de la chromatographie (migration par capillarité des composés dans l'éluant) et la révélation des tâches fluorescentes sous une lampe UV correspondantes à des molécules contenues dans le mélange étudié.

VII.1.2. Spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectroscopie IR est une méthode d'analyse spectrale qui apparaît comme une technique susceptible de fournir des informations structurales et approcher la composition chimique d'un échantillon analysé. Son principe est basé sur la capacité vibratoire des molécules constitutives de l'échantillon suite à l'absorption d'un rayonnement IR ainsi que la détection et l'analyse spectrale de ce rayonnement après interaction avec l'échantillon. Elle permet de détecter les groupes fonctionnels d'une molécule.

VII.2. Analyse quantitative : dosage au spectrophotomètre UV-vis

En utilisant la spectrophotométrie UV-vis, il est possible de quantifier les teneurs de nombreux composés bioactifs contenus dans un mélange complexe tels que les flavonoïdes totaux, les composés phénoliques totaux, les tanins totaux, les anthocyanes totaux, etc.

Le dosage des phénoliques totaux est réalisé en utilisant le Réactif Folin-Ciocalteu (FCR) suivant la méthode décrite en 1965 par Singleton et Rossi [131]. Le principe du dosage repose

sur la réduction du FCR au cours de l'oxydation des phénols aboutissant à la formation d'un complexe bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène ayant une absorption maximale comprise entre 700 à 760 nm [132].

VIII. Identification des flavonoïdes par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS)

VIII.1. Aperçu de l'analyse LC-MS et principe

Il existe de nos jours plusieurs techniques d'analyse structurale des composés bioactifs parmi lesquelles la spectrométrie de masse couplée à chromatographie liquide (LC-MS) se présente comme l'un des outils les plus performants pour l'identification structurale et la quantification des flavonoïdes présents dans un mélange complexe. En effet, la LC-MS présente plusieurs avantages tels que sa forte sensibilité, sa capacité à être sélective, et utilise de faibles quantités d'échantillons [133–136].

L'analyse des flavonoïdes par LC-MS suppose une première étape effectuée sur la LC, étape au cours de laquelle les différents constituants se séparent en fonction de leurs caractéristiques structurales (nature de l'aglycone, degré d'oxydation, de glycosylation, acylation, etc.), et de la composition du système de solvant. Ainsi, chaque composé est détecté avec un temps de rétention spécifique [137, 138]. D'autres paramètres importants liés aux conditions expérimentales peuvent également influencer le temps de rétention tels que la durée du run, le type de colonne utilisé, la température de la colonne, la pression, etc. La colonne RP-C18 est généralement l'une des colonnes les plus utilisées pour la séparation des flavonoïdes.

Une fois la séparation des composés effectuée par la LC, la seconde étape consiste à l'analyse de leurs structures qui est automatiquement prise en charge par la spectrométrie de masse par couplage LC-MS en ligne. Le principe de la spectrométrie de masse (MS) repose sur sa capacité à générer des ions en phase gazeuse, à les séparer en fonction de leurs rapports masse-surcharge m/z et enfin à les détecter de façon proportionnelle à leur abondance relative [139]. Cela implique donc l'utilisation d'une technique d'ionisation adaptée. Dans l'analyse des flavonoïdes par la MS, la technique d'ionisation par FAB (Fast Atom Bombardment) était la plus utilisée [140]. Son principe était basé sur le bombardement des flavonoïdes dans un échantillon liquide (solvant non-volatile) à l'aide d'atomes hautement énergétiques (technique d'ionisation « dure »). On assistait à la fragmentation des molécules/ions. Cependant, avec l'avènement des nouvelles techniques d'ionisation dites « douces », l'analyse des flavonoïdes

et des biomolécules présents dans des mélanges assez complexes a connu une évolution considérable. Parmi ces techniques, l'ionisation Electrospray consiste à générer à pression atmosphérique des molécules chargées issues d'un spray créé dans un champ électrique (Figure 19). Elle consiste en trois étapes essentielles dont la formation des gouttelettes chargées à partir du flux issu de LC, l'évaporation du solvant et la réduction de la taille des gouttelettes entraînant une augmentation de la densité des charges et enfin l'éjection des ions désolvatés. L'application de la technique d'ionisation *Electrospray* en mode négative (ESI^-) $[\text{M}-\text{H}]^-$ est la plus utilisée dans l'analyse LC-MS des flavonoïdes [134]. Par ailleurs, le mode positif ESI^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ peut fournir aussi d'importantes informations structurales complémentaires en cas de co-élution par exemple, ou lors des analyses en tandem, ou encore pour des composés chargés positivement tels que les anthocyanines [136, 141].

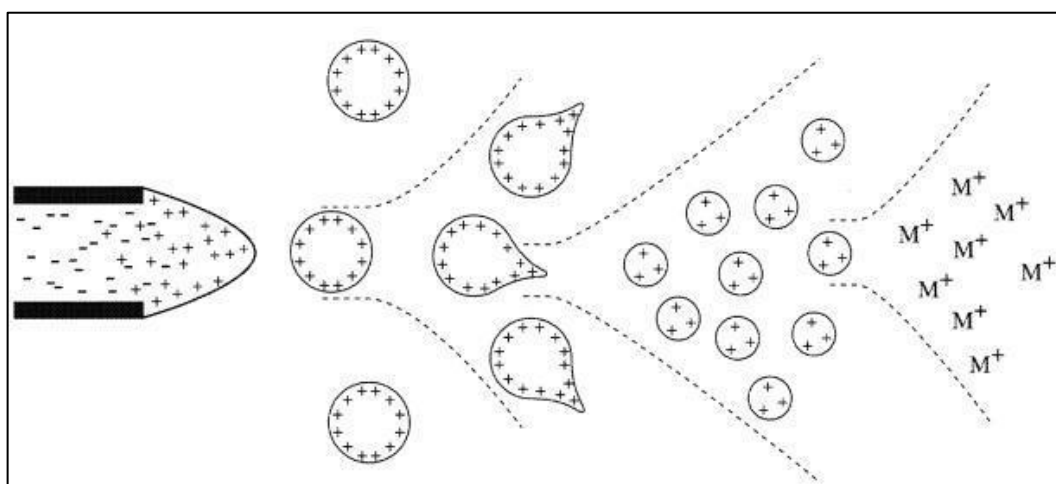


Figure 19. Mécanisme simplifié de l'ionisation Electrospray (ESI) en mode positif.

(Schéma extrait des travaux de Ho et al. (2003)) [142]

VIII.2. Dissociations Induites par Collision (Collision-Induced Dissociation, CID) et spectrométrie de masse en tandem.

VIII.2.1. Description de la CID

La CID est l'un des procédés les plus performants pour l'élucidation structurale des flavonoïdes par analyse LC-MS en tandem (LC-MSMS). Elle permet d'induire des fragmentations des ions sélectionnés en phase gazeuse, par collision avec des molécules neutres (soit de l'argon, de l'hélium ou de l'azote) entraînant la formation des ions fragments plus petits [141, 143, 144]. Ces ions fragments ainsi formés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse en tandem. La CID fournit alors des informations structurales capitales sur le flavonoïde notamment sur la

présence d'éventuelle glycosylation (si oui, sa nature, le nombre de sucre et les points d'attaches, etc.), de méthylation des groupements hydroxyles de l'aglycone, ou d'acylation et sur la structure de l'aglycone [141]. Ainsi, l'exploitation de la CID et des ions fragments formés peuvent aboutir à une identification partielle ou complète des composés recherchés.

VIII.2.2. CID appliquée aux flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une vaste famille de métabolites secondaires phénoliques avec un squelette de base composé de 15 atomes de carbone présentant une configuration C6-C3-C6 (deux cycles aromatiques A et B reliés entre eux par un hétérocycle pyrane, cycle C). Des caractéristiques structurales majeures peuvent être observées entre les différentes sous-familles de flavonoïdes. Le cycle B est généralement en position 2 du cycle C de l'aglycone pour la plupart des sous-familles sauf pour les isoflavones où il est fixé en position 3 du cycle C. Aussi, on peut remarquer chez certaines sous-familles la présence d'une double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 du cycle C. Les flavonoïdes sont naturellement présents le plus souvent sous formes glycosylée (la plus abondante), méthylée, acétylée, acylée, prénylée, sulfatée ou même estérifiée par des acides aromatiques. La forme libre ou aglycone est assez rare. D'une manière générale, la glycosylation, la forme la plus abondante, semble avoir un effet protecteur des aglycones contre des effets d'auto-oxydation et améliore leur solubilité dans le milieu cellulaire. Ceci aurait comme conséquence une diminution de l'activité biologique des aglycones [145]. Par ailleurs des travaux ont montré qu'en cas d'hydrolyse de ces formes glycosylées, les aglycones libérés peuvent présenter des activités biologiques similaires aux aglycones correspondants. Les principaux sucres impliqués sont le glucose, le rhamnose, le galactose, le xylose, l'arabinose, l'acide glucuronique, et l'apiose fréquemment sous la forme de β -glucopyranose [146]. Deux types de glycosylation sont rencontrées à savoir la O-glycosylation et la C-glycosylation [134, 136]. Les dérivés O-glycosylés établissent des liaisons O-glycosidiques entre l'unité saccharide et l'aglycone tandis que pour les dérivés C-glycosylés l'aglycone est directement rattaché à l'unité saccharide via une liaison carbone-carbone. Les positions fréquemment hydroxylées sont les positions 5 et 7 (cycle A), les positions 3', 4' et 5' (cycle B) et les positions 3 et 2 du cycle C. Des études ont montré que les flavonoïdes de types O-glycosylés sont les plus abondants dans la nature et sont rencontrés dans presque toutes les sous-familles de flavonoïdes comparativement aux dérivés C-glycosylés qui sont essentiellement rencontrés en quantité importante chez les flavonoïdes de type flavone.

Au cours des analyses des flavonoïdes par spectrométrie de masse en tandem utilisant le processus CID, des fragments caractéristiques peuvent être observés. En fonction du type de glycosylation, les flavonoïdes présentent des schémas de fragmentation différents.

Une nomenclature basée sur les fragments aglycones a été proposée par Mabry et Markham [147] et est largement utilisée de nos jours dans l'identification des fragments aglycones en utilisant des notations spécifiques ^{ij}A et ^{ij}B où les lettres A et B désignent respectivement les ions fragments aglycones comportant les cycles A et B intacts. Les lettres i et j en exposant indiquent les numéros des liaisons rompues. Par la suite, Domon & Costello [148] ont aussi établi une nomenclature applicable aux ions fragments générés par des flavonoïdes O-glycosylés nommées A, B, X et Y, où ^{ij}A et ^{ij}B sont les deux cycles aromatiques du noyau flavonoïdes, Y_n désigne le numéro de la liaison glycosidique (n en indice) à partir de l'aglycone et ^{ij}X représente les numéros (i et j , en exposant) des liaisons glycanes rompues.

Le schéma de la Figure 20 fait une illustration de la nomenclature des ions fragments des flavonoïdes glycosides en utilisant de la quercétine 7-O-rutinoside comme exemple.

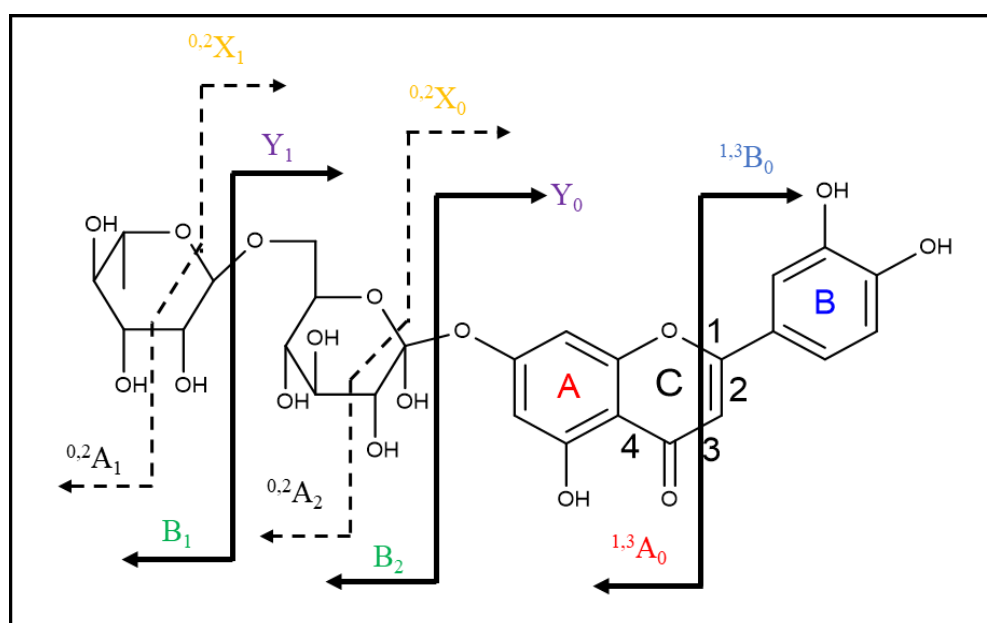


Figure 20. Nomenclature des ions fragments de flavonoïde glycosylé.

(Illustration faite en utilisant de la quercétine 7-O-rutinoside) [134, 147, 148]

VIII.2.2.1. Flavonoïdes O-glycosylés

En rappel, tous les groupements hydroxyles présents sur un aglycone flavonoïde sont susceptibles d'être rattachés à un ou plusieurs unités saccharidiques. Cependant, en fonction du type de flavonoïdes, il existe des positions privilégiées pour établir une liaison glycosidique.

Ainsi, les *O*-glycosylations sont fréquemment rencontrées en position C-3 des aglycones flavonols et aussi en position C-7 des flavonols, flavones, flavanones et des isoflavones.

Il a été rapporté que le clivage de cette liaison *O*-glycosidique entraîne des pertes des fragments neutres de masse spécifique 132u (pentose), 146u (déoxyhexose), 162u (hexose) et 176u (acide uronique) correspondantes à des éliminations des unités monosaccharidiques déshydratées [134, 149]. Il est souvent possible d'observer l'élimination simultanée d'un disaccharide matérialisée par une perte d'un fragment neutre de masse 308u surtout lorsque l'analyse est réalisée en utilisant une source d'ionisation Electrospray en mode négatif [150]. Dans ce cas de figure, la perte de fragment individuel de sucre est facilement détectable en mode positif qui induit un clivage interglycosidique (Figure 21 et 22).

✓ Exemple d'analyse CID de flavonoïde *O*-glycosylé en mode négatif :

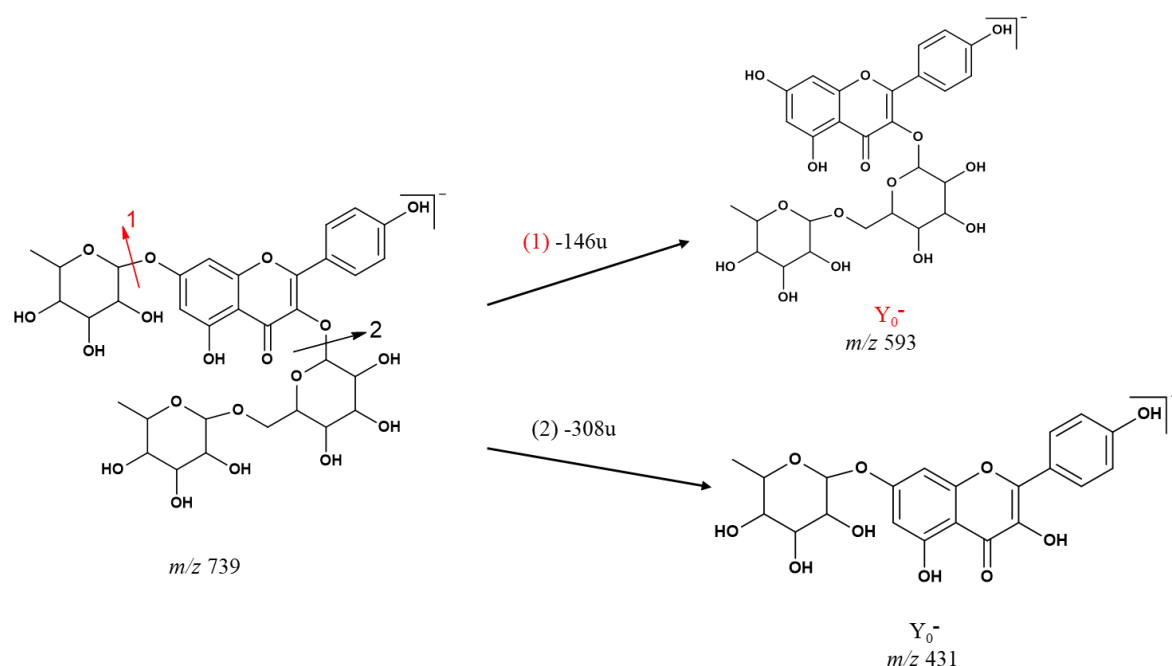


Figure 21. Schéma illustratif de la rupture de la liaison *O*-glycosidique appliquée à la Robinine déprotonée (Kaempférol-3-*O*-robinoside-7-*O*-rhamnoside).

(Par la voie (1), les ions Y_0^- sont formés par élimination d'un monosaccharide et, par la voie (2), par élimination d'un disaccharide (CE=30 eV)) [150]

✓ Exemple de CID de flavonoïde *O*-glycosidique en mode positif :

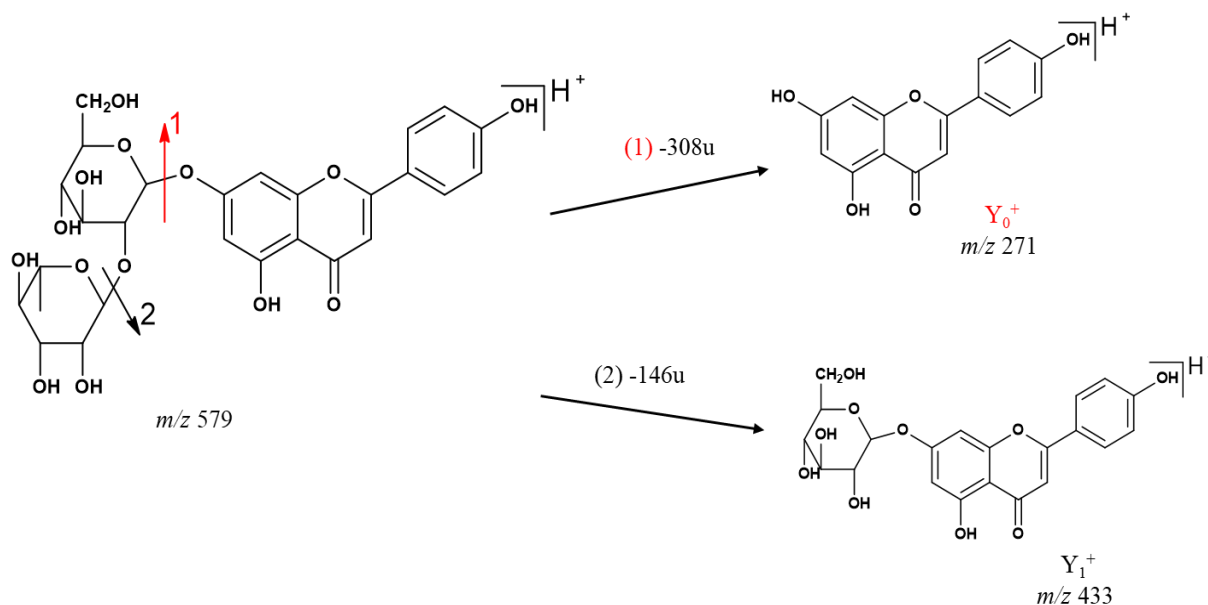


Figure 22. Schéma illustratif de la formation des ions Y_0^+ et Y_1^+ à partir de l'apigénine 7-O-néohespéridoside en mode positif ($CE=5$ ev).

(Par (1), on observe l'élimination d'une unité de disaccharide, tandis que, par (2), seul le sucre terminal est libéré) [134]

VIII.2.2.2. Flavonoïdes C-glycosylés

Les flavonoïdes C-glycosylés, du fait de la présence d'une liaison C-C robuste entre l'aglycone et la fraction saccharide, présentent des schémas de fragmentations différents de ceux précédemment rencontrés chez les flavonoïdes O-glycosylés. En effet, lors des analyses CID, les clivages ont lieu à l'intérieur des unités glycanes, entraînant des pertes de masse caractéristiques de la nature du sucre et des liaisons rompues (Figure 23) [134, 151]. Il a été rapporté que les positions 6 et 8 sont les plus favorables à une C-glycosylation et sont préférentiellement rencontrées chez les flavones.

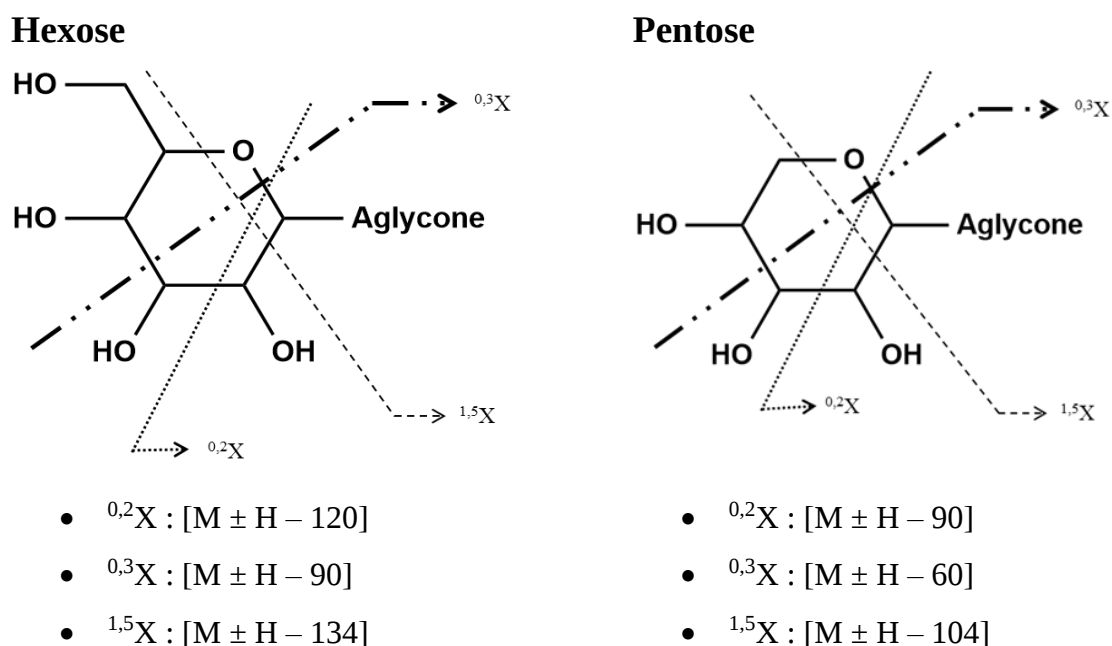


Figure 23. Ions fragments caractéristiques issus du clivage croisés des cycles saccharides en cas de C-glycosylation en analyse CID [134]

En général, les dérivées C-glycosylés en position 6 de l'aglycone libèrent très facilement une molécule d'eau et établissent des liaisons hydrogènes stables entre l'atome éther d'oxygène du cycle glycane et le proton du groupement OH en position 5 ou en position 7 (Figure 24) [134].

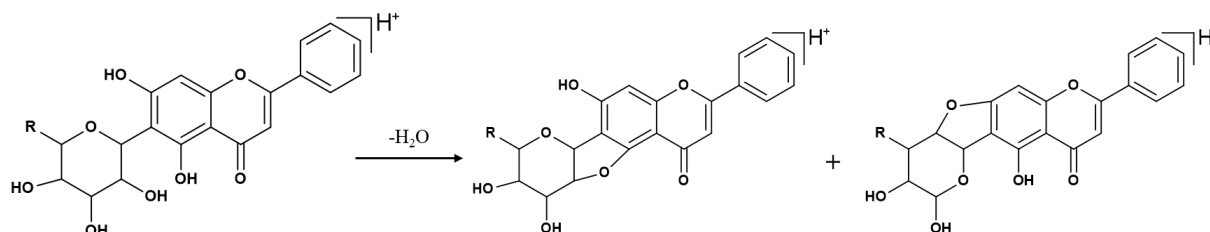


Figure 24. Schéma illustratif de la perte d'une molécule observée pour un flavonoïde 6-C-glycosyl en établissant des liaisons hydrogènes entre le groupement hydroxyle en position 2'' du sucre avec celui de la position 5 ou 7 de l'aglycone.

(Schéma tiré des travaux publiés par Cuyckens et Claeys, (2004) [134])

IX. Analyse critique, formulation des questions de recherche, objectifs de la thèse

En agriculture biologique, de nombreuses espèces de plantes locales à propriétés pesticides sont utilisées par des producteurs contre les bioagresseurs des cultures. Au Burkina Faso, les essences et extraits bruts des plantes telles que *Cymbopogon citratus* et *Eucalyptus camaldulensis* sont appliqués en plein champs, notamment sur les cultures maraîchères. Cette pratique associe des sources de connaissances endogènes et traditionnelles. Certaines productrices de produits maraîchers telle que l'association « *La Saisonnière* », préparent et utilisent des formulations obtenues par trempage des feuilles *C. citratus* ou de *E. camaldulensis* dans de l'eau durant plusieurs semaines (deux à quatre), suivi d'une filtration. Afin d'améliorer les propriétés biocides du filtrat sur les ravageurs cibles, les formulations sont souvent obtenues par association ou combinaison de deux ou plusieurs plantes, par des essais-erreurs en terrains et dans des conditions non standardisées. Le choix des conditions opératoires, c'est-à-dire le temps d'extraction, la température, le volume et la nature du solvant, est fixé sur aucune base scientifique. D'autre part, ces productrices ne possèdent pas des données scientifiques sur les principes actifs présents dans les espèces utilisées et sur l'efficacité de leurs formulations.

Ainsi, des questions de recherche suivantes se posent :

- ✓ Dans quelles conditions l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *C. citratus* et de *E. camaldulensis* est-elle optimisée ?
- ✓ Les composés phénoliques des extraits de *E. camaldulensis* et *C. citratus* et leurs propriétés antioxydantes sont-ils stables durant la conservation ?
- ✓ La combinaison des extraits des deux plantes étudiées est-elle plus efficace comparativement aux extraits de chacune des plantes pris séparément ?

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la mise en œuvre du projet BIORAF-MA (Conception d'une Micro-bioraffinerie pour la pratique durable du Maraîchage au Burkina Faso) qui vise à mettre à la disposition des producteurs maraîchers des formulations de biopesticide efficaces à base d'extraits de plantes pesticides locales. Deux plantes à effets pesticides ont été retenues à savoir les feuilles de *C. citratus* (DC.) Stapf et de *E. camaldulensis* Dehnh. pour plusieurs raisons. Ces plantes sont disponibles localement et sont utilisées par certains maraîchers pour lutter contre les bioagresseurs. De plus, la littérature scientifique montre que diverses activités biologiques seraient associées à différents types d'extraits issus de ces plantes dont des activités antibactérienne, antifongique, insecticide, nématocide, etc.

L'éthanol et l'eau qualifiés de « solvant écologique » ont été choisis pour optimiser l'extraction des composés phénoliques. Les deux solvants ont été utilisés avec succès pour l'extraction des composés bioactifs à partir des végétaux [46, 154]. Cependant, dans la plupart des cas, les teneurs en composés phénoliques totaux obtenues sont généralement inférieures à 175 mg EAG/g d'extrait en considérant l'espèce *E. camaldulensis* par exemple. Plusieurs auteurs ont démontré que les extraits obtenus du mélange des deux solvants éthanol/eau étaient plus riches en composés bioactifs que ceux avec l'eau ou l'éthanol pure [152, 154].

Pour répondre aux questions de recherche, des paramètres clés d'extraction des composés phénoliques ont été définis, puis leur extraction a été optimisée par MSR. Ainsi, l'influence combinée de trois variables indépendantes (c'est-à-dire le rapport liquide-solide, la température et le temps) a été étudiée sur cinq variables réponses ou dépendantes (c'est-à-dire le rendement d'extraction, les TPT (teneur en composés phénoliques totaux), les TFM (teneur en composés flavonoïdes majoritaires), le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). L'identification des principaux flavonoïdes a été réalisée par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance (LC-MS). Pour étudier la stabilité des composés phénoliques, des extraits dissouts dans deux solvants (l'eau pure et le mélange éthanol/eau) a été comparé avec l'extrait sec. L'étude a été conduite sous différentes températures de stockage, T=-20°C, T=4°C, T=ambiante et T=50°C. Enfin, un plan d'expérience a été utilisé pour la formulation d'un produit sur la base de mélange des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* pouvant servir de principe actif dans un biopesticide.

***Chapitre 2 : Détermination des niveaux des
facteurs clés d'extraction des molécules bioactives***

Chapitre 2 : Détermination des niveaux des facteurs clés d'extraction des molécules bioactives

Introduction

Les objectifs de cette étude ont été, d'une part, de déterminer le solvant adéquat pour extraire les composés phénoliques visés de la biomasse, et d'autre part, d'identifier les facteurs clés qui ont une influence sur l'efficacité de l'extraction en les optimisant. Ciblant l'extraction des composés phénoliques, notre choix s'est porté sur le mélange éthanol-eau (v/v) comme solvant d'extraction. Ce choix a été motivé par le faible impact sur l'environnement de ce « *bio-solvant* » comparativement aux solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone, et les éthers oxydes. De plus, plusieurs études ont démontré que l'extraction des molécules bioactives, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes est tributaire du ratio éthanol/eau du solvant d'extraction [126, 152–154]. Il nous est paru important, dans un premier temps, de déterminer la proportion optimale en éthanol qui permettra de maximiser l'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis*.

Ensuite, des extractions ont été réalisées dans le but de délimiter le domaine de variation des variables d'extraction des composés bioactifs. Ainsi, l'influence des variables classiques pertinentes, à savoir le rapport solvant/biomasse, la température et le temps d'extraction, a été déterminée en utilisant le solvant optimal. La vitesse d'agitation (300 rpm) ainsi que la granulométrie ($\varnothing \leq 800 \mu\text{m}$) de la biomasse végétale ont été fixées dans toute l'étude [121, 155]. Enfin, l'analyse des données a permis de définir les niveaux des facteurs qui optimisent l'extraction des composés phénoliques des feuilles *E. camaldulensis*.

I. Matériel et méthodes

I.1. Présentation du matériel

I.1.1. Matériel végétal

Eucalyptus camaldulensis et *Cymbopogon citratus* sont les deux plantes retenues dans le cadre de cette étude. Les feuilles de ces plantes ont été collectées en périphérie de la ville de Ouagadougou (région du Centre, Burkina Faso) en novembre 2020 sur les sites de Pabré et de Komsilga, respectivement pour *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. Les coordonnées GPS sont « 12°33'23,21352"N, 1°33'48,66048"W » et « 12°27'33,32"N ; 1°33'22,6"W », respectivement pour l'espèce *E. camaldulensis* et *C. citratus*. Un échantillon de chacune des

deux plantes a fait l'objet d'identification botanique au Laboratoire de Biologie et Ecologie Végétale de l'Université Joseph KI-ZERBO par le botaniste Dr Issoufou ZERBO. Des herbiers ont été déposés au sein de l'Herbier de l'Université de Ouagadougou (OUA) enregistrés sous les numéros d'identification N°ID 18042 et N°ID 18043 respectivement pour *C. citratus* et *E. camaldulensis*. Ensuite, les feuilles collectées ont été soigneusement triées, nettoyées (rincées à l'eau distillée) et séchées au laboratoire à l'abri de la lumière du soleil durant 15 jours, puis rendues en poudre à l'aide d'un broyeur à couteaux. Les poudres obtenues ont été tamisées en utilisant un tamis de diamètre égal à 0,8 mm. Enfin, elles ont été stockées dans des récipients hermétiquement fermés et déposés à l'abri de l'humidité.

I.1.2. Matériel de laboratoire

Les consommables utilisés étaient essentiellement des solvants, des réactifs, et des standards de composés purs.

Les solvants utilisés (de grade analytique) :

- l'éthanol absolue (99%)
- l'eau distillée
- le méthanol (99%)
- l'acide acétique (99,5%)
- le butan-1-ol (99%)
- le diméthylsulfoxyde (99,9%) (DMSO) (Sigma Aldrich)
- l'acide formique (98%) (CARLO ERBA), etc.

Les réactifs utilisés :

- le réactif Folin-Ciocalteu (FCR), (Fluka Analytical),
- du trichlorure d'aluminium (AlCl_3), (Sigma Aldrich)
- le réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), (Alfa Aesar, Product of JAPAN)
- du carbonate de sodium (Na_2CO_3), (Merck)
- le réactif de NEU (2-aminoéthyl-diphénylborate)
- du PEG (polyéthylène glycol), (Sigma Aldrich)
- du réactif TPTZ (2,4,6-tripyrindyl-s-triazine)
- du trichlorure de fer (FeCl_3) ; etc.

Les standards disponibles :

- la quercétine, la rutine, l'acide gallique, le kaempférol 3-O-glucuronide et la quercétine bêta-D-glucoside ; (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne*)
- la quercétine 3-O-bêta-D-glucuronide (*BIOSYNTH Carbosynth*)
- le trolox (*acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique*)
- la naringine ($\geq 96\%$; *Thermo Scientific chemicals*)
- l'héspéridine (99,9% ; *Fluka*)
- l'apigénine (98% ; *Sigma-Aldrich*)

Les équipements de laboratoire requis pour cette étude :

- un broyeur à couteaux (*Retsch SM 100*)
- une balance de précision (*Precisa XT 220A*)
- un agitateur magnétique (*SMHS – 6*)
- un spectrophotomètre UV-visible (*BMG Labtech SPECTROstar Nano*)
- un spectrophotomètre UV-visible à balayage
- un spectrophotomètre FT-IR (*Bruker*)
- une centrifugeuse (*Seroa 4226*)
- un évaporateur rotatif (*R-300 BUCHI*)
- un lyophilisateur (*CHRIST ALPHA 2-4 LDplus*)
- un four thermostatique (*Arcos*)
- un analyseur thermogravimétrique (ATG), (*Setaram SETSYS Evolution TGA 16/18*)
- une HPLC (*Waters alliance 2695*) couplée à un spectromètre de masse (*Waters QToF API-US*)

I.2. Description des méthodologies

I.2.1. Méthodes de caractérisation des biomasses brutes

I.2.1.1. Taux d'humidité

Les teneurs en eau ont été déterminées par séchage à l'étuve à 105°C de 3g de poudre jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Toutes les analyses ont été réalisées en trois essais et les valeurs moyennes des taux d'humidité ont été calculées $\pm$ SD (standard deviation) [156].

I.2.1.2. Teneur en matières volatiles

La teneur en matière volatile a été déterminée par calcination de 1 g de poudre à 900°C pendant 7 min dans un four à moufle. Trois essais ont été effectués pour chacune des biomasses et les valeurs moyennes ont été calculées $\pm$ SD.

I.2.1.3. Teneur en cendres totales

Les teneurs en cendres totales ont été déterminées par combustion de 3g de biomasse dans un creuset placées dans un four à la température de 600°C durant 3h [156]. Ensuite, les creusets ont été refroidis dans un dessiccateur puis pesés. Tous les essais ont été répétés trois fois et la valeur moyenne calculée. Le pourcentage en cendre a été déterminé en appliquant l'équation (Eq.1) :

$$Cendres\ totales\ (\%) = \frac{(m_3 - m_2)}{(m_1 - m_2)} \quad (Eq.1)$$

m_1 : Masse creuset + échantillon
 m_2 : masse du creuset à vide
 m_3 : masse creuset + cendres

I.2.2. Procédure d'extraction conventionnelle

Les influences de la proportion en éthanol dans le mélange éthanol/eau, du ratio liquide-solide, de la température et du temps d'extraction ont été mesurées via la détermination des rendements d'extractions, des teneurs en phénoliques totaux (TPT), des teneurs en flavonoïdes totaux (TFT) et de l'activité antioxydante (test DPPH et test FRAP).

Les différentes extractions ont été réalisées en utilisant uniquement la poudre des feuilles de l'espèce *E. camaldulensis*.

I.2.2.1. Effet de la variation de la proportion en éthanol et du temps sur l'extraction

Plusieurs extractions ont été réalisées par macération en faisant varier la proportion en éthanol (H₂O ; EtOH_{10%} ; EtOH_{40%} ; EtOH_{70%} ; EtOH_{100%}) et le temps d'extraction (180 min ; 360 min ; 540 min) à partir des poudres de feuille de *E. camaldulensis*. Les extraits ont été préparés dans les mêmes conditions opératoires (T° ambiante ; ratio liquide-solide : 10 mL/g ; agitation : 300 rpm). Après filtration, les filtrats obtenus ont été centrifugés à 4000 trs/min puis la phase liquide a été récupérée et évaporée à l'évaporateur rotatif sous pression réduite pour obtenir des extraits secs sous forme de poudre, conservée au réfrigérateur à 4°C.

I.2.2.2. Effet de la variation du ratio liquide-solide sur l'extraction

L'influence du facteur ratio liquide-solide sur l'extraction a été investiguée en préparant une série d'extraits avec une gamme les ratios liquide-solide suivant : 5 mL/g ; 10 mL/g ; 15 mL/g et 20 mL/g. Tous les extraits ont été préparés en fixant la proportion en éthanol à 70% (v/v), à température ambiante, et sous agitation continue (300 rpm) durant 6 h. Les extraits obtenus après filtration ont fait l'objet de centrifugation à 4000 trs/min puis la phase liquide a été

recupérée et ensuite évaporée à l'évaporateur rotatif sous pression réduite pour obtenir des extraits secs sous forme de poudre. Enfin, les extraits secs ont été conservés au réfrigérateur à 4°C avant l'usage.

I.2.2.3. Effet de la variation de la température sur l'extraction

L'effet du facteur température sur l'extraction a été évaluée en utilisant trois valeurs de température à savoir 25±2°C, 50±2°C et 75±2°C et fixant les autres paramètres, c'est-à-dire le ratio liquide-solide (10 mL/g), le temps d'extraction (6 h), ainsi que la proportion en éthanol-eau (70%, v/v). Après filtration du mélange, les filtrats ont été centrifugés à une vitesse de 4000 trs/min et la phase liquide a été récupérée. Ensuite, le solvant a été éliminé à l'évaporateur rotatif sous pression réduite afin d'obtenir des extraits secs sous forme de poudre qui ont été conservés au réfrigérateur à 4°C avant l'usage.

I.2.2.4. Effet de la variation du temps d'extraction

L'influence du facteur temps d'extraction a été étudiée en faisant varier la durée d'extraction, *i.e.* 3h, 6h, 9h, 12h et 24h. Les paramètres tels que le ratio liquide-solide, la température et proportion en éthanol ont été respectivement fixés à 10 mL/g, T° ambiante et 70% d'éthanol. Ensuite le mélange a été filtré et le filtrat obtenu a été centrifugé à 4000 trs/min, puis la phase liquide a été récupérée et ensuite évaporée à l'évaporateur rotatif sous pression réduite pour obtenir des extraits secs sous forme de poudre. Les extraits secs ainsi obtenus ont été conservés au réfrigérateur à 4°C avant l'usage.

I.2.3. Mesure des rendements d'extraction

Les rendements d'extraction ont été déterminés en faisant le rapport de la masse de l'extrait sec avec celle de la poudre de départ (Eq.1).

Les résultats issus de cette première partie ont permis de définir des plages adéquates pour chacun des facteurs indépendants à utiliser pour le processus d'optimisation.

$$Rdmt (\%) = \frac{m_{\text{extrait}}}{M_{\text{poudre}}} \times 100$$

(Eq.2)

- $Rdmt (\%) = \text{rendement d'extraction}$
- $m_{\text{extrait}} = \text{masse de l'extrait}$
- $M_{\text{poudre}} = \text{masse de la poudre}$

I.2.4. Dosages des composés bioactifs dans les extraits par spectrophotométrie UV-visible

Le principe de la spectrophotométrie UV-vis repose sur l'absorption du rayonnement dans les domaines de 190 nm à 800 nm, à savoir UV (190 nm à 400 nm) et visible (400-800 nm). L'acide gallique et la quercétine ont été utilisés comme étalon respectivement pour les TPT et les TFT.

I.2.4.1. Dosage des flavonoïdes totaux (TFT)

Les TFT ont été évaluées par dosage colorimétrique en utilisant comme réactif le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% (w/v) [157]. L'absorbance du complexe flavonoïde-aluminium (415 à 420 nm) a été mesurée par spectrophotométrie UV-vis. Des mélanges de 1 mL de chaque extrait et 1 mL de la solution de AlCl_3 (2%) préparée dans du méthanol ont été effectués. Puis le mélange a été incubé à l'abri de la lumière pendant 40 min et les absorbances ont été lues à 420 nm par rapport à un blanc constitué d' AlCl_3 (2%) et du méthanol. Une solution de quercétine préparée dans les conditions identiques a été utilisée comme solution étalon. Les TFT ont été exprimées en mg EQ/g d'extrait sec (milligramme Equivalent Quercétine par gramme). Tous les essais ont été répétés trois fois et les valeurs moyennes ont été calculées $\pm$ SD. (Equation de la courbe d'étalonnage établie à partir de la solution de la quercétine : $y = 5,9669x + 0,0192$; $R^2 = 0,992$; Figure 25)

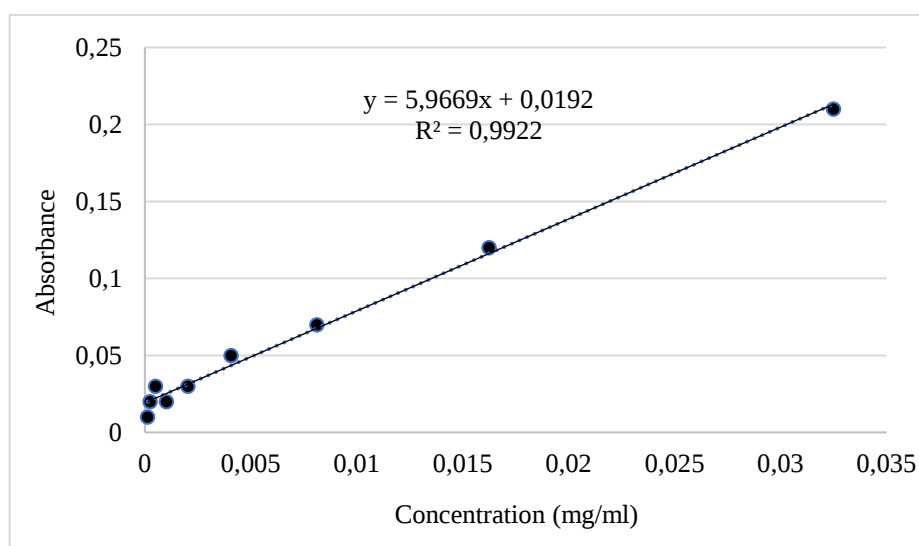


Figure 25. Courbe d'étalonnage de la quercétine

I.2.4.2. Dosage des phénoliques totaux

Les TPT (teneurs en phénoliques totaux) ont également été déterminées par dosage colorimétrique en utilisant le Réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) [131]. A 0,5 mL de chaque

extrait, 0,5 mL de FCR dilué dans de l'eau distillée (1:10, v/v) a été ajouté. Après 8 min d'incubation à l'abri de la lumière, 1 mL d'une solution de Na_2CO_3 à 7,5% (p/v) pour neutraliser le réactif résiduel. Le mélange est ensuite incubé à l'abri de la lumière pendant 60 min. Les absorbances ont été enregistrées au spectrophotomètre UV-vis *SPECTRO star BMG LABTECH* à 760 nm contre un blanc contenant du FCR, de Na_2CO_3 (7,5%) et d'eau distillée. L'équation de la courbe d'étalonnage a été établie en utilisant une solution d'acide gallique préparée dans les conditions similaires ($y = 20,84x + 0,029$; $R^2 = 0,994$; Figure 26). Les TPT ont été exprimées en mg EAG/g d'extrait sec (milligramme Equivalent Acide Gallique). Tous les essais ont été effectués en triplicata et les valeurs moyennes ont été déterminées $\pm$ SD.

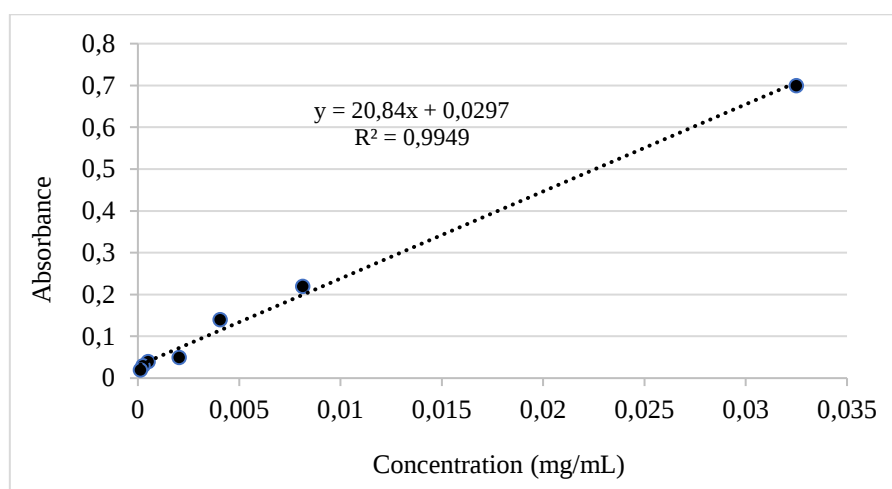


Figure 26. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

I.2.5. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante

I.2.5.1. Capacité antiradicalaire par DPPH

Cette méthode utilise un radical libre stable à savoir le $\text{DPPH}^\bullet$ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) dont le site radicalaire est centré sur l'atome d'azote (Figure 27). Initialement, ce composé donne une coloration violette dans du méthanol.

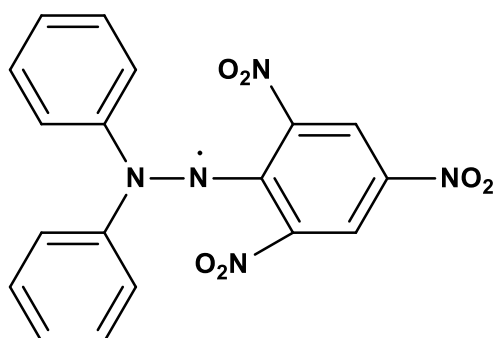
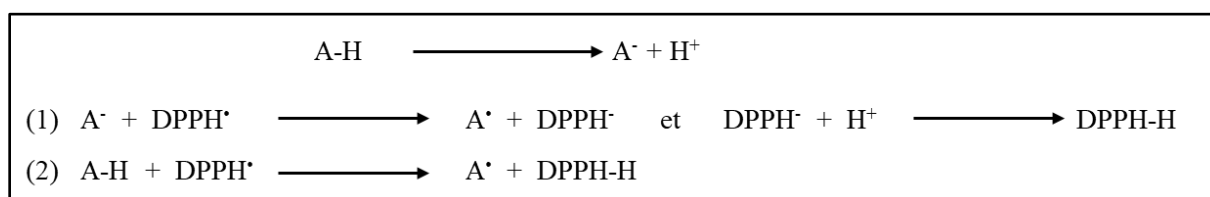


Figure 27. Structure du radical DPPH•

Le principe de la méthode est basé sur la capacité des composés antioxydants (AH, *e.g.* des composés phénoliques) à réduire le radical DPPH• libre en DPPH-H de couleur jaunâtre qui absorbe dans le visible entre 510-520 nm [158]. D'un point de vue mécanistique, la réaction consiste soit à un transfert d'un électron de l'antioxydant vers le radical DPPH• pour générer des anions DPPH⁻ qui capteront à leur tour des protons en générant la molécule DPPH-H (réaction 1), ou soit en un transfert direct d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant (AH) vers le radical DPPH• pour générer la molécule DPPH-H (réaction 2).



L'activité de piégeage des radicaux libres des extraits a été évaluée contre le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en utilisant la méthode adaptée aux microplaques comme décrit précédemment [159]. Après une dilution en cascade ($0,25-3,90 \cdot 10^{-3}$ mg/mL), 100 μ L de chaque extrait ont été mélangés à 100 μ L de la solution de DPPH fraîchement préparée dans du méthanol (0,2 mM) et le mélange réactionnel a été incubé dans l'obscurité pendant 30 min. Ensuite, la lecture des absorbances a été effectuée à 515 nm contre le méthanol pris comme un blanc. Les concentrations IC₅₀ (μ g/mL) ont été déterminées en effectuant une régression linéaire à partir des pourcentages d'inhibition calculés en appliquant l'équation suivante Eq.(3). Cette concentration correspond à la concentration en antioxydants présents dans l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH•. Ainsi, le pouvoir antiradicalaire d'un extrait est d'autant plus élevé que sa concentration IC₅₀ est petit.

$$\%Inhibition = \frac{(A_{contrôle} - A_{extrait})}{A_{contrôle}} \times 100 \quad (Eq. 3)$$

où $A_{contrôle}$ est la valeur d'absorbance de la solution DPPH sans échantillon, et $A_{extrait}$ celle du mélange solution échantillon d'extrait + solution DPPH.

I.2.5.2. Pouvoir réducteur des ions ferriques « *Ferric Reducting Antioxidant Power* » (FRAP)

Le test FRAP mesure la capacité des extraits à réduire les ions ferriques (*complexe ferrique-tripyridyltriazine*) vers la forme ferreuse (*complexe ferreux-tripyridyltriazine*) entraînant l'apparition d'une coloration bleue intense avec une absorption maximale à 593 nm. La teneur en antioxydant est déterminée par rapport à la concentration connue en ions Fe^{2+} dans la solution.

Les teneurs totales en antioxydants ont été estimées à l'aide de la méthodologie proposée par Benzie et Strain, (1996) [160], dans laquelle le réactif FRAP est fraîchement préparé comme suit : une solution tampon d'acétate (300 mM) est préparée dans de l'acide acétique, le réactif TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) est préparé à une concentration de 10 mM dans une solution de HCl (40 mM) et le trichlorure de fer ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) est préparé à une concentration de 20 mM dans de l'eau distillée. La solution FRAP est obtenue en mélangeant dans des proportions 10:1:1 ; v/v/v respectivement les solutions de tampon acétate, de TPTZ et de $FeCl_3$. À 60 μ L de chaque extrait, 180 μ L d'eau distillée et 1,8 mL de réactif FRAP ont été ajoutés et le mélange réactionnel est incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. Les absorbances ont été lues à 593 nm par rapport à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution de préparée dans les mêmes conditions Trolox ($y = 1,5023x - 0,0591$; $r^2 = 0,9921$; Figure 28). Tous les essais ont été réalisés en triplicata et les valeurs moyennes ont été déterminées puis exprimées en mg ET/g d'extrait (milligramme Equivalent Trolox par gramme) $\pm$ SD.

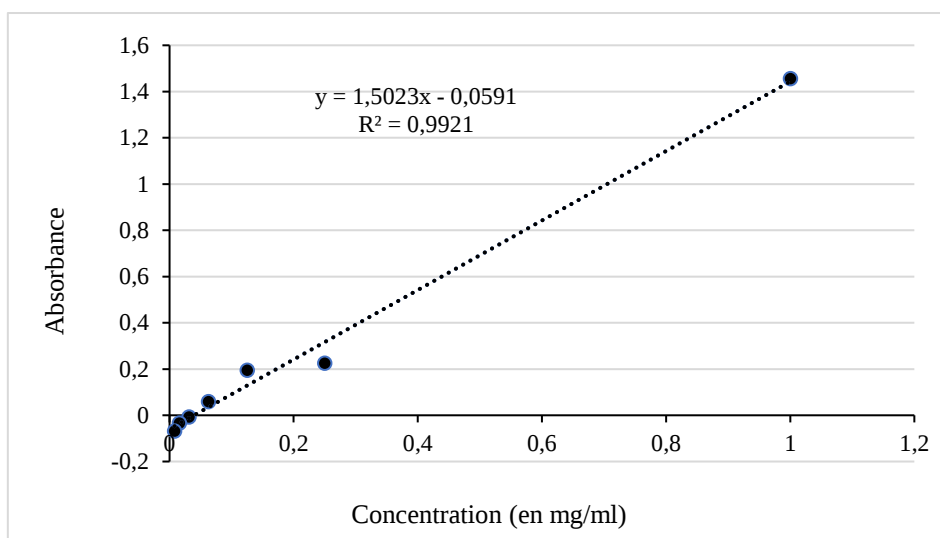


Figure 28. Courbe d'étalonnage du trolox

II. Résultats et discussion

II.1. Caractérisation du matériel végétal brut

Les poudres des deux plantes étudiées ont subi une caractérisation afin d'en déterminer les taux en eau résiduelle, les taux en cendres totales et la quantité de matière volatile. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 1.

II.1.1. Taux d'humidité

Le pourcentage d'humidité dans les échantillons solides, représente la perte d'eau lorsque l'échantillon est chauffé à l'étuve à 105°C.

Les taux d'humidité ont été mesurés à $5,7 \pm 0,1$ % et $6,5 \pm 0,1$ % respectivement pour *E. camaldulensis* et *C. citratus*. Il a été démontré que des teneurs trop élevées en eau dans la biomasse entraînent des influences négatives importantes sur sa conservation au cours du temps du fait du développement de mécanismes enzymatiques pouvant conduire à la dénaturation de certains composés bioactifs. En général, une teneur inférieure à 10% est souhaitable pour une meilleure conservation de l'ensemble des propriétés bénéfiques de la biomasse sur une longue période [161]. Par conséquent, nos échantillons présentent un potentiel de conservation assez élevé avec un faible risque de contamination ou de dégradation de certains ingrédients bioactifs du fait de l'humidité.

II.1.2. Matière volatile

La matière volatile à 900°C représente la perte des substances volatiles lorsque l'échantillon est chauffé à 900°C. La teneur en matière volatile dans les deux types de biomasse a été déterminée

par chauffage en absence d'air dans des creusets fermés hermétiquement. Les résultats obtenus étaient de l'ordre de 76,9% et 77,5% respectivement pour *E. camaldulensis* et *C. citratus* (Tableau 1). Ces deux plantes contiennent relativement les mêmes teneurs en matières volatiles ($p>0,05$).

II.1.3. Teneurs en cendres totales

Les teneurs en cendres totales des biomasses ont été déterminées après combustion des poudres végétales en présence d'air. On note un taux en cendres totales relativement plus important dans la biomasse de *C. citratus* (9,2%) comparativement à celle de *E. camaldulensis* (6,1%). Ces taux sont proches de la valeur moyenne du taux des cendres des biomasses en générale (~7,5%). Les travaux de Ojo, (2017) [162] avaient rapporté une teneur en cendre totale de 8,02% dans les feuilles de *C. citratus*, relativement proche des nôtres (9,2%). L'auteur a mis en évidence dans cette biomasse la présence de plusieurs minéraux en abondances tels que Ca, K, Na, Fe, Mn, Zn, P, tandis que le Mg et le Cu étaient présents à des teneurs relativement faibles.

En effet, une teneur élevée en cendres totales dans la biomasse pourrait induire la présence d'une forte teneur en éléments minéraux dans les extraits du fait de la solubilité de certains minéraux majeurs tels que les alcalins (Na, K, etc.) et les alcalino-terreux (Mg, Ca, etc.). La présence de ces minéraux dans les extraits peut avoir des influences négatives ou positives sur les activités biologiques mesurées en agissant soit par synergie ou par antagonisme. En effet, certains métabolites responsables de plusieurs propriétés biologiques (des flavonoïdes par exemple) peuvent facilement former des complexes avec ces minéraux [163, 164].

Tableau 1: caractérisation des poudres végétales

	<i>E. camaldulensis</i>	<i>C. citratus</i>
Humidité (%)	5,7 ± 0,1	6,5±0,1
Matières volatiles (%)	76,9±3,8	77,5±3,9
Teneur en Cendres totales (%)	6,1 ± 0,1%	9,2±0,8%

II.2. Extraction conventionnelle classique par variation d'un seul paramètre à la fois

La proportion adéquate en éthanol dans le mélange éthanol-eau (v/v) a été déterminée en préparant des extraits à partir des feuilles de *E. camaldulensis* dans des proportions croissantes en éthanol (0%, 10%, 40%, 70%, et 100%). Les proportions 0% et 100% correspondent

respectivement à l'eau distillée et à l'éthanol absolu (ou éthanol sec). L'effet de la composition du solvant sur l'extraction des composés bioactifs a été étudié en faisant varier le temps d'extraction, c'est-à-dire à 180 min, 360 min et 540 min. La performance d'extraction des composés bioactifs a été évaluée par la mesure du rendement d'extraction, des TPT, des TFT et de l'activité antioxydante (DPPH & FRAP).

II.2.1. Effets du temps d'extraction et de la proportion en éthanol sur le rendement d'extraction

Le graphique de la Figure 29 montre que l'augmentation de la durée d'extraction de 180 min à 540 min n'entraîne aucune variation significative ($p > 0,05$) du rendement d'extraction quel que soit la proportion du mélange éthanol-eau utilisée. En revanche, il est observé une différence significative ($p < 0,05$) du rendement d'extraction lorsqu'on fait varier la composition du solvant d'extraction. Les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés dans l'eau pure (H_2O) et l' $EtOH_{70\%}$ tandis que l'éthanol pur ($EtOH_{100\%}$) a montré une capacité d'extraction la plus faible. Les rendements d'extraction obtenus peuvent être classés dans l'ordre décroissant suivant $H_2O \sim EtOH_{70\%} > EtOH_{10\%} \sim EtOH_{40\%} > EtOH_{100\%}$. Un constat similaire a été rapporté par Zieliński et al. (2000) [165] qui ont montré que les rendements d'extraction à l'aide de l'eau sont relativement plus importants que ceux de mélange éthanol-eau et l'éthanol pur. Cette observation serait probablement dû au fait qu'en plus des composés phénoliques dans les extraits aqueux, les protéines et les carbohydrates sont aussi extraits en abondance par l'eau [165].

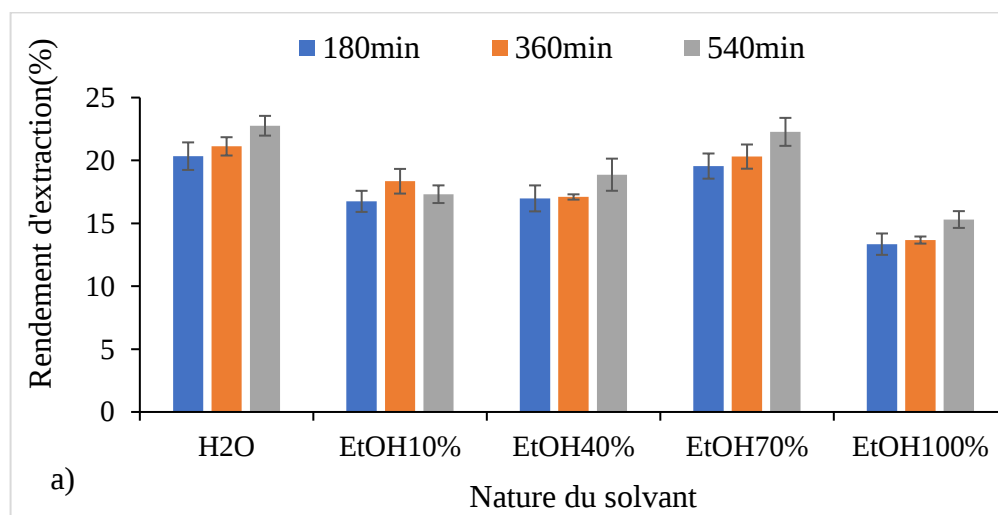


Figure 29. Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir des feuilles de *E. camaldulensis* en fonction du solvant et de la durée d'extraction

II.2.2. Effets du temps et de la proportion en éthanol sur les teneurs en phénoliques totaux (TPT)

Sur le graphique de la Figure 30, il a été remarqué que la variation du facteur temps n'a conféré aucune influence significative ($p > 0,05$) sur l'extraction des TPT quel que soit la composition des solvants d'extraction. Par ailleurs, il a aussi été observé une légère augmentation des TPT avec augmentation de la concentration en éthanol de 0% (H₂O) à 40% (EtOH_{40%}). La valeur maximale des TPT enregistrée dans ces extraits est de 291,2 mg EAG/g d'extrait. Au-delà de cette concentration du solvant (EtOH_{40%}), l'augmentation de la proportion en éthanol (c'est-à-dire EtOH_{70%} et EtOH_{100%}) a induit une baisse significative des TPT. L'augmentation des TPT dans le solvant EtOH_{40%} pourrait être attribuée à l'augmentation de la polarité du solvant éthanol dû à l'ajout d'une quantité adéquate d'eau facilitant une extraction efficace des composés phénoliques et notamment ceux sous forme glycosylée [58]. Plusieurs études ont rapporté dans la littérature que la polarité du solvant a une influence significative sur la récupération des composés bioactifs tels que les composés phénoliques [123, 166]. Boeing et al. (2014) [167] dans leurs travaux ont rapporté que l'extraction des composés phénoliques ainsi que de leur propriété antioxydante sont significativement liées à la combinaison des solvants d'extraction. Nous avons observé que le mélange éthanol-eau (40/60 ; v/v) a enregistré les meilleures TPT comparativement à celles obtenues avec de l'éthanol pur et l'eau distillée. Ceci pourrait être dues à une augmentation de la solvation des composés phénoliques du faite de la présence de l'eau dans le solvant. Cela implique que l'utilisation d'un solvant binaire (à proportion adéquate) favorise donc l'extraction d'un large gamme des composés phénoliques [167, 168].

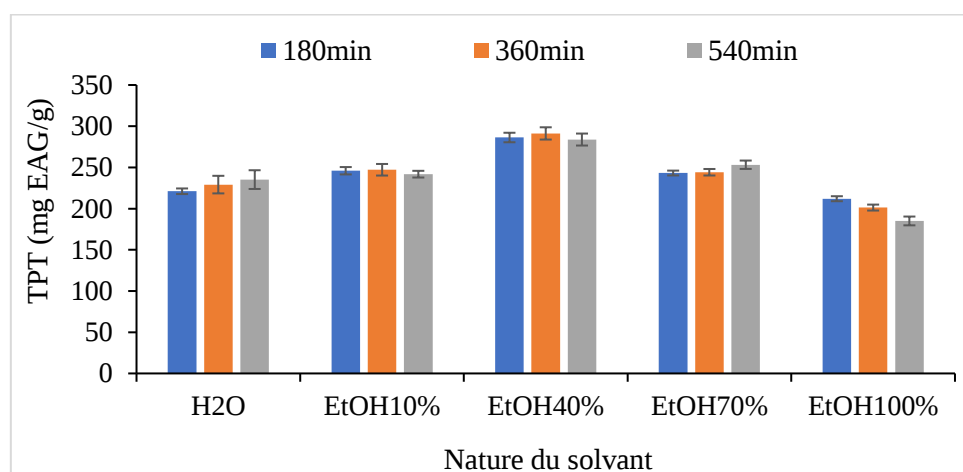


Figure 30. Teneurs en phénoliques totaux (TPT) en fonction de la composition du solvant et de la durée d'extraction

II.2.3. Effets du temps et de la proportion en éthanol sur les teneurs en flavonoïdes totaux

Le graphique de la Figure 31 présente les TFT obtenues dans les différents extraits. Il a été remarqué qu'à l'exception des extraits aqueux, le facteur temps n'exerce qu'une faible influence sur l'extraction des TFT contrairement à la variation de la proportion en éthanol. Plus grande est la proportion en éthanol, la solubilité des TFT augmente dans le solvant d'extraction. Avec une teneur moyenne en TFT d'environ 80 mg EQ/g d'extrait avec de l'EtOH_{10%}, cette teneur a augmenté de façon significative atteignant une teneur moyenne maximale d'environ 250 mg EQ/g d'extrait lorsqu'on utilise de l'éthanol pur (EtOH_{100%}) comme solvant d'extraction. Plusieurs auteurs ont aussi relevé une forte dépendance des TFT dans les extraits en fonction de la proportion en éthanol utilisée dans le solvant d'extraction [152, 154, 169].

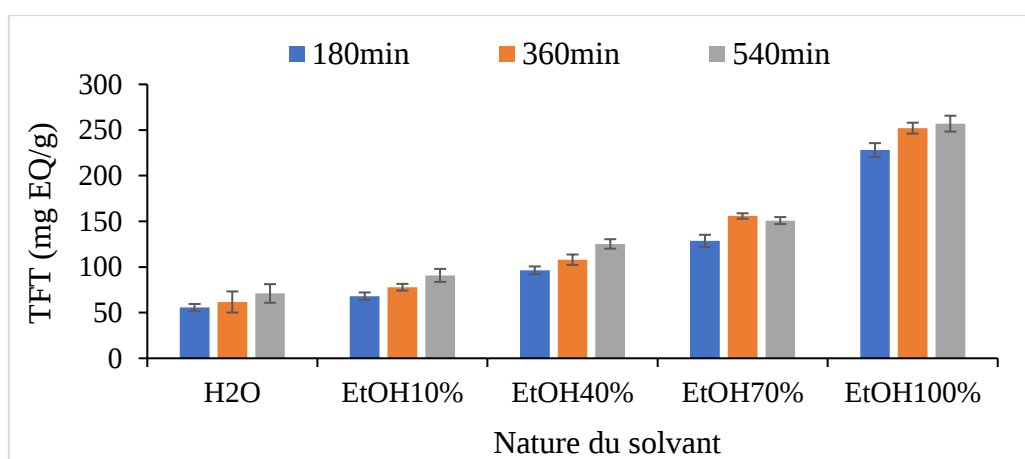


Figure 31. Teneurs en flavonoïdes totaux (TFT) en fonction du solvant et de la durée d'extraction

II.2.4. Effets de la proportion en éthanol sur l'activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante a porté sur les extraits obtenus après 360 min d'extraction dans les différents solvants utilisés (H₂O, EtOH_{10%}, EtOH_{40%}, EtOH_{70%} et EtOH_{100%}). Les courbes de la Figure 32 indiquent que tous les extraits ont significativement inhibé l'action du radical libre DPPH et ont également présenté de puissants pouvoirs réducteurs (FRAP).

Les résultats ont montré que l'extrait H₂O possède des TPT moyennes et des TFT les plus faibles. De même, les résultats indiquent également que l'extrait EtOH_{100%} a enregistré la plus faible valeur en termes de TPT mais la plus forte en TFT. Ces deux extraits (H₂O et EtOH_{100%}) ont montré les propriétés antioxydantes les plus faibles via les tests DPPH et FRAP comparativement aux extraits obtenus à partir du mélange de solvant éthanol-eau. Ce qui

voudrait dire que le pouvoir antioxydant des extraits ne semble pas lié uniquement à la seule présence des flavonoïdes, mais à une synergie entre l'ensemble des composés phénoliques présents dans les extraits notamment les acides phénoliques et des tanins, présents en abondance dans les extraits de *E. camaldulensis* et qui possèdent également des propriétés antioxydantes.

Les extraits préparés dans l'EtOH_{40%} et EtOH_{70%} ont été les plus actifs sur les radicaux DPPH en présentant des IC₅₀ respectives de 39,4 µg/mL et 42,4 µg/mL. Pour le test de réduction des ions ferriques, l'activité la plus intense a été observée avec les extraits à l'EtOH_{70%} suivi des extraits à l'EtOH_{40%}. Ces propriétés antioxydantes enregistrées pourraient être attribuées à la richesse des extraits en composés bioactifs notamment des TFT et des TPT.

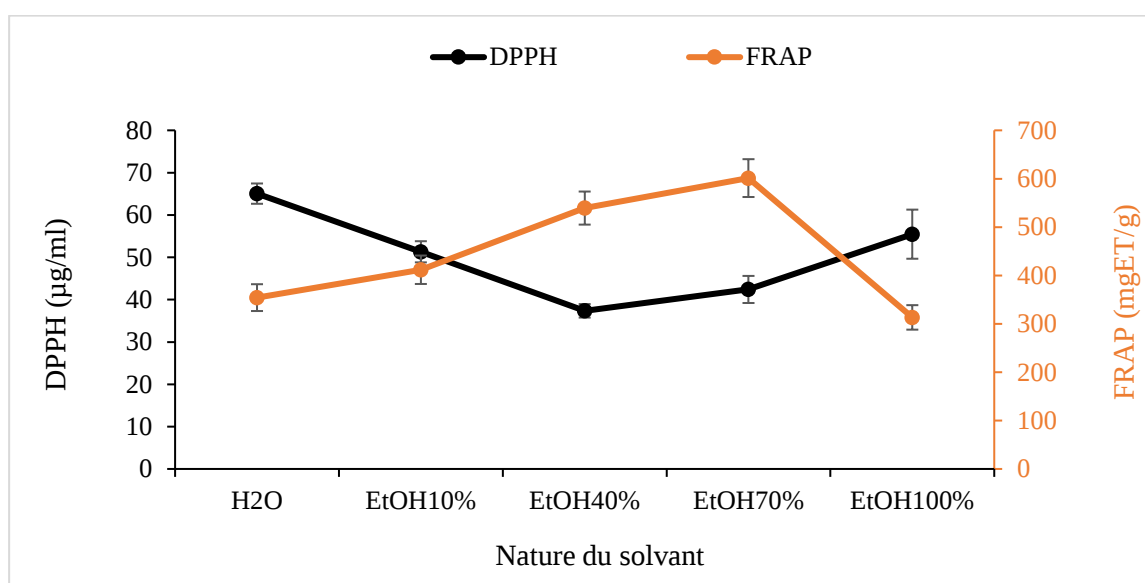


Figure 32. Activité antioxydante (DPPH & FRAP) des extraits

II.3. Identification des niveaux des facteurs d'extraction des composés bioactifs de *E. camaldulensis*

Afin de déterminer les niveaux des facteurs pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, l'approche conventionnelle classique a été utilisée. Ainsi, l'EtOH_{70%} et la poudre de l'espèce *E. camaldulensis* ont été retenus pour cette étude. Elle a consisté à étudier l'influence d'un seul facteur à la fois (le ratio liquide-solide par exemple) sur les réponses mesurées (rendements, TPT et TFT). La même expérience a été conduite avec les facteurs température et temps.

II.3.1. Effet du ratio liquide-solide

La plage du ratio liquide-solide a été définie en préparant des extraits hydro-éthanoliques à partir de la poudre des feuilles de *E. camaldulensis* durant 6h à température ambiante et sous agitation permanente (300 rpm). Les ratios liquide-solide ont été variés : 5 mL/g ; 10 mL/g ; 15 mL/g et 20 mL/g (quantité du solvant/masse de poudre végétale). La Figure 33 présente les résultats obtenus en termes de rendement d'extraction, de TFT et de TPT par rapport à la variation du ratio liquide-solide utilisé. Ces graphiques indiquent une augmentation significative des rendements d'extraction, des TFT et des TPT lorsque le ratio liquide-solide passe de 5 mL/g à 15 mL/g. Cependant, une faible variation ($p>0,05$) des réponses a été observée à partir du ratio liquide-solide 15 mL/g à 20 mL/g. Les graphiques ont révélé d'une manière générale, que l'extraction des molécules bioactives dépend fortement du paramètre ratio liquide-solide comme cela a été précédemment mentionné dans la littérature. Cacace and Mazza, (2003) [170] ont montré que l'utilisation d'une quantité croissante de solvant améliore la diffusion des composés bioactifs, notamment celle des polyphénols. Ils ont mis en évidence une augmentation quasi linéaire des teneurs en polyphénols et en anthocyanes avec l'augmentation du ratio liquide-solide au cours de l'extraction. Ce phénomène serait dû à la modification des constantes de solubilité et d'équilibre sous l'effet du rapport liquide-solide entraînant un transfert maximal des composés [170]. Ainsi, la plage du ratio liquide-solide de 7,5 à 15 mL/g a été retenue pour l'étude de l'optimisation de l'extraction par la méthodologie de surface de réponse (MSR).

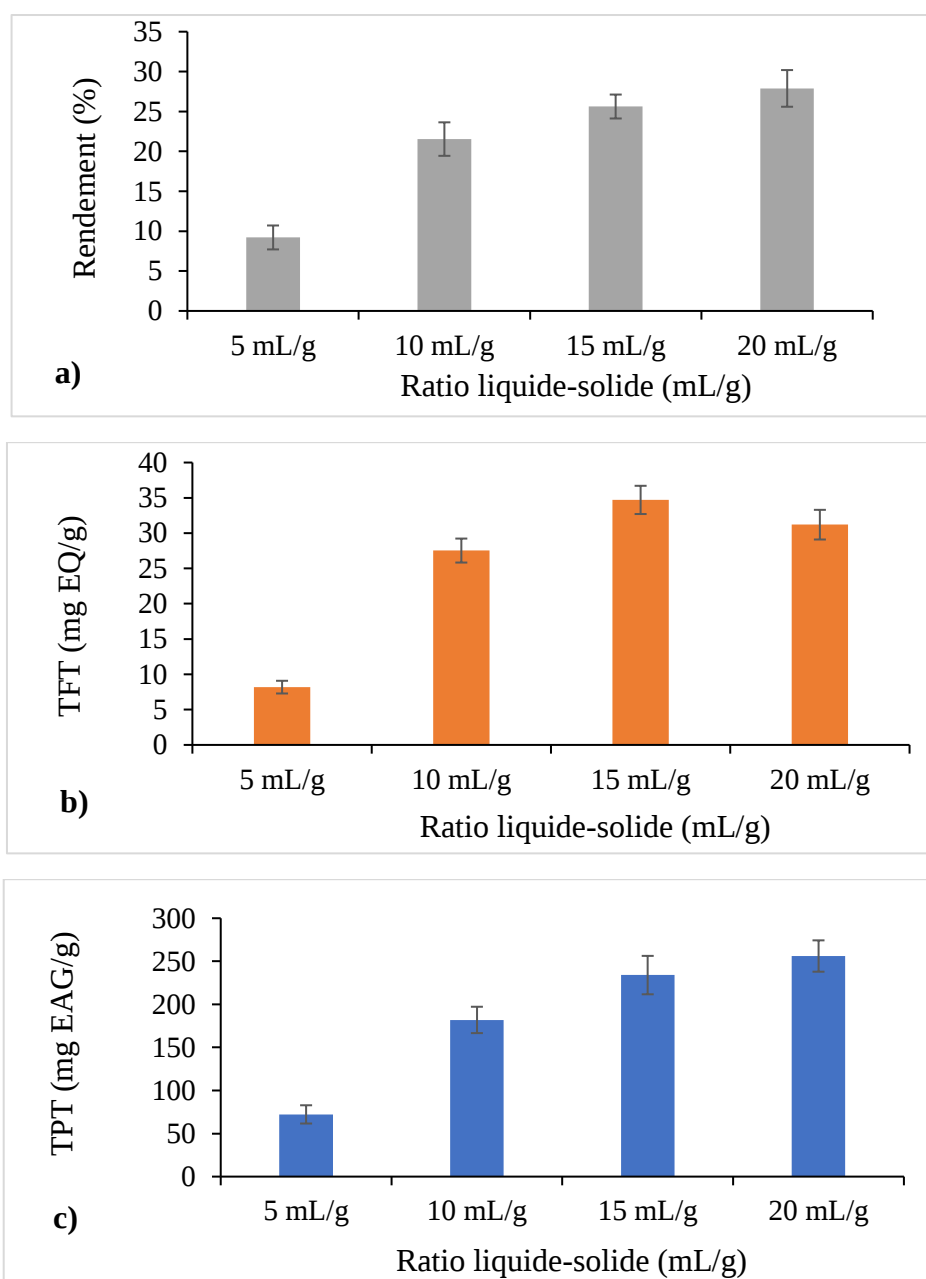


Figure 33. Effets de la variation du facteur ratio liquide-solide sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c)

II.3.2. Effet de la température d'extraction

La plage de température a aussi été définie en préparant des extraits hydro-éthanoliques à partir de la poudre des feuilles de *E. camaldulensis*. Les facteurs ratio liquide-solide et temps d'extraction ont été respectivement fixés à 10 mL/g et 6h. La température a été variée et 3 températures ont été choisies : $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 2^\circ\text{C}$ et $75 \pm 2^\circ\text{C}$. Les graphiques de la Figure 34 présentent les rendements d'extraction, les TFT et les TPT obtenus. Ces graphiques montrent que la variation de la température a un effet significatif ($p < 0,05$) sur les réponses mesurées. Les rendements d'extraction ont évolué de 17,8 % à 25°C à plus de 30% à 75°C . Des tendances

similaires ont aussi été observées avec les TPT qui ont varié de 211,3 mg EAG/g à 355,0 mg EAG/g sous des températures respectives de 25 °C à 75°C. En ce qui concerne les TFT, il a été observé une augmentation significative ($p < 0,05$) des teneurs entre 25°C à 50°C, suivi d'une importante diminution lorsque la température est passée à 75°C. L'augmentation des rendements et des TPT observées au cours de l'extraction sous l'effet de la température croissante se justifierait par la baisse de la viscosité du solvant sous l'influence de la température, facilitant ainsi sa pénétration dans des cellules végétales pour en extraire le maximum des extractibles [126, 169, 171]. De plus, des fortes températures entraînent une augmentation de la perméabilité des parois cellulaires de la matrice végétale induisant une augmentation du transfert de leurs contenus vers le milieu d'extraction [172].

Cependant, une baisse significative ($p < 0,05$) des TFT a été constatée lorsque la température a atteint 75°C. Cette baisse pourrait être associée à une dégradation probable de certaines molécules sous l'effet de la température. En effet, de nombreux travaux ont rapporté une forte sensibilité de certaines familles de flavonoïdes telles que les anthocyanidines et les flavan-3-ols à des températures relativement élevées [122, 170, 173–175]. Cacace et Mazza, (2003) [170] dans leurs travaux avaient aussi constaté une baisse significative des teneurs en anthocyanes lorsque la température était supérieure à 35°C. Ils ont montré que cette diminution pouvait atteindre environ 70% pour les anthocyanes, et 54% pour l'ensemble des composés phénoliques lorsque la température d'extraction atteint 74°C.

La plage de température adéquate de 26 à 60°C a été retenue pour le processus d'optimisation de l'extraction par la MSR.

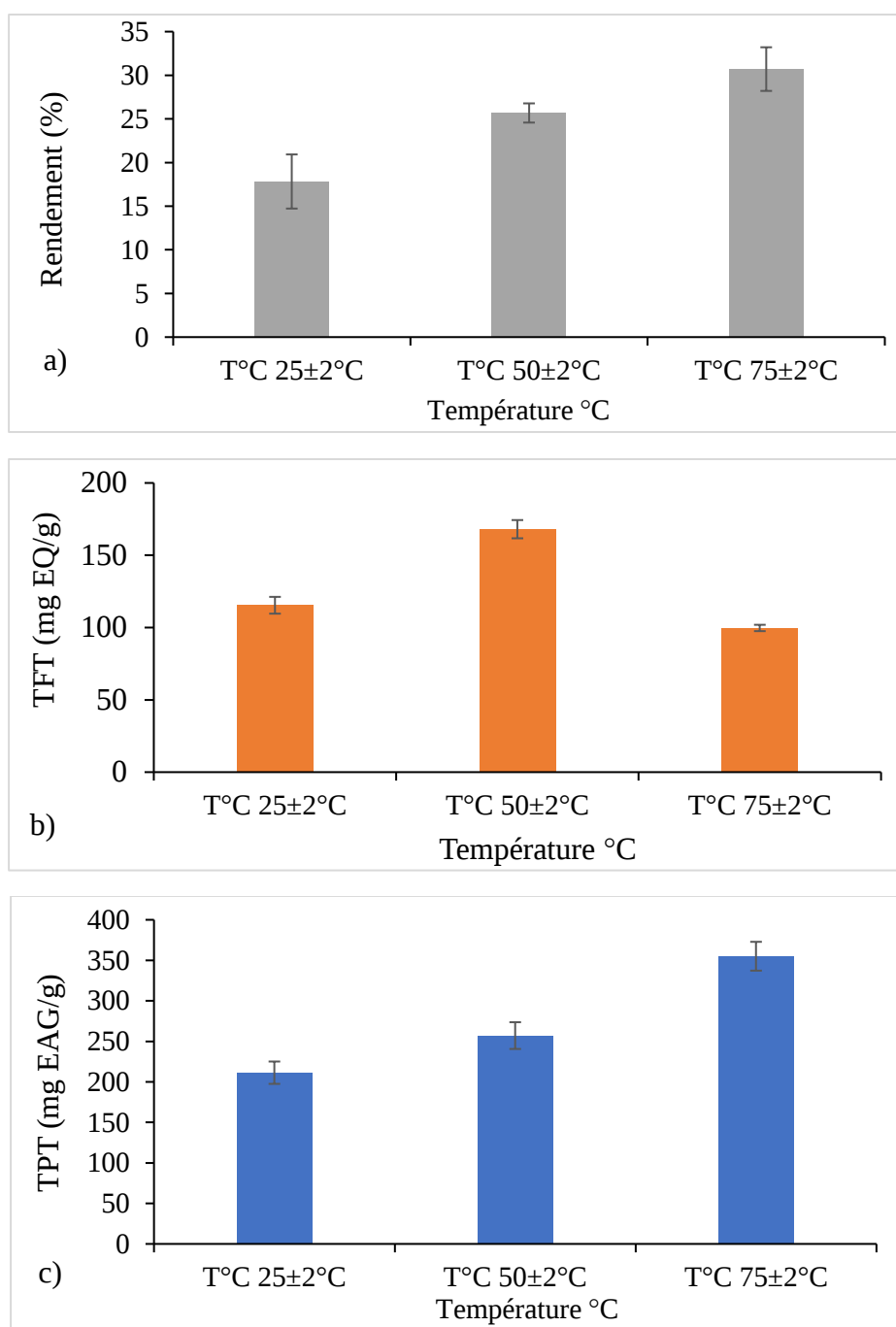


Figure 34. Effets de la variation de la température sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c)

II.3.3. Effet du temps d'extraction

L'influence du temps d'extraction des composés bioactifs a été étudiée en variant la durée d'extraction de 3h à 24h. Les extraits ont été préparés sous agitation permanente (300 rpm), à température ambiante et en utilisant un ratio liquide-solide de 10 mL/g. Les graphiques de la Figure 35 indiquent respectivement les rendements d'extraction, les TFT et les TPT obtenus. De ces résultats, on note une légère augmentation des rendements d'extraction lorsque la durée

d'extraction augmente de 3h à 9h, puis au-delà on note une tendance quasi constante. Quant aux TFT, il a été observé une augmentation significative ($p < 0,05$) des teneurs entre 3h à 6h d'extraction. La teneur la plus élevée était environ de 170,2 mg EQ/g d'extract et a été enregistrée au bout de 24h d'extraction. Par ailleurs, le temps d'extraction n'a induit aucune influence significative sur les TPT enregistrées. Les résultats montrent que l'extraction des TPT est maximale au bout de 3h.

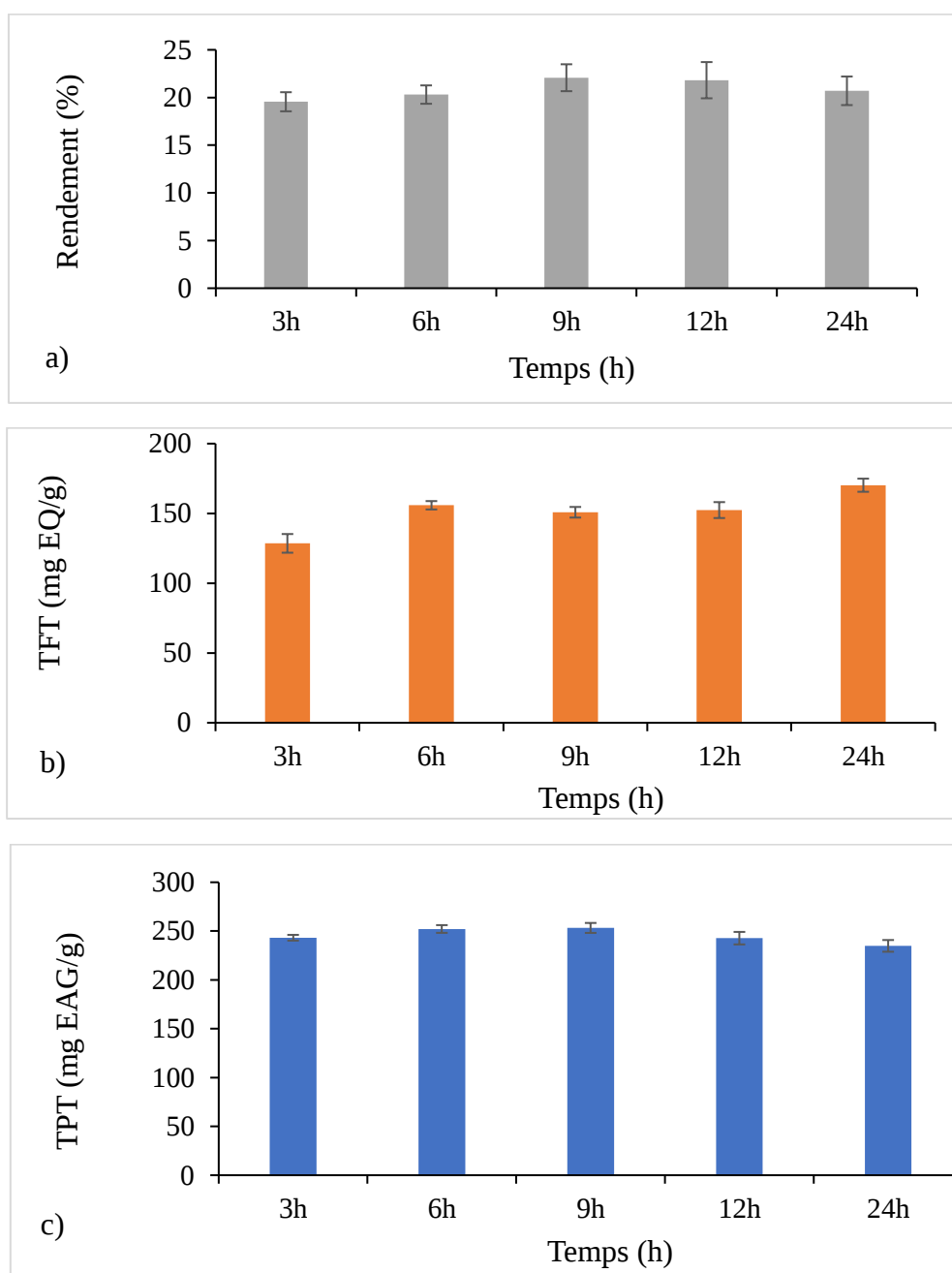


Figure 35. Effets de la variation du facteur temps sur le rendement d'extraction (a), la TFT (b) et la TPT (c)

Conclusion

La caractérisation des poudres des feuilles de EC et de CC a révélé que les taux d'humidité, la teneur en matière volatile et les teneurs en cendres totales sont de même ordre de grandeur que celles de la plupart des biomasses.

Dans un second temps, l'étude a permis de déterminer le solvant d'extraction adéquat des composés phénoliques des feuilles de EC. En effet, le mélange éthanol-eau 70% a permis d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction, des meilleures TPT ainsi que des propriétés antioxydantes les plus élevées.

Enfin, l'influence des variables tels que le ratio liquide-solide, la concentration du solvant en éthanol, la température et la durée d'extraction sur la récupération des composés phénoliques ainsi que le pouvoir antioxydant des extraits a été étudiée. Les plages des variables indépendantes clés ont été définies et seront par la suite utilisées pour une étude d'optimisation à l'aide d'un plan d'expérience.

***Chapitre 3 : Optimisation de l'extraction des
composés phénoliques des feuilles de Eucalyptus
camaldulensis Dehnh. et de Cymbopogon citratus
(DC.) Stapf***

Chapitre 3 : Optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. et de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

Introduction

L'objectif principal de cette partie de notre travail est d'optimiser l'extraction des composés phénoliques des feuilles de deux plantes, *E. camaldulensis* et de *C. citratus* en appliquant la méthodologie de surface de réponse (MSR). En effet, contrairement à l'approche d'extraction conventionnelle classique, la MSR a l'avantage d'étudier simultanément les effets simultanés de plusieurs variables indépendantes sur une ou plusieurs variables réponses. En nous basant sur les résultats du chapitre précédent, les trois variables suivantes, à savoir la proportion d'éthanol dans le solvant d'extraction, la vitesse d'agitation et la taille des particules (de la biomasse) ont été respectivement fixées à 70/30 v/v, 300 rpm et $\varnothing \leq 800 \mu\text{m}$.

Trois autres variables indépendantes (le ratio liquide-solide, la température et le temps d'extraction) seront étudiées simultanément pour optimiser l'extraction des composés bioactifs. L'efficacité de l'extraction sera quantifiée via les mesures des rendements d'extraction, des teneurs en composés phénoliques totaux (TPT) et des teneurs en composés flavonoïdes majoritaires, ainsi que par la détermination de l'activité antioxydante des extraits, via la mesure de la capacité anti-radicalaire (DPPH) et du pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). Enfin, l'exploitation des données obtenues devrait permettre de définir pour chacune des deux plantes étudiées, les conditions spécifiques d'extraction optimale des composés phénoliques qu'elles renferment.

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel

L'optimisation a concerné les deux espèces de plantes étudiées à savoir *Eucalyptus camaldulensis* et *Cymbopogon citratus*.

Le matériel de laboratoire utilisé est présenté dans la section I.1.2. du chapitre 2.

Dans ce chapitre, les teneurs en flavonoïdes majoritaires ont été déterminées par quantification en LC-MS par ajout d'un standard interne (quercétine) à la concentration de 0,01 mg/mL.

I.2. Description de la méthode d'optimisation de l'extraction par méthodologie de surface de réponse (MSR)

La méthode MSR a été appliquée pour déterminer les conditions optimales de 3 variables indépendantes qui influencent de manière significative l'extraction des composés bioactifs, en impactant le rendement d'extraction, les teneurs en phénoliques totaux (TPT), les teneurs en composés flavonoïdes majoritaires (TFM), ainsi que l'activité antioxydante (tests DPPH et FRAP). Le modèle de plan composite centré a été utilisé avec au total 20 essais dont 8 essais fournis par le plan factoriel complet (2^n), 6 essais fournis par le plan en étoile ($2 \times n$), et 6 essais ont été menés au centre du domaine d'étude qui est généralement dépendant de l'opérateur (n est le nombre de variables indépendantes étudiées). Les variables indépendantes étudiées sont le rapport liquide-solide (A ; mL/g), la température (B ; °C) et le temps d'extraction (C ; min). Toutes ces variables ont été codées à cinq niveaux de -1,68 ; -1, 0, +1 ; +1,68 comme le montre le Tableau 2. Les résultats expérimentaux ont été traités à l'aide du logiciel Design-Expert 13 (version 13.0.5.0). Un modèle de régression polynomiale a été appliqué pour prédire les variables de réponse Eq. (2)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 2})$$

où Y est la variable réponse étudiée; β_0 , β_i , β_{ii} , et β_{ij} représentent respectivement les coefficients de régression pour les termes constant, linéaire, quadratique et l'interaction existant entre les variables indépendantes. X_i et X_j sont les valeurs codées des variables indépendantes.

Tous les extraits ont été préparés dans un solvant constitué d'un mélange éthanol-eau (70/30 ; v/v) sous agitation continue (300 rpm). Les extraits obtenus après filtration ont été centrifugés à 4000 rpm durant 5 minutes. Le surnageant récupéré a été évaporé à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif (Rotavapor R-300 BUCHI).

Tableau 2 : domaine d'étude avec les niveaux des paramètres codés et non codés

Symboles	Variables d'entrée	Niveaux des variables				
		-1,68	-1,00	0,00	+1,00	+1,68
A	Ratio liquide-solide (mL/g)	4,94	7,50	11,25	15,00	17,56
B	Température (°C)	26,48	35,00	47,50	60,00	68,52
C	Temps (min)	25,46	80,00	160,00	240,00	294,54

II. Résultats et discussion

II.1. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

II.1.1. Influence des variables indépendantes sur les réponses étudiées

II.1.1.1. Réponse 1 = rendement d'extraction

Les résultats de la MSR ont indiqué une variation des rendements d'extraction de 21,1% à 31,8% respectivement enregistrés pour des essais N°12 et N°17 (Tableau 3). Il a été remarqué que les trois variables indépendantes étudiées, à savoir le ratio liquide-solide, la température et le temps d'extraction, ont exercé des effets linéaires significatifs ($p < 0,05$; Tableau 4) entraînant une augmentation des rendements d'extraction des composés bioactifs. Ceci s'expliquerait par le fait qu'une quantité importante de solvant d'extraction augmente le transfert des composés bioactifs de la biomasse vers le milieu d'extraction tout en évitant le phénomène de saturation rapide du solvant. De plus, l'augmentation de la température a entraîné non seulement la diminution de la viscosité du solvant d'extraction mais aussi une augmentation de la perméabilité des parois cellulaire des matrices végétales [126, 172]. Ces phénomènes semblent favoriser la solubilité des composés bioactifs dans le milieu d'extraction [176, 177]. En ce qui concerne la durée de l'extraction, son augmentation a aussi influencé de façon significative ($p < 0,05$) les rendements d'extraction, mais de manière peu significative par rapport aux deux autres paramètres. Par contre, aucun effet significatif ($p > 0,05$) des termes quadratiques (A^2 , B^2 , C^2) et d'interactions ($A*B$, $A*C$, $B*C$) n'a été observé sur les rendements d'extraction (Figure 36). L'analyse du modèle de régression a présenté un bon coefficient de détermination $R^2=0,9179$ avec un R^2 ajusté=0,8440 (Tableau 5). La p-value du modèle est de $p=0,0004$ indiquant que l'adéquation avec le modèle prédit peut-être expliquée de manière significative

par les résultats expérimentaux. La différence entre le R^2 ajusté et le R^2 prédit étant inférieure à 0,2, le paramètre manque d'ajustement était non significatif ($p\text{-value}=0,6517>0,05$). Les effets d'interaction entre le rapport liquide-solide et la température (en gardant le temps d'extraction au centre) sur les rendements d'extraction sont illustrés sur les graphiques 3D de la Figure 41-a. Le modèle de régression mathématique développé est présenté par l'Equation (3) élaborée sur la base des valeurs codées et les termes ayant induit un effet significatif sur l'extraction :

Rendement d'extraction (%) : $26,33 + 2,34A + 2,23B + 0,8953C$. Eq. (3)

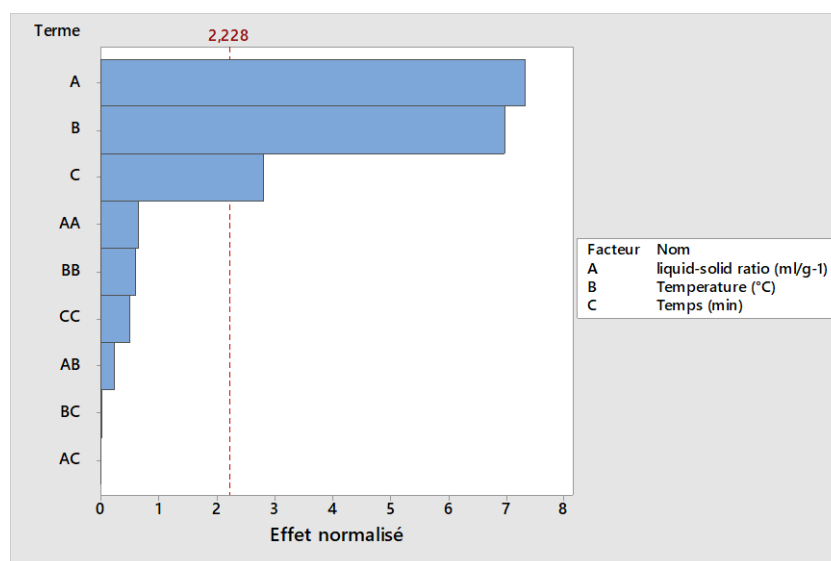


Figure 36. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse rendement (%)) ; $\alpha=0,05$

II.1.1.2. Réponse 2 = TPT

Les TPT mesurées ont varié entre 230,1 et 387,3 mg EAG/g d'extract et ont été respectivement obtenus lors des essais N°12 et N°17 (Tableau 3). Le diagramme de Pareto de la Figure 37 présente les termes ayant des effets significatifs (B ; A ; A^2 ; AB ; C^2 et C) et non significatifs (B^2 ; BC ; AC) sur la réponse TPT. Toutes les variables indépendantes ont induit des influences linéaires significatives ($p<0,05$; Tableau 4) et positives sur l'extraction des composés phénoliques. En ce qui concerne les termes quadratiques, il a été constaté que seulement ceux des facteurs ratio liquide-solide (A^2) et temps d'extraction (C^2) ont présenté des effets négatifs significatifs ($p<0,05$) sur la mesure TPT. Cela suggère qu'une augmentation significative de ces deux facteurs entraîne probablement la dégradation des composés phénoliques au cours de l'extraction. L'interaction entre les facteurs ratio liquide-solide et température ($A*B$) est caractérisée par un effet synergique significatif ($p<0,05$) sur les TPT, indiquant une interdépendance entre ces deux variables. L'analyse ANOVA (Tableau 5) du modèle de

régression indique un coefficient de détermination de $R^2=0,9874$ montrant que ce modèle explique 98,74% de la variabilité totale de la réponse TPT. Le $R^2_{aj.}=0,9761$ obtenu signifie que 97,61% de la variabilité de la réponse sont directement liés aux paramètres étudiés (A, B, C). Ensuite, une valeur $p<0,0001$ du modèle de régression et un manque d'adéquation non significatif ($p>0,05$) impliquent que le modèle est significatif à 5% de probabilité. Le graphique de la Figure 41-b illustre les effets combinés des facteurs ratio liquide-solide (A) et température (B) sur l'extraction des composés phénoliques. L'équation (4) présente le modèle de régression obtenu sur la base des résultats expérimentaux avec des valeurs codées des variables indépendantes.

$$\text{TPT (mg EAG/g)} = 325,21 + 29,38A + 32,22B + 8,61C - 15,43A^2 - 9,08C^2 + 13,05AB. \text{ Eq. (4)}$$

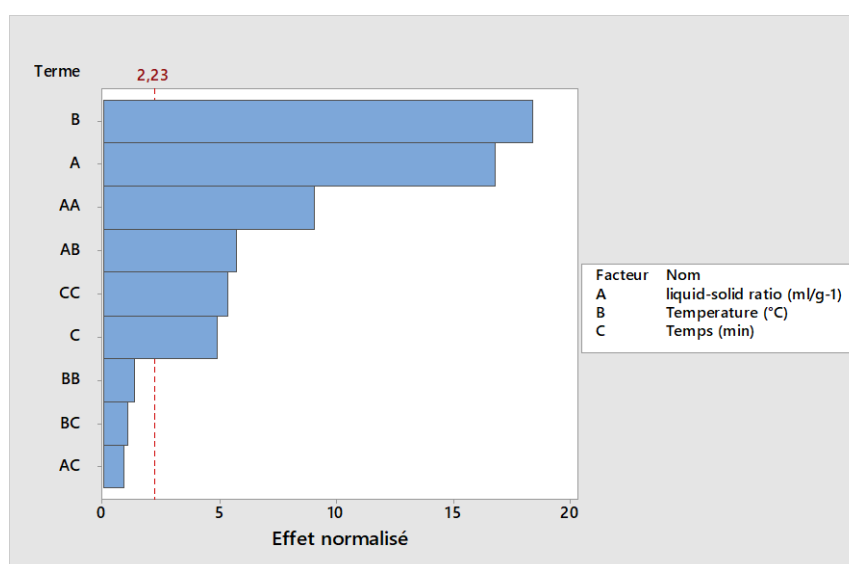


Figure 37. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TPT (mg EAG/g) ; $\alpha=0,05$)

II.1.1.3. Réponse 3 = TFM.

La variable réponse TFM (teneurs en flavonoïdes majeurs) a été obtenue par quantification LC-MS des composés flavonoïdes les plus abondants identifiés dans les extraits (Tableau 3). Les extraits des essais N°10 et N°4 ont présenté respectivement les concentrations totales les plus élevées ($25,6\pm0,9$ mg/g) et les plus faibles ($17,7\pm0,6$ mg/g). La faible teneur en composés flavonoïdes dans cet extrait N°4 pourrait s'expliquer par une dégradation partielle sous l'effet de la température d'extraction relativement élevée ($68,5^\circ\text{C}$). En effet, certains travaux ont rapporté qu'une température d'extraction trop élevée provoque la dégradation des composés flavonoïdes thermosensibles, notamment les anthocyanes, les flavan-3-ols et les aglycones flavonoïdes [173], [178], [179].

De plus, l'analyse ANOVA a montré un modèle significatif (p -value=0,0201) avec un coefficient de détermination de $R^2=0,78$ indiquant qu'environ 78% de la variabilité totale de cette réponse (TFM) peut être expliquée par le modèle obtenu (Tableau 5). Selon le diagramme de Pareto (Figure 38), seuls les termes B^2 , A^2 et A ont été mesurés significatifs pour l'extraction des flavonoïdes ($p<0,05$; Tableau 4) et, parmi eux, le facteur ratio liquide-solide a induit un effet linéaire (A) significatif avec un coefficient positif indiquant une amélioration des teneurs en principaux composés flavonoïdes (TFM). Par contre, l'effet contraire a été observé avec les termes quadratiques (B^2 et A^2). Cela pourrait s'expliquer par une baisse des teneurs en composés flavonoïdes dans les extraits lorsque ces deux facteurs augmentent au-delà d'un certain seuil. Aucun effet significatif ($p>0,05$) n'a été observé suite aux interactions entre les facteurs ($A*B$; $A*C$ et $B*C$).

Par ailleurs, pour ce modèle, la différence entre le R^2 ajusté et le R^2 prédit est supérieure à 0,2 (Tableau 5). Il est donc possible que ce modèle comporte des valeurs aberrantes. Néanmoins, en se référant à la valeur de la précision adéquate (5,3163), qui est supérieure à 4, il est démontré que ce modèle peut être utilisé de manière adéquate dans le domaine d'étude défini pour prédire la récupération des principaux composés flavonoïdes [180]. En outre, l'analyse montre également un manque d'adéquation non significatif (valeur $F=0,6502$; valeur $p=0,6702$). Les plages d'extraction optimales de ces composés en fonction du ratio liquide-solide/température sont illustrées par les graphiques 3D de la Figure 41-c. L'équation (5) a été écrite en utilisant des valeurs codées et représente le modèle de régression mathématique basé sur les résultats expérimentaux de cette réponse :

$$\text{TFM} = 24,05 + 0,9624A - 0,9521A^2 - 1,68B^2. \quad \text{Eq. (5)}$$

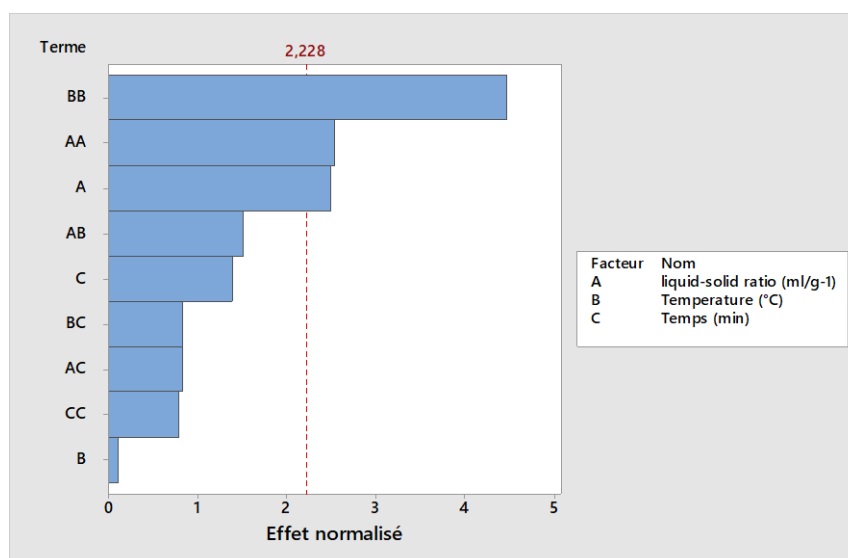


Figure 38. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TFM (mg EQ/g) ; $\alpha=0,05$)

II.1.1.4. Réponse 4 = DPPH.

Les données concernant l'effet des paramètres d'extraction sur la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH^{*} des extraits de *E. camaldulensis* sont présentées dans le Tableau 3. Tous les extraits préparés ont présenté relativement de bonnes activités antiradicalaires, comprises entre 10,78 et 39,64 $\mu\text{g/mL}$, valeurs respectivement obtenues pour les essais N°4 et le N°12 (Tableau 3). Le diagramme de Pareto (Figure 39) révèle que les termes significatifs sont essentiellement B, A, A², C² et B². L'activité antiradicalaire DPPH est influencée négativement par les effets linéaires des variables indépendantes A et B ($p<0,05$; Tableau 4). Une augmentation de ces paramètres entraîne probablement une détérioration significative du pouvoir antiradicalaire des extraits. Contrairement aux effets linéaires, une augmentation significative de l'activité antiradicalaire DPPH serait associée aux effets quadratiques (A² et C²) des variables indépendantes A et C, tandis que la variable température (B) indique toujours un effet quadratique négatif ($p<0,05$). Cela implique une dénaturation probable de certains composés antiradicalaires lorsque la température (B) du processus d'extraction augmente [176, 181]. En outre, aucune interaction entre les variables n'a affecté de manière significative l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des extraits. L'analyse ANOVA (Tableau 5) a montré un coefficient de détermination supérieur à 0,9 ($R^2=0,9599$; $R^2_{\text{adj.}}=0,9239$) avec une valeur $p=0,0001$ et une absence d'ajustement non significatif (valeur $p=0,5834>0,05$). L'influence combinée du ratio liquide-solide (A) et de la température (B) sur l'activité antiradicalaire DPPH est présentée par les graphiques de la Figure 41-d.

Les composés antioxydants standards tels que la quercétine et le trolox ont été testés dans les mêmes conditions et les valeurs de IC_{50} étaient respectivement de 2,95 et 14,18 $\mu\text{g/mL}$. Il a été constaté de façon générale que la plupart des extraits riches en composés phénoliques ont induit un pouvoir antiradicalaire relativement plus élevé par rapport à ceux ayant présenté des teneurs faibles en TPT. Par conséquent, le pouvoir antiradicalaire de DPPH observé pourrait être attribué à la présence des composés phénoliques dans ces extraits. En effet, les composés phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide ellagique isolés des extraits des feuilles d'eucalyptus ont présenté des propriétés antiradicalaires DPPH supérieures à celles des antioxydants synthétiques standards, notamment l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) [182]. Le polynôme de second ordre est présenté par l'équation (6) écrite sur la base des valeurs codées :

$$\text{DPPH } (\mu\text{g/mL}) = 23,32 - 4,57A - 5,71B + 2,79A^2 - 1,38B^2 + 1,50C^2. \quad \text{Eq.(6)}$$

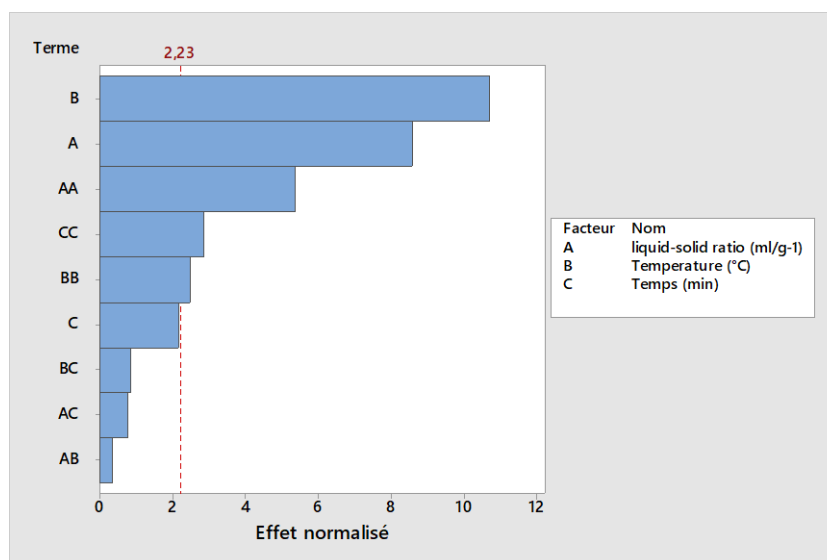


Figure 39. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse DPPH ($\mu\text{g/mL}$) ; $\alpha=0,05$)

II.1.1.5. Réponse 5 = FRAP

Les extraits bruts des feuilles de *E. camaldulensis* ont également présenté des activités réductrices des ions ferriques à des degrés variables. Les valeurs expérimentales vont de 560,8 à 777,4 mg ET/g d'extrait. Ces valeurs correspondent respectivement aux essais N° 18 et N° 11 (Tableau 3). Le diagramme de Pareto (Figure 40) obtenu pour cette réponse indique que tous les termes ont contribué de manière significative à cette réponse, excepté l'effet de l'interaction entre les facteurs B et C. La capacité des extraits à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) a été significativement influencée ($p<0,05$; (Tableau 4)) par les effets linéaires

des paramètres comme le ratio liquide-solide (A) et la température (B), conduisant à une amélioration de l'activité réductrice des extraits. En ce qui concerne les termes quadratiques (A^2 , B^2 , C^2), des effets négatifs significatifs ($p < 0,05$) sur le pouvoir réducteur des extraits ont été observés pour chacune des variables indépendantes étudiées (Tableau 4). Par conséquent, une augmentation importante des variables indépendantes causerait une détérioration probable de l'activité réductrice FRAP.

Par ailleurs, l'interaction entre les facteurs A et B ont entraîné des effets synergiques significatifs ($p < 0,05$) sur le pouvoir réducteur. En revanche, l'effet inverse est observé avec l'interaction entre les facteurs A et C (Tableau 4). Un coefficient de détermination $R^2 = 0,9854$ est obtenu par analyse ANOVA avec une $p\text{-value} = 0,0001$ et une absence d'ajustement dont la $p\text{-value}$ est supérieure à 0,05 (Tableau 5). Ces analyses statistiques suggèrent une meilleure adéquation entre la variable réponse FRAP et le modèle de régression obtenu et indiquent également que seulement moins de 2% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle [183]. Les effets des interactions entre le ratio liquide-solide (A) et le facteur température (B) et ceux entre la température (B) et le facteur temps (C) sur l'activité réductrice du fer ferrique peuvent respectivement être observés sur les surfaces de réponse 3D des Figure 41-e et 41-f. L'équation (7) exprime le modèle polynomial du second ordre de la réponse FRAP sur la base des valeurs codées des variables indépendantes :

$$\text{FRAP (mg ET/g)} = 753,74 + 37,76A + 36,49B - 2,80C - 26,44A^2 - 44,52B^2 - 44,53C^2 + 30,99AB - 22,77AC. \quad \text{Eq. (7)}$$

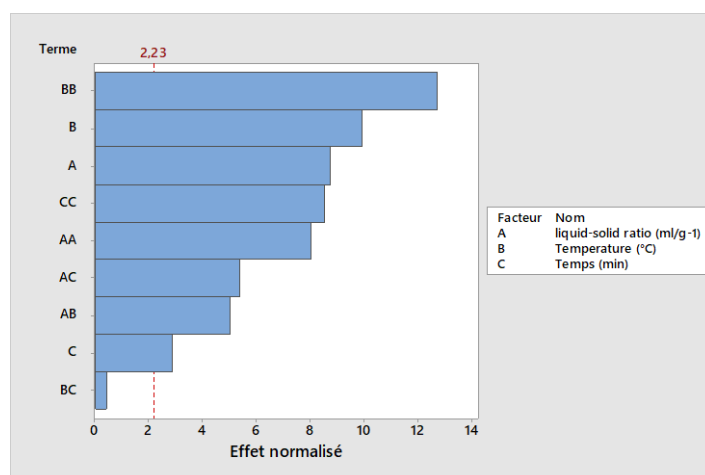


Figure 40. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse FRAP (mg µg/mL) ; $\alpha = 0,05$)

Tableau 3 : base de données avec les variables indépendantes et les variables réponses

Variables indépendantes				Réponses expérimentales / Réponses prédites									
Run	A	B	C	Rendement (%)		TPT (mg EAG/g)		TFM (mg/g)		DPPH (µg/mL)		FRAP (mg ET/g)	
				Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.
1	(0)	(0)	(0)	27,0	26,3	327,1	325,2	25,4	24,1	24,8	23,3	760,2	753,7
2	(0)	(-1,68)	(0)	21,8	23,1	271,3	264,5	19,9	19,2	29,1	29,3	570,1	566,5
3	(0)	(0)	(0)	26,2	26,3	322,1	325,2	22,0	24,1	21,7	23,3	757,2	753,7
4	(0)	(+1,68)	(0)	30,7	30,6	368,1	372,9	17,7	19,4	10,8	10,1	688,7	689,2
5	(-1)	(-1)	(+1)	23,4	22,6	252,7	253,9	19,0	18,8	38,4	38,7	618,8	622,2
6	(0)	(0)	(0)	25,7	26,3	325,1	325,2	24,4	24,1	22,4	23,3	767,4	753,7
7	(+1,68)	(0)	(0)	29,3	29,7	335,0	331,0	23,0	23,0	23,3	23,5	736,5	742,5
8	(-1)	(+1)	(+1)	26,9	26,9	295,1	297,3	22,1	21,3	27,5	26,5	617,4	618,7
9	(-1)	(+1)	(-1)	25,5	25,05	287,4	279,1	21,9	20,7	22,3	24,4	587,8	593,2
10	(0)	(0)	(0)	24,3	26,3	320,2	325,2	25,6	24,1	26,1	23,3	766,9	753,7
11	(+1)	(+1)	(-1)	30,0	29,9	359,9	359,9	22,4	21,9	15,6	15,8	777,4	776,3
12	(-1,68)	(0)	(0)	21,1	21,8	230,1	232,2	18,8	19,7	39,6	38,9	624,5	615,4
13	(+1)	(-1)	(-1)	26,2	25,3	275,2	274,4	24,0	24,2	25,1	26,5	626,0	626,9
14	(0)	(0)	(-1,68)	23,5	24,4	280,1	285,1	23,5	24,1	27,7	25,6	638,7	632,5
15	(+1)	(-1)	(+1)	27,5	27,1	280,9	290,6	20,9	21,4	30,6	28,9	593,4	590,2
16	(0)	(0)	(0)	28,0	26,3	332,1	325,2	22,2	24,1	24,2	23,3	744,2	753,7
17	(+1)	(+1)	(+1)	31,8	31,8	387,3	386,2	21,5	20,8	15,6	15,8	715,4	710,7
18	(-1)	(-1)	(-1)	21,6	20,8	243,4	245,8	19,9	19,9	33,9	34,1	560,9	567,8
19	(0)	(0)	(+1,68)	27,1	27,4	320,5	314,0	22,0	22,3	28,0	29,5	620,1	623,1
20	(0)	(0)	(0)	26,9	26,3	324,5	325,2	24,8	24,1	20,6	23,3	726,0	753,7

Exp. : réponses expérimentales ; Préd. : Réponses prédites ; Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne de trois essais.

Tableau 4 : coefficients des régressions polynomiales du second ordre avec analyse ANOVA du modèle

Réponses	Rendement (%)		TPT (mg EAG/g extrait)		TFM (mg/g)		DPPH (IC ₅₀ µg/mL)		FRAP (mg ET/g extrait)	
Termes	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value
Constant	26.33		325.21		24.05		23.32		753.74	
Linéaires										
A	2.34	<0.0001 ^a	29.38	< 0.0001 ^a	0.9624	0.0317 ^b	-4.57	<0.0001 ^a	37.76	<0.0001 ^a
B	2.23	<0.0001 ^a	32.22	< 0.0001 ^a	0.0447	0.9101	-5.71	<0.0001 ^a	36.49	<0.0001 ^a
C	0.8953	0.0187 ^b	8.61	0.0006 ^b	-0.5368	0.1942	1.16	0.0554	-2.80	0.4293 ^b
Quadratiques										
A ²	-0.2017	0.5311	-15.43	0.0001 ^a	-0.9521	0.0296 ^b	2.79	0.0003 ^a	-26.44	<0.0001 ^a
B ²	0.1925	0.5495	-2.29	0.2075	-1.68	0.0012 ^b	-1.28	0.0328 ^b	-44.52	<0.0001 ^a
C ²	-0.1557	0.6273	-9.08	0.0003 ^b	-0.2980	0.4458	1.50	0.0162 ^b	-44.53	<0.0001 ^a
Interactions										
A*B	0.1037	0.8087	13.05	0.0002 ^b	-0.7588	0.1631	-0.2513	0.7258	30.99	<0.0001 ^a
A*C	-0.0013	0.9977	2.01	0.3992	-0.4188	0.4254	-0.5362	0.4591	-22.77	0.0004 ^a
B*C	0.0087	0.9837	2.51	0.2977	0.4213	0.4227	-0.6113	0.4007	-7.21	0.1355
C.V. (%)	4.50		2.10		6.46		7.76		1.86	
Adeq. precision	13.1124		33.7254		5.3163		20.6855		23.6103	

A : ratio liquide-solide ratio ; B : Température ; C : Temps ; Significativité : (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,05$; C.V: Coefficient de variation (%).

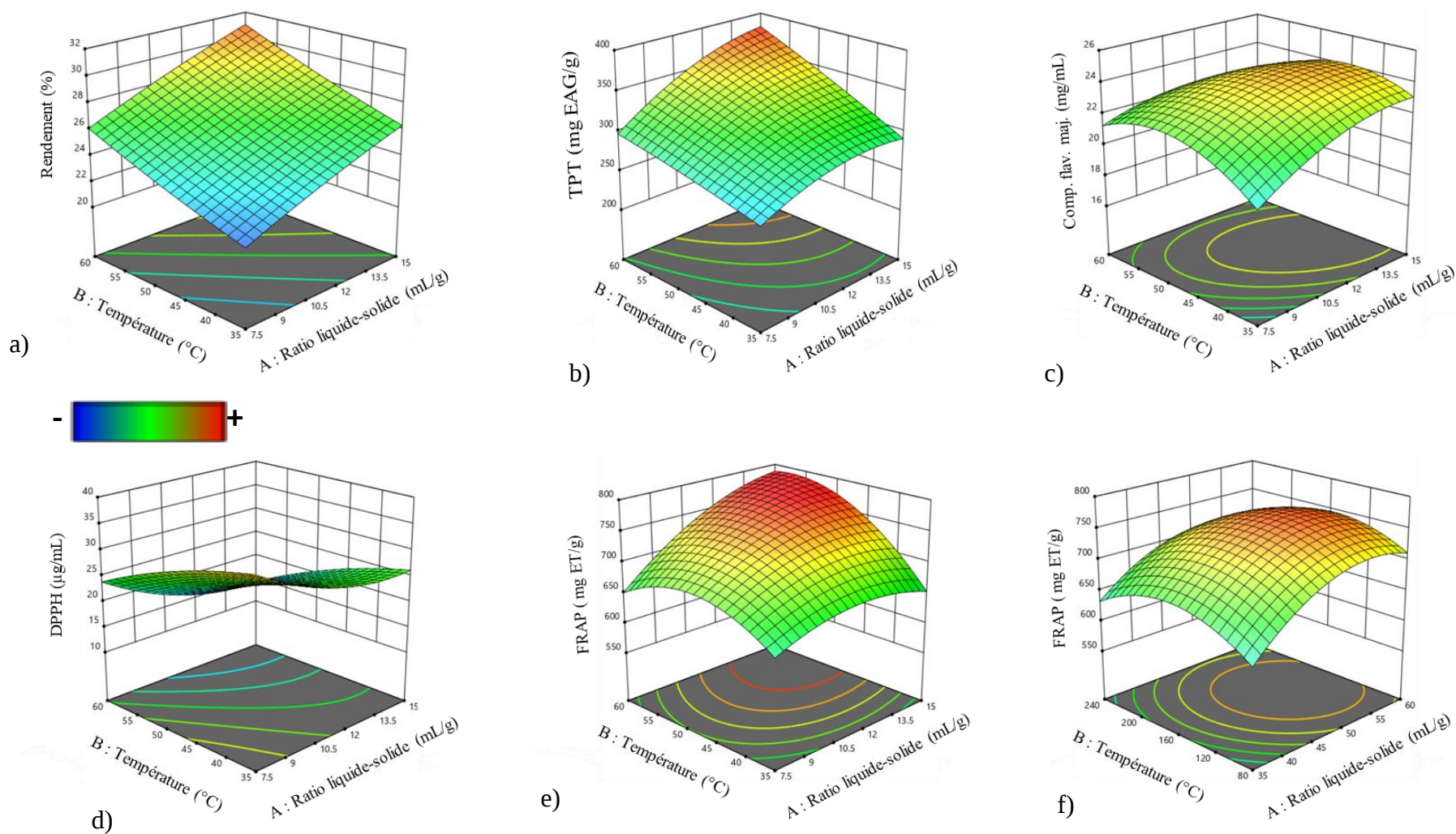


Figure 41. Surfaces de réponse 3D avec le facteur temps (C) fixé au centre (a- Rendement ; b- TPT ; c- Composés Flav. Majoritaires (TFM) ; d- DPPH ; e et f- FRAP)

Tableau 5 : analyse ANOVA des modèles de régression

Modèles de régression	R ² (%)	R ² aj. (%)	R ² préd. (%)	F-value du modèle	p-value du modèle	Manque d'ajust. (F-value)	Manque d'ajust. (p-value)
Rendement	91,79	84,40	67,54	12,42	0,0002 ^a	0,6925	0,6517 ^c
TPT	98,74	97,61	91,72	85,05	< 0,0001 ^a	3,81	0,0841 ^c
TFM	78,42	59,00	0,1648	4,04	0,0201 ^b	0,6502	0,6702 ^c
DPPH	95,99	92,39	82,34	26,62	0,0001 ^a	0,8203	0,5834 ^c
FRAP	98,54	97,24	96,18	75,25	< 0,0001 ^a	0,2387	0,9290 ^c

Significativité : (a) $p < 0.001$; (b) $p < 0.05$; Non-significatif : (c) $p > 0.05$

- ✚ R² , coefficient de détermination : mesure l'adéquation entre les modèles de régression et la distribution des données observées.
- ✚ R²aj., coefficient de détermination ajusté : indique le pourcentage de la variation de la variable dépendante qui est expliqué collectivement par toutes les variables indépendantes ($R^2_{aj.} \leq R^2$).
- ✚ R²préd., coefficient de détermination prédit : indique dans quelle mesure un modèle de régression prédit les réponses pour de nouvelles observations.

II.1.2. Détermination des conditions optimales d'extraction et vérification expérimentale

Dans cette étude, le modèle expérimental obtenu pour chacune des réponses étudiées révèle un coefficient de détermination R² compris entre 0,78 à 0,98, donc relativement proche de 1 (Tableau 5). Cela signifie que ces modèles semblent assez représentatifs et sont adaptés pour la prédiction des réponses étudiées dans le domaine d'étude. En outre, il a été noté que tous les modèles de régression ont présenté un manque d'adéquation non significatif ($p > 0,05$). Les conditions optimales ont été déterminées en cherchant la désirabilité composite correspondant à la moyenne géométrique de la désirabilité individuelle pour chaque réponse [180]. L'optimisation vise à trouver la meilleure combinaison entre les facteurs indépendants ratio liquide-solide, température et temps d'extraction permettant l'extraction optimale des composés bioactifs (polyphénols & flavonoïdes). Pour ce faire, l'objectif a été de minimiser toutes les

variables indépendantes des points de vue impacts économique et environnemental (consommation de faible quantité de solvant, d'énergie et sur une période d'extraction courte), tandis que les variables réponses ont été maximisées à l'exception de la réponse activité « antiradicalaire DPPH ». En effet, l'activité antiradicalaire DPPH d'une substance est plus efficiente lorsque la valeur de IC50 est la plus faible possible. Ainsi, l'activité antiradicalaire DPPH a donc été minimisée. Tous les critères d'optimisation appliqués sont résumés dans le Tableau 6. Les paramètres d'entrée ainsi obtenus sont 12,4 mL/g pour le ratio liquide-solide avec une température de 50,4°C et un temps d'extraction de 124,8 min.

Tableau 6 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponse

Variables	Cible	Limite inférieure	Limite supérieure	Poids inférieur	Poids supérieur	Importance
A : Ratio liquide-solide	minimiser	7,5	15	1	1	1
B : Température	minimiser	35	60	1	1	1
C : Temps	minimiser	80	240	1	1	1
Rendement	maximiser	21,06	31,81	1	1	1
TPT	maximiser	230,05	387,25	1	1	3
TFM	maximiser	17,72	25,64	1	1	3
DPPH	minimiser	10,78	39,64	1	1	1
FRAP	maximiser	560,88	777,43	1	1	1

Sous ces conditions optimales d'extraction, une teneur en TPT de 342,8±11,1 mg EAG/g d'extrait (Tableau 7) soit environ 92,7 mg EAG/g de poudre a été déterminée. Les résultats des analyses statistiques révèlent qu'il n'y a pas de différence significative dans un intervalle de confiance au seuil de 95% entre la valeur expérimentale en TPT et celle proposée par le modèle théorique.

Les résultats de plusieurs investigations ont montré que les propriétés biologiques des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* peuvent être associées à la présence de divers ingrédients phytochimiques notamment les composés phénoliques [42, 92, 184, 185] Cela a donc suscité l'application de plusieurs stratégies efficaces permettant d'extraire ces composés bioactifs. Le Tableau 8 présente des conditions optimales d'extraction des TPT de *E. camaldulensis* obtenues dans cette étude et celles disponibles dans la littérature. En effectuant une décoction (extraction conventionnelle) des feuilles de *E. camaldulensis*, Sourabié et al. (2020) [186] ont obtenu une teneur en TPT de 176,4 mg EAG/g dans les conditions de ratio liquide-solide 10 mL/g, pendant

30 min et en utilisant un solvant hydroalcoolique. De plus, les travaux réalisés par Ashraf et al. (2015) [187] avaient rapporté des TPT de l'ordre de 148,7 mg EAG/g obtenues dans les conditions d'extraction de ratio liquide-solide 10 mL/g, durant 6h et sous agitation de 350 rpm en utilisant du méthanol comme solvant d'extraction. Dans notre étude, la méthode MSR appliquée a permis non seulement de réduire considérablement le temps d'extraction mais et surtout les TPT ont été optimisées dans les extraits comparativement aux résultats de Sourabié et al. (2020) [186] et de Ashraf et al. (2015) [187]. D'autre part, en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons des feuilles *E. camaldulensis*, Wong-Paz et al. (2015) [121] ont prédit une teneur maximale en composés phénoliques à 13,91 mg/g, une valeur inférieure à celle obtenue dans notre étude. Elle a été obtenue dans des conditions optimales d'extraction à l'éthanol 35%, avec un ratio liquide-solide de 12 mL/g et un temps d'extraction de 46,8 min. Cette divergence observée dans les résultats pourrait s'expliquer par la différence des méthodes d'extraction, des paramètres optimisés ou de l'environnement de collecte des échantillons.

Tableau 7 : vérification et confirmation des conditions optimales d'extraction

Réponses	Rendement (%)	TPT (mg EAG/g)	TFM (mg/mL)	DPPH (µg/mL)	FRAP (mg ET/g)
Expérimentales	28,0±1,8	342,8±11,1	24,7±2,0	21,1±2,6	774,2±39,7
Prédites	27,2±1,2	335,2±6,5	24,3±1,4	20,7±2,0	768,0±12,6
IC à 95%	[24,3 ; 30,0]	[319,7 ; 350,7]	[20,9 ; 27,7]	[15,9 ; 25,4]	[737,8 ; 798,1]

IC : intervalle de confiance

Tableau 8 : comparaison des résultats d'optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *E. camaldulensis*

Méthodes	Solvants	Conditions d'extraction	Rendement (%)	TPT (mg EAG/g)	DPPH (µg/mL)	Références
Macération	MeOH	10 mL/g; 6h; 350 rpm	--	148,7	89,1	[187]
Macération	MeOH-Eau (3/7; v/v)	10 mL/g; 24h	22,0	79,4	--	[185]
Macération	Acetone (70%)	10 mL/g; 72h	--	46,6	--	[92]
Décoction	Eau	10 mL/g; 1h	31,1	171,0	27,8	[188]
Décoction	Eau	10 mL/g; 10 min	17,0	161,2	31,7	[189]
Décoction	Hydroalcoolique	Ratio 10 mL/g ; 30 min ; T°éb.;	---	176,4	---	[186]
Macération	MeOH (70%)	24 h; T°<40°C	--	0,11	--	[43]
MSR : UAE*	EtOH-Eau	12 mL/g; 46,8 min; 35%EtOH	14,9	13,9	--	[121]
MSR : macération	EtOH (70%)	12,4 mL/g; 50,4°C; 124,8 min	28,0	342,8±11,1	21,1±2.6	Notre étude

UAE (*) : extraction assistée par ultrasons ;MSR : méthodologie de surface de réponse ; MeOH : méthanol ; EtOH : éthanol

II.1.3. Corrélation entre les TPT et l'activité antioxydante (DPPH & FRAP)

Des corrélations positives ont été établies entre les teneurs en composés phénoliques (TPT) et l'activité antioxydante des extraits par régression linéaire (Figure 42). Des coefficients de corrélation de $R^2=0,80$ et $R^2=0,53$ ont été obtenus respectivement pour les tests DPPH et FRAP. Ces résultats indiquent que les composés phénoliques contribuent significativement au pouvoir antioxydant des extraits de feuilles de *E. camaldulensis*. Par ailleurs, Nasr et al. (2019) ont aussi rapporté une corrélation positive ($R^2=0,52$) entre les composés phénoliques présents dans les extraits de *E. camaldulensis* et l'activité antioxydante mesurée. De même, les travaux de Alghoraibi et al. (2020) [189] ont aussi rapporté une corrélation de $R^2=0,57$ entre l'activité antiradicalaire DPPH et les teneurs en composés phénoliques totaux mesurées dans les extraits des feuilles de *E. camaldulensis*. Cette valeur reste tout de même inférieure à la nôtre ($R^2=0,80$) pour le test DPPH. Par ailleurs, on pourrait estimer que l'obtention de meilleures propriétés antioxydantes à partir des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* soit en partie associée à la présence des composés phénoliques dans les extraits, notamment des acides phénoliques (acide gallique, ellagique, *p*-coumarique, etc.) et surtout des flavonoïdes (aglycones et dérivés glycosylés) comme précédemment démontré dans plusieurs travaux [92, 184, 187, 190].

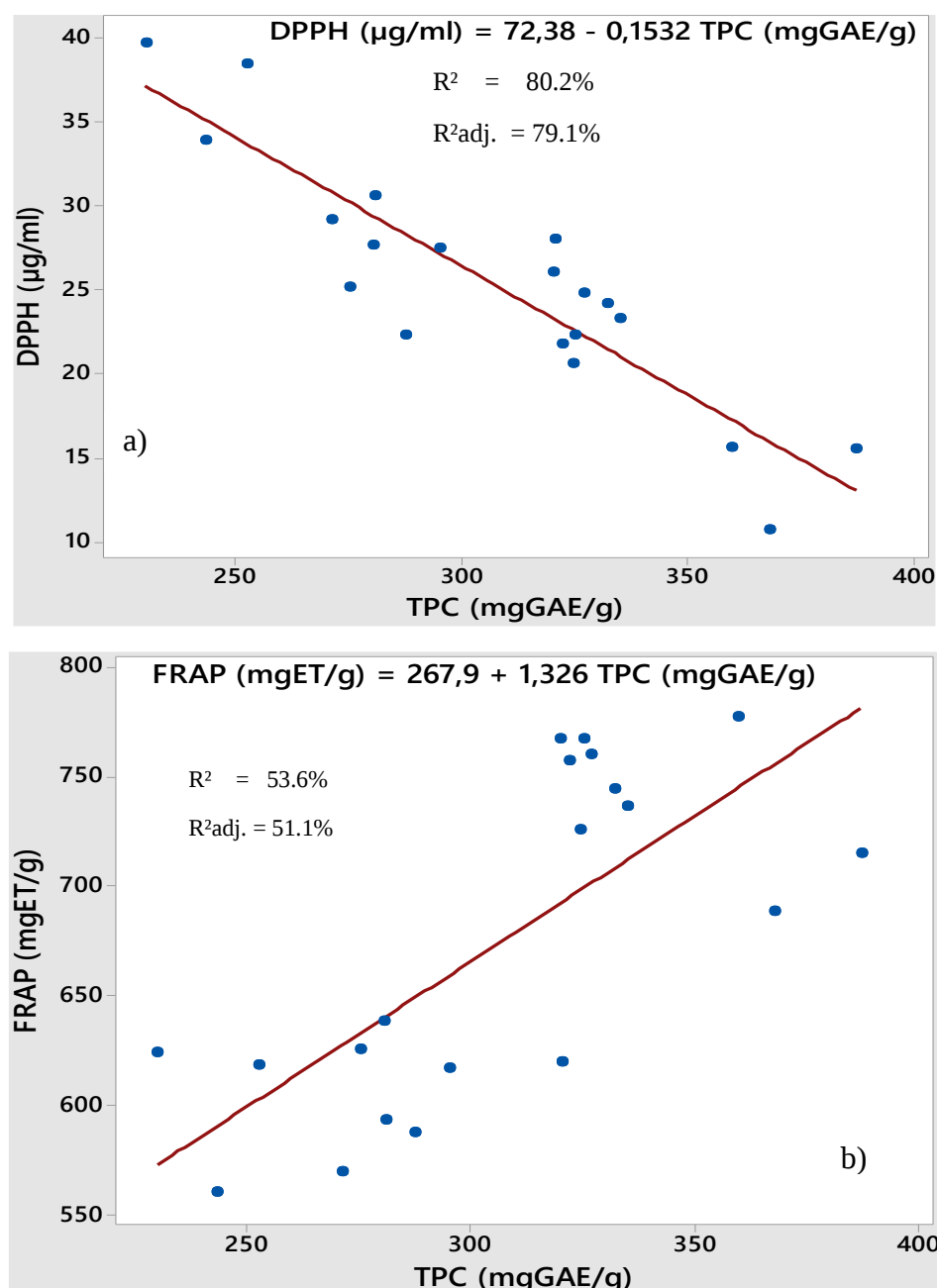


Figure 42. Régression linéaire entre les TPT et l'activité antioxydante (a-DPPH ; b-FRAP)

II.2. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

II.2.1. Influence des variables indépendantes sur les réponses étudiées

II.2.1.1. Réponse 1 = rendement d'extraction

Les rendements d'extraction des feuilles de *C. citratus* ont varié de 11,5% (essai N°12) à 18,8% (essai N°11), (Tableau 9). L'essai N° 11 a été réalisé dans les conditions d'extraction suivantes : un ratio liquide-solide de 15 mL/g sous une température de 60°C et durant 80 min. Le

diagramme de Pareto (Figure 43) permet de définir que seuls les termes A, B et B*C correspondant respectivement aux facteurs ratio liquide-solide, température et l'interaction entre la température et le temps d'extraction qui ont entraîné des effets significatifs ($p < 0,05$) sur la réponse rendement d'extraction (Tableau 10). La variation simultanée de A et de B a amélioré les rendements, tandis que l'effet contraire a été observé avec l'interaction entre les facteurs B et C.

L'analyse ANOVA du rendement d'extraction a indiqué que le modèle obtenu est significatif ($p < 0,0001$; Tableau 11) contrairement à la p-value du terme manque d'ajustement qui était non significatif ($p = 0,9527 > 0,05$). De plus, un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9525$ a été obtenu indiquant que 95,25% de la variabilité des données peuvent être expliquées par le modèle. Parmi les trois facteurs étudiés, le ratio liquide-solide est celui dont l'effet a été le plus important sur l'augmentation des rendements d'extraction suivi de la température. A contrario, le facteur temps a présenté un effet non significatif. Le graphique en 3D de la Figure 48-a montre les zones optimales d'extraction en considérant la variation des ratio liquide-solide (A) et la température (B) tout en fixant le temps au centre du domaine d'étude. L'équation 8 exprime le modèle mathématique de la réponse rendement d'extraction en valeurs codées.

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = 15,47 + 1,83A + 1,05B - 0,5BC. \quad \text{Eq. (8)}$$

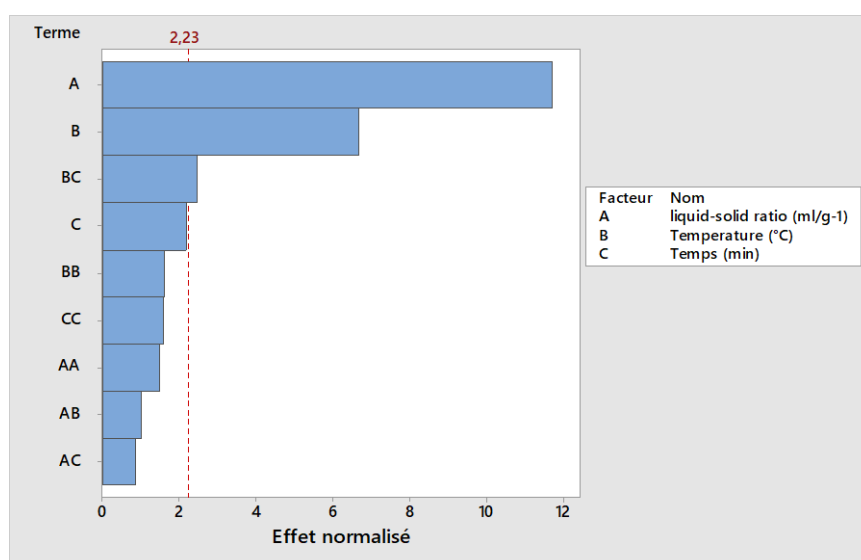


Figure 43. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse rendement d'extraction (%)) ; $\alpha = 0,05$)

II.2.1.2. Réponse 2 = TPT

Les TPT enregistrées ont montré une variation significative ($p < 0,001$) avec des valeurs comprises entre 122,1 mg EAG/g à 255,7 mg EAG/g respectivement obtenues pour les essais N° 5 et N° 3 (Tableau 9). Les conditions d'extraction de l'essai N° 3 étaient de 11,25 mL/g, 47,5°C et 160 min correspondant à un point central du plan expérimental. Le diagramme de Pareto (Figure 44) indique que les termes quadratiques (A^2 , B^2 , C^2) ont été les plus influents ($p < 0,05$) sur l'extraction des TPT suivi des effets linéaires du ratio liquide-solide (A) et de la température (B). En se référant aux coefficients, on remarque que tous ces termes significatifs (A^2 , B^2 , C^2 , A et B) ont induit des effets positifs ($p < 0,05$, Tableau 10) sur la récupération des TPT, donc entraînant une augmentation significative des TPT. Les résultats de l'analyse de régression multiple des données des TPT ont indiqué que le modèle obtenu est significatif ($p < 0,0005$) et présente un manque d'ajustement non significatif ($p\text{-value} = 0,9962 > 0,05$). De plus, un coefficient de détermination de 0,9063 a été observé indiquant que 90,63% de la variabilité des données peut être expliquée par le modèle proposé. Le diagramme b) de la Figure 48 présente l'influence simultanée du ratio liquide-solide (A) et de la température (B) sur la réponse TPT en fixant le facteur temps d'extraction (C) en son centre. L'équation 9 traduit le modèle prédit en termes de valeurs codées.

$$\text{TPT (mg EAG/g)} = 229,8 + 15,1A + 12,7B - 25,1A^2 - 20,5B^2 - 20,1C^2. \quad \text{Eq. (9)}$$

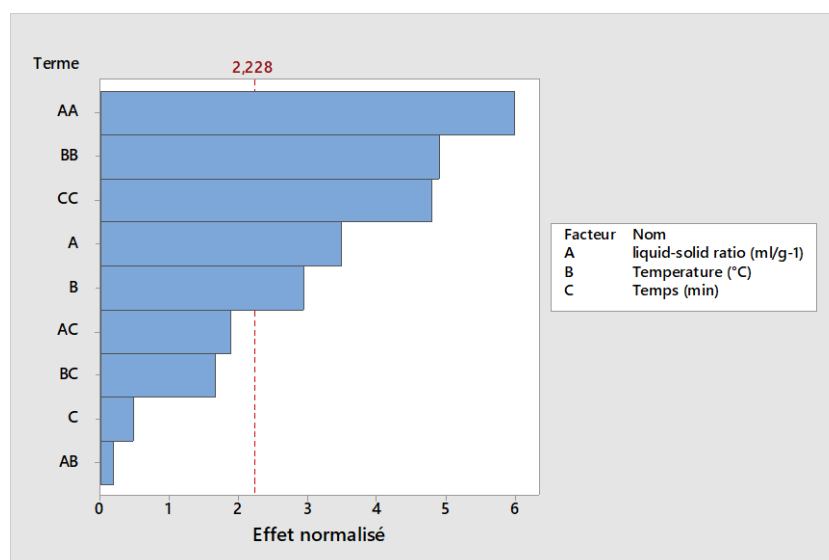


Figure 44. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse TPT (mg EAG/g) ; $\alpha = 0,05$)

II.2.1.3. Réponse 3 = TFM

Les concentrations des composés flavonoïdes majeurs (TFM) ont aussi varié significativement de 37,2 (essai N° 8) à 51,2 mg/mL (essai N° 15) et sont résumées dans le Tableau 9. L'essai N° 15 qui a enregistré la concentration la plus élevée a été effectué dans les conditions de 15 mL/g de biomasse, sous une température de 35°C et durant 240 min comparativement à l'essai N° 8 réalisé dans les conditions de 7,5 mL/g de biomasse sous une température de 60°C durant 240 min. L'analyse de l'ensemble des données expérimentales par régression multiple de la réponse TFM a permis de proposer un modèle quadratique polynomial de second ordre traduit par l'équation 10 comportant des termes ayant des coefficients statistiquement significatifs et non significatifs au seuil de 5%. Ainsi, le graphique de la Figure 45 indique qu'en dehors des effets d'interaction entre les facteurs A et B et de l'effet linéaire du facteur A, tous les autres termes ont entraîné des influences significatives ($p < 0,05$; Tableau 10) sur l'extraction des composés flavonoïdes majoritaires présents dans les feuilles de *C. citratus*. Parmi ces termes significatifs, on note que seule la variation du facteur temps d'extraction (C) et l'interaction entre les facteurs A et C ont eu des effets bénéfiques entraînant une amélioration significative des concentrations des composés flavonoïdes dans les extraits (Tableau 10). Par contre, des effets négatifs ont été observés, d'une part, avec tous les termes quadratiques (A^2 , B^2 , C^2) et, d'autre part, avec les termes d'interaction entre les variables température (B) et temps d'extraction (C), ainsi que le terme linéaire lié à la variable température (B). Ces effets négatifs indiquent qu'une augmentation de façon exponentielle (pour les termes quadratiques) aurait pour conséquence la diminution de l'extraction des composés flavonoïdes. L'analyse ANOVA a montré que le modèle est significatif ($p < 0,0001$; Tableau 11) et la p-value du manque d'ajustement était supérieure à 0,05. Un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9549$ a été obtenu et la différence entre les coefficients de détermination R^2 ajusté et R^2 prédit était aussi inférieure à 0,2. On montre par conséquent que 95,49% de la variabilité des données expérimentales peut être expliquée par le modèle théorique obtenu et que ceci peut être utilisé pour prédire la réponse concentration des composés flavonoïdes dans les extraits. La Figure 48-c présente le graphique 3D de la réponse TFM construit en fonction du ratio liquide-solide (A) et de la température (B) en fixant le temps d'extraction au centre du domaine.

$$\text{TFM (mg/g)} = 48,48 - 2,46B + 1,35C + 1,37AC - 3,58BC - 3,21A^2 - 1,08B^2 - 2,26C^2. \text{ Eq. (10)}$$

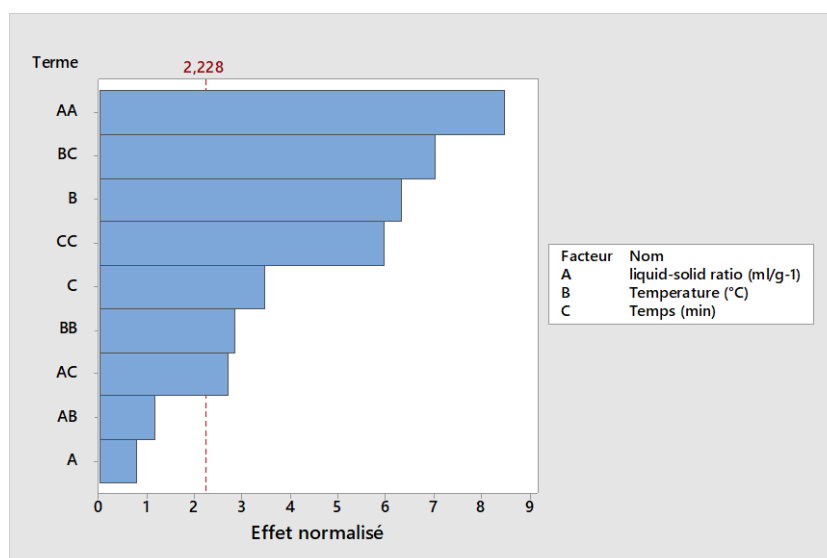


Figure 45. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse Composés Flavonoïdes majeurs (mg/g) ; $\alpha=0,05$)

II.2.1.4. Réponse 4 = DPPH

Les activités antiradicalaires DPPH mesurées dans les différentes conditions d'extraction en tant que valeur IC_{50} ont montré une variation de 90,0 $\mu\text{g/mL}$ (essai N°7) à 142,7 $\mu\text{g/mL}$ (essai N°5). L'essai N°7 qui a enregistré la meilleure activité ($IC_{50} = 90,0 \mu\text{g/mL}$) a été réalisé dans les conditions ratio liquide-solide de 17,5 mL/g, sous une température de 47,5°C et durant 160 min (Tableau 9). Selon le diagramme de Pareto (Figure 46), tous les termes ont entraîné des influences significatives ($p < 0,05$) sur l'activité antiradicalaire DPPH à l'exception de l'interaction entre le ratio liquide-solide avec la température ($p > 0,05$; Tableau 10). L'analyse de la significativité des coefficients (Tableau 10) a permis de montrer que les effets linéaires de la variable A et de la variable B, ainsi que les effets des interactions entre A avec C et entre B avec C ont été négatifs sur l'activité DPPH entraînant une amélioration du pouvoir antiradicalaire des extraits (puisque'il s'agit des IC_{50}). Par contre, les termes quadratiques de tous les facteurs (A^2 , B^2 , et C^2) et le terme linéaire du facteur C ont présenté des coefficients positifs indiquant une baisse importante de l'activité antiradicalaire (avec des valeurs IC_{50} les plus élevées). L'analyse ANOVA a montré que le modèle était significatif ($p < 0,0001$; Tableau 11) et ne comportait pas de manque d'ajustement ($p\text{-value} = 0,866 > 0,05$). De plus, l'analyse a révélé un coefficient de détermination de 0,9787, ce qui voudrait dire que 97,87% de la variance peut être expliquée par le modèle ($R^2 \text{ aj.} = 0,9595$). Le modèle quadratique polynomial du second ordre obtenu par régression linéaire de la variable réponse DPPH est traduit par l'équation 11. Le graphique d) de la Figure 48 correspond à la surface 3D de la réponse DPPH

construite en fonction de la variation des facteurs ratio liquide-solide (A) et température (B) et en fixant le facteur temps d'extraction (C) en son centre.

$$\text{DPPH } (\mu\text{g/mL}) = 99,36 - 13,15A - 4,06B + 2,95C - 4,98AC - 2,95BC + 5,05A^2 + 3,44B^2 + 5,57C^2. \quad \text{Eq. (11)}$$

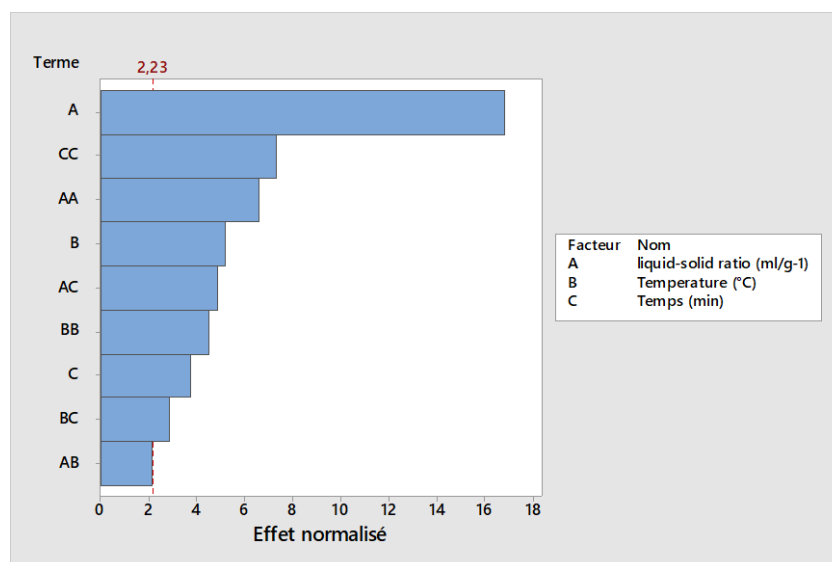


Figure 46. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse DPPH ($\mu\text{g/mL}$) ; $\alpha=0,05$)

II.2.1.5. Réponse 5 = FRAP

Les données expérimentales obtenues révèlent que le pouvoir réducteur des extraits a varié de 303,9 mg ET/g (Essai N°12) à 427,0 mg ET/g (Essai N°17), (Tableau 9). L'extrait ayant présenté la plus faible activité a été préparé dans les conditions suivantes : 4,9 mL/g, 47,7°C et 160 min, tandis que le plus actif était préparé dans les conditions de 15 mL/g, 60°C et 240 min. Les termes qui ont une influence significative sur la capacité réductrice des extraits sont selon le diagramme de Pareto (Figure 47) : les termes linéaires des trois facteurs étudiés (A, B, C), les termes quadratiques (A^2 et B^2) des facteurs A et B, et l'interaction entre le facteur B avec la variable C. En plus des effets d'interaction entre les variables B et C, les effets linéaires de toutes les variables ont entraîné une augmentation de l'activité réductrice des extraits comparativement aux termes quadratiques A^2 et B^2 qui ont inhibé de manière significative ($p<0,05$; Tableau 10) l'activité FRAP. Ceci voudrait dire qu'une augmentation importante du ratio liquide-solide et de la température au-delà d'un certain seuil au cours de l'extraction conduirait à une diminution considérable de l'activité FRAP. Aucun effet significatif ($p>0,05$; Tableau 10) n'a été constaté avec les termes AC, AB et C^2 .

Par ailleurs, l'analyse ANOVA (Tableau 11) a montré un modèle significatif avec une valeur $p < 0,0001$ et un manque d'ajustement non significatif ($p > 0,05$). Le coefficient de détermination obtenu était de 0,9405 justifiant que 94,05% de la variabilité des données peut être expliquée par ce modèle ($R^2_{aj} = 0,887$). L'équation 12 traduit le modèle mathématique polynomial du second ordre obtenu par régression linéaire de la réponse FRAP. Les graphiques e) et f) de la Figure 48 présentent les surfaces 3D de la réponse FRAP respectivement entre les variables ratio liquide-solide (A) et température (B) et entre les variables température (B) et temps d'extraction (C).

$$\text{FRAP (mg ET/g)} = 372,3 + 22,34A + 13,6B + 8,17C + 11,9BC - 11,36A^2 - 7,6B^2. \quad \text{Eq. (12)}$$

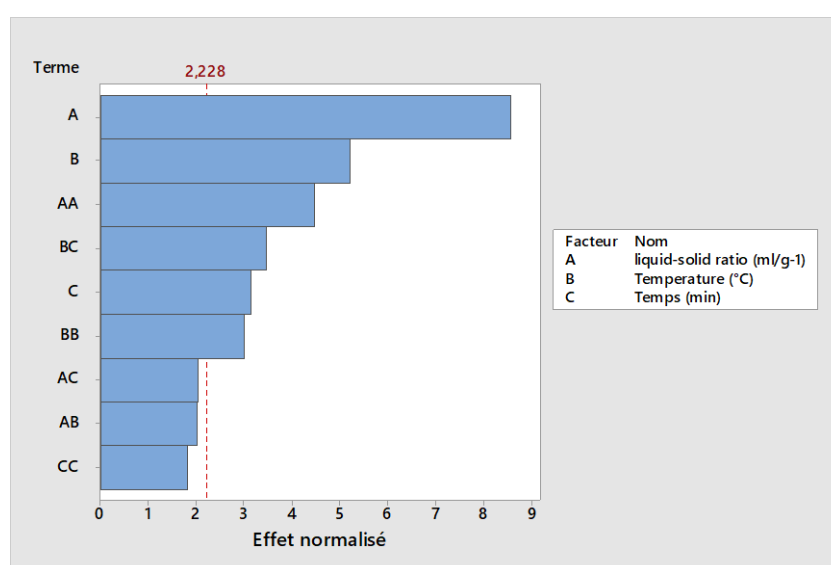


Figure 47. Diagramme de Pareto des effets normalisés (Réponse FRAP (mg ET/g) ; $\alpha=0,05$)

Tableau 9 : base de données avec les variables indépendantes et les variables réponses

Variables indépendantes				Réponses expérimentales / Réponses prédites									
Run	A	B	C	Rendement (%)		TPT (mg EAG/g)		TFM (mg/g)		DPPH (µg/mL)		FRAP (mg ET/g)	
				Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.	Exp.	Préd.
1	(0)	(0)	(0)	16,3	15,5	227,7	229,8	48,6	48,5	95,2	99,4	376,6	372,3
2	(0)	(-1,68)	(0)	13,0	13,0	149,9	150,5	50,8	49,6	114,5	115,9	334,3	327,8
3	(0)	(0)	(0)	14,9	15,5	255,8	229,8	49,6	48,5	99,1	99,4	360,7	372,3
4	(0)	(+1,68)	(0)	16,4	16,5	189,7	193,2	38,9	41,3	102,1	102,3	360,3	373,6
5	(-1)	(-1)	(+1)	12,0	12,1	122,1	119,6	46,8	47,0	142,8	143,7	305,2	308,9
6	(0)	(0)	(0)	15,3	15,5	195,9	229,8	47,1	48,5	102,9	99,4	375,3	372,3
7	(+1,68)	(0)	(0)	18,0	17,9	186,7	184,2	39,2	39,9	90,0	91,5	369,7	377,7
8	(-1)	(+1)	(+1)	13,0	12,8	163,6	161,5	37,2	36,2	126,1	125,3	352,8	346,0
9	(-1)	(+1)	(-1)	14,9	14,8	165,7	159,9	44,6	43,4	114,5	115,4	322,4	319,9
10	(0)	(0)	(0)	15,5	15,5	215,1	229,8	48,1	48,5	99,1	99,4	370,9	372,3
11	(+1)	(+1)	(-1)	18,8	18,5	171,3	171,0	41,1	40,0	105,4	103,4	372,9	364,4
12	(-1,68)	(0)	(0)	11,5	11,8	127,0	133,5	38,4	38,9	135,7	135,8	303,9	302,6
13	(+1)	(-1)	(-1)	15,0	15,0	162,9	162,2	38,8	39,0	101,5	101,2	345,1	347,2
14	(0)	(0)	(-1,68)	15,0	15,4	165,2	169,6	39,3	39,8	108,7	110,2	344,6	345,3
15	(+1)	(-1)	(+1)	15,7	15,7	165,8	168,7	51,2	51,6	105,0	103,1	356,1	353,8
16	(0)	(0)	(0)	16,4	15,5	239,3	229,8	47,8	48,5	96,1	99,4	365,9	372,3
17	(+1)	(+1)	(+1)	17,0	17,2	214,9	214,9	39,7	38,3	92,6	93,4	427,0	418,5
18	(-1)	(-1)	(-1)	12,5	12,1	158,3	155,4	39,4	39,9	123,9	121,9	326,5	330,3
19	(0)	(0)	(+1,68)	14,3	14,2	176,8	176,5	43,7	44,4	120,1	120,1	366,8	372,8
20	(0)	(0)	(0)	14,5	15,5	245,9	229,8	49,9	48,5	104,0	99,4	385,5	372,3

Exp. : réponses expérimentales ; Préd. : Réponses prédites ; Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne de trois essais

Tableau 10 : coefficients des régressions polynomiales du second ordre avec analyse ANOVA du modèle

Réponses	Rendement (%)		TPT (mg EAG/g extrait)		TFM (mg/g)		DPPH (IC ₅₀ µg/mL)		FRAP (mg ET/g extrait)	
Termes	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value	Coeff.	p-value
Constant	15,47		229,83		48,48		99,36		372,30	
Linéaires										
A	1,83	< 0,0001 ^a	15,05	0,0058 ^b	0,3035	0,4532	-13,15	< 0,0001 ^a	22,34	< 0,0001 ^a
B	1,05	< 0,0001 ^a	12,69	0,0147 ^b	-2,46	< 0,0001 ^a	-4,06	0,0004 ^a	13,60	0,0004 ^a
C	-0,3393	0,0551	2,03	0,6479	1,35	0,0061 ^b	2,95	0,0037 ^b	8,17	0,0108 ^b
Quadratiques										
A ²	-0,2238	0,1721	1,07	0,0001 ^a	-3,21	< 0,0001 ^a	5,05	< 0,0001 ^a	-11,36	0,0012 ^b
B ²	-0,2432	0,1410	10,60	0,0006 ^a	-1,08	0,0175 ^b	3,44	0,0011 ^b	-7,65	0,0132 ^b
C ²	-0,2415	0,1436	9,35	0,0007 ^a	-2,26	0,0001 ^a	5,57	< 0,0001 ^a	-4,68	0,0958
Interactions										
A*B	0,2075	0,3336	-25,10	0,8528	-0,6000	0,2650	2,18	0,0590	6,90	0,0708
A*C	0,1725	0,4180	-20,51	0,0890	1,37	0,0221 ^b	-4,98	0,0007 ^a	7,00	0,0675
B*C	-0,5000	0,0344 ^b	-20,08	0,1275	-3,58	< 0,0001 ^a	-2,95	0,0162 ^b	11,87	0,0060 ^b
C.V. (%)	3,85		8,61		3,27		2,65		2,71	
Adeq. precision	16,5391		9,798		15,1826		25,5055		16,9667	

A : ratio liquide-solide ratio ; B : Température ; C : Temps ; Significativité : (a) $p < 0,001$; (b) $p < 0,05$; C.V: Coefficient de variation (%)

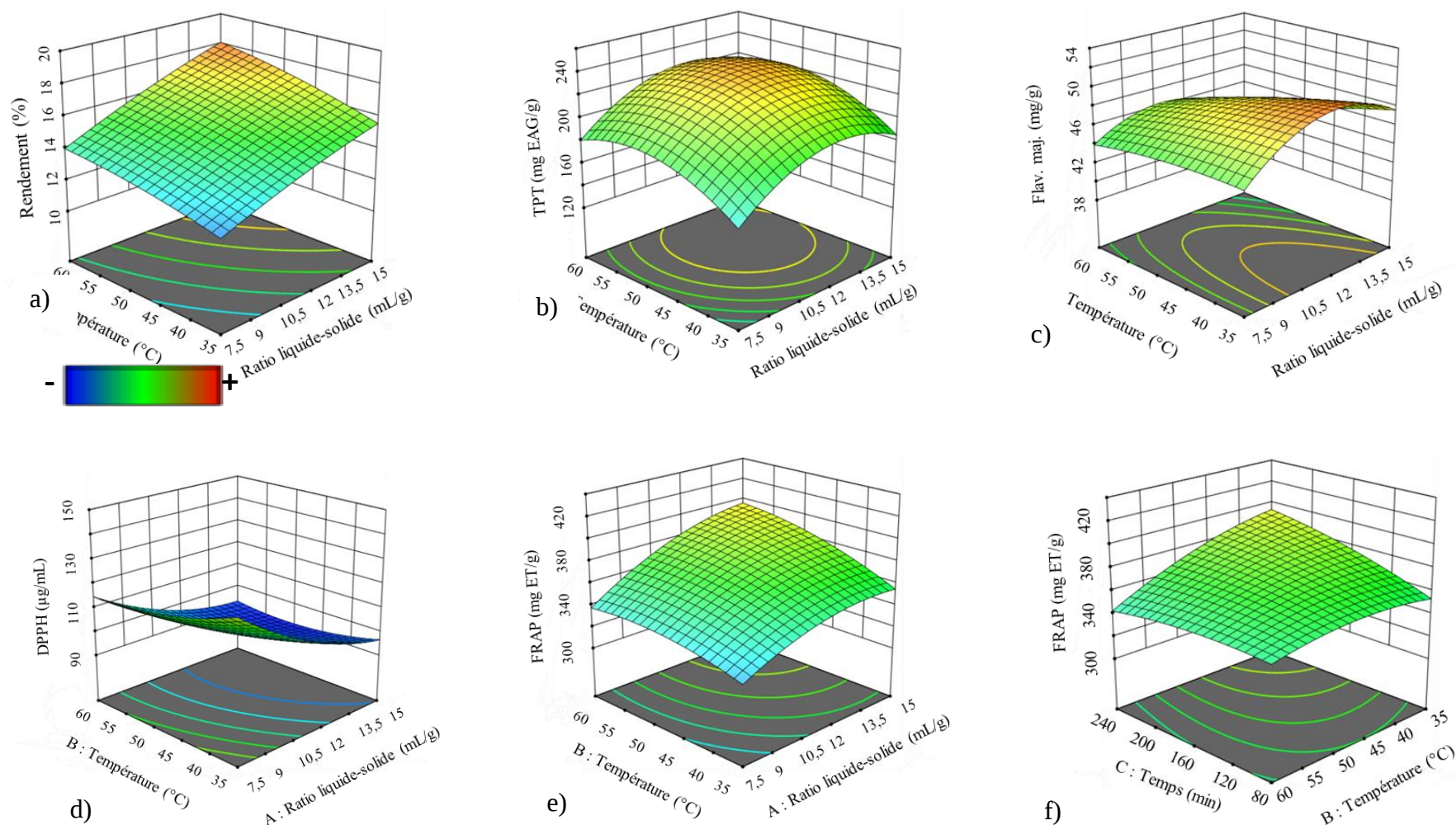


Figure 48. Surfaces de réponse 3D avec le facteur temps (C) fixé au centre (a- Rendement ; b- TPT ; c- Composés Flavonoïdes (TFM) ; d- DPPH ; e et f- FRAP)

Tableau 11 : analyse ANOVA des modèles de régression

Modèles de régression	R ² (%)	R ² aj. (%)	R ² préd. (%)	F-value du modèle	p-value du modèle	Manque d'ajust. (F-value)	Manque d'ajust. (p-value)
Rendement	95,25	90,97	88,21	22,28	<0,0001 ^a	0,1923	0,9527
TPT	90,63	82,19	83,24	10,74	< 0,0005 ^a	0,0597	0,9962
TFM	95,59	91,44	73,54	23,55	<0,0001 ^b	2,57	0,1619
DPPH	97,87	95,95	93,16	51,04	<0,0001 ^a	0,3452	0,8660
FRAP	94,05	88,7	69,62	17,57	< 0,0001 ^a	1,47	0,3424

Significativité : (a) $p < 0.001$; (b) $p < 0.05$; Non-significatif : (c) $p > 0.05$

II.2.2. Détermination des conditions optimales d'extraction

Les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques des feuilles de *C. citratus* ont également été déterminées en suivant le même principe que précédemment décrit plus haut dans le cas de l'espèce *E. camaldulensis* (paragraphe II.1.2.). L'objectif a consisté à optimiser simultanément les variables indépendantes (ratio liquide-solide, température et temps d'extraction) et les variables réponses (rendement, TPT, TFM, DPPH et FRAP). Le même poids a été affecté aux réponses TPT et TFM. Le Tableau 12 résume les restrictions imposées aux variables indépendantes et dépendantes. Le résultat global de cette optimisation a montré que les conditions d'extraction de 11,6 mL/g de biomasse avec une température de 44,8°C et durant 151,3 min sont les meilleures conditions pour cette combinaison de variables.

Tableau 12 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponses

Variables	Cible	Limite inférieure	Limite supérieure	Poids inférieur	Poids supérieur	Importance
A : Ratio liquide-solide	minimiser	7,5	15	1	1	1
B : Température	minimiser	35	60	1	1	1
C : Temps	minimiser	80	240	1	1	1
Rendement	maximiser	11,5	18,76	1	1	1
TPT	maximiser	122,1	255,7	1	1	3
TFM	maximiser	37,2	51,2	1	1	3
DPPH	minimiser	90,0	142,7	1	1	1
FRAP	maximiser	303,9	427,0	1	1	1

Plusieurs extractions ont été réalisées dans ces nouvelles conditions (11,6 mL/g ; 44,8°C ; 151,3 min) dans le but de comparer les résultats expérimentaux à ceux prédits théoriquement par le modèle (Tableau 13). L'analyse statistique de ces résultats a permis de montrer qu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les réponses expérimentales et théoriques dans un intervalle de confiance IC à 95%. Sah et al. (2012) [191] ont effectué l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *C. citratus* en appliquant la technique d'extraction conventionnelle classique. Ils ont obtenu des TPT de 67 mg EAG/g avec une activité antioxydante évaluée par la méthode DPPH (192 µg/mL) et FRAP (129 mg ET/g). Ces extraits ont été préparés dans les conditions suivantes : 40 % d'éthanol, 25 °C pendant 300 min, ratio liquide-solide 10 mL/g et sous agitation permanente (150 rpm). Par rapport aux résultats de ces auteurs, nous pouvons dire que l'approche méthodologique appliquée dans le cas de notre étude a non seulement permis de gagner en temps, d'obtenir des teneurs élevées en molécules bioactives extraites, mais aussi de maximiser le pouvoir antioxydant des extraits. De plus, Muala et al. (2021) [93] ont aussi rapporté des TPT (71,98 mg EAG/100 mL) et des activités antiradicalaires DPPH (80,63 mg ET/100 mL) obtenues à partir des feuilles de *C. citratus* en appliquant cette fois-ci une approche de MSR. Ces extraits ont été préparés dans les conditions optimales d'extraction de 5 g/100 mL, 93,8°C et 11,3 min respectivement pour le ratio solide-liquide, la température et le temps d'extraction. En établissant une comparaison entre les valeurs obtenues par ces auteurs par rapport aux nôtres, on peut dire que notre approche méthodologique a permis de faire une économie en termes de quantité de solvant utilisée et aussi de l'énergie consommée (température plus faible) tout en maximisant l'extraction des composés bioactifs. Dans le même sens, Naseem et al. (2021) [129] ont également appliqué une

MSR de type Box-Behnken pour étudier les influences simultanées des facteurs ratio liquide-solide, la température et le temps d'extraction sur la récupération des composés bioactifs des feuilles de *C. citratus*. Les résultats obtenus étaient : TPT ($116 \pm 3,5$ mg EAG/g), TFT ($98 \pm 2,5$ mg EQ/g) et DPPH ($95 \pm 3,0\%$). Les conditions optimales d'extraction étaient 1,5 g/10 mL, avec une température de 60°C et durant 45 min. Ici, on voit clairement que les TPT obtenues dans notre étude dépassent largement celles rapportées par ces auteurs (quasiment le double). Cependant, compte tenu du fait que les TFT ainsi que les activités antiradicalaires DPPH rapportées par les deux études n'ont pas été exprimées sous les mêmes unités, cela rend complexe la comparaison qualitative entre ces résultats. Par ailleurs, à partir de l'ensemble de ces résultats, on peut retenir que l'extraction des composés phénoliques a été globalement optimisée au cours de notre étude en appliquant l'approche d'extraction par MSR.

Tableau 13 : vérification et confirmation des conditions optimales d'extraction

Réponses	Rendement (%)	TPT (mg EAG/g)	TFM (mg/mL)	DPPH (μ g/mL)	FRAP (mg ET/g)
Expérimentales	14,2 $\pm$ 1,8	238,8 $\pm$ 11,1	51,1 $\pm$ 2,0	96,8 $\pm$ 2,6	367,6 $\pm$ 14,7
Prédites	15,4 $\pm$ 0,6	227,0 $\pm$ 15,9	48,7 $\pm$ 1,4	98,8 $\pm$ 2,9	370,3 $\pm$ 9,6
IC à 95%	[14,9 ; 15,9]	[212,6 ; 241,4]	[47,4 ; 50,0]	[96,2 ; 101,4]	[361,6 ; 379,0]

IC : intervalle de confiance

Au regard de l'importance des constituants phytochimiques présents dans les feuilles de *C. citratus*, plusieurs études ont été conduites pour une extraction maximale de ces composés. Le Tableau 14 présente des teneurs en phénoliques totaux et flavonoïdes totaux de quelques travaux réalisés sur des feuilles de *C. citratus* et disponibles dans la littérature. Ces résultats montrent qu'en fonction de l'approche méthodologique appliquée, les teneurs en molécules bioactives dans les extraits varient de façon considérable. L'extraction par MSR semble être plus efficace dans l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques.

Tableau 14 : comparaison des résultats d'optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *C. citratus*

Méthodes	Solvants	Conditions d'extraction	Rendement (%)	TPT (mg EAG/g)	DPPH (µg/mL)	Références
Infusion	MeOH	10 mL/g ; 30 min	15,2	118,1		[50]
Extraction conventionnelle	EtOH (70%)	10 mL/g ; 20 min ; 60°C	---	133,8	450	[192]
Macération (résidu solide)	EtOH (70%)	10 mL/g ; 24h	4,6	74,2	1390	[46]
Infusion	Eau	30 mL/g ; 15 min	18,4	70,2	38,7	[193]
MSR	Eau	8 mL/g ; 250W ; 90 min	1,5	---	---	[194]
MSR	MeOH (80%)	5 mL/g ; 93,8°C ; 11,3 min; méthanol 80%	---	71,9	---	[93]
MSR	Solvant DES	6,7 mL/g ; 60°C ; 45 min	---	116,0	---	[129]
MSR : macération	EtOH (70%)	11,6 mL/g ; 44,8°C ; 151,3 min	14,2	238,8	96,8	Notre étude

MSR : méthodologie de surface de réponse ; DES : *Deep eutectic solvent*

II.2.3. Corrélation entre les TPT et l'activité antioxydante (DPPH & FRAP) des extraits des feuilles de *C. citratus*

Des corrélations positives ont été établies entre les TPT et le pouvoir antiradicalaire DPPH (56,5%) et la capacité réductrice FRAP (53,1%) (Figure 49) à partir des 20 extraits différents donnés par le plan d'expérience. Les valeurs des coefficients obtenues indiquent que plus de 50% de l'activité antioxydante de nos extraits est associée à la présence des composés phénoliques. Par ailleurs, Sah et al. (2012) [191] avaient rapporté des corrélations de 0,777 et 0,995 respectivement entre les TPT et DPPH et entre les TPT et FRAP à partir d'un extrait optimisé dans les conditions de 40% éthanol, à 25°C et durant 5h d'extraction sous agitation continue.

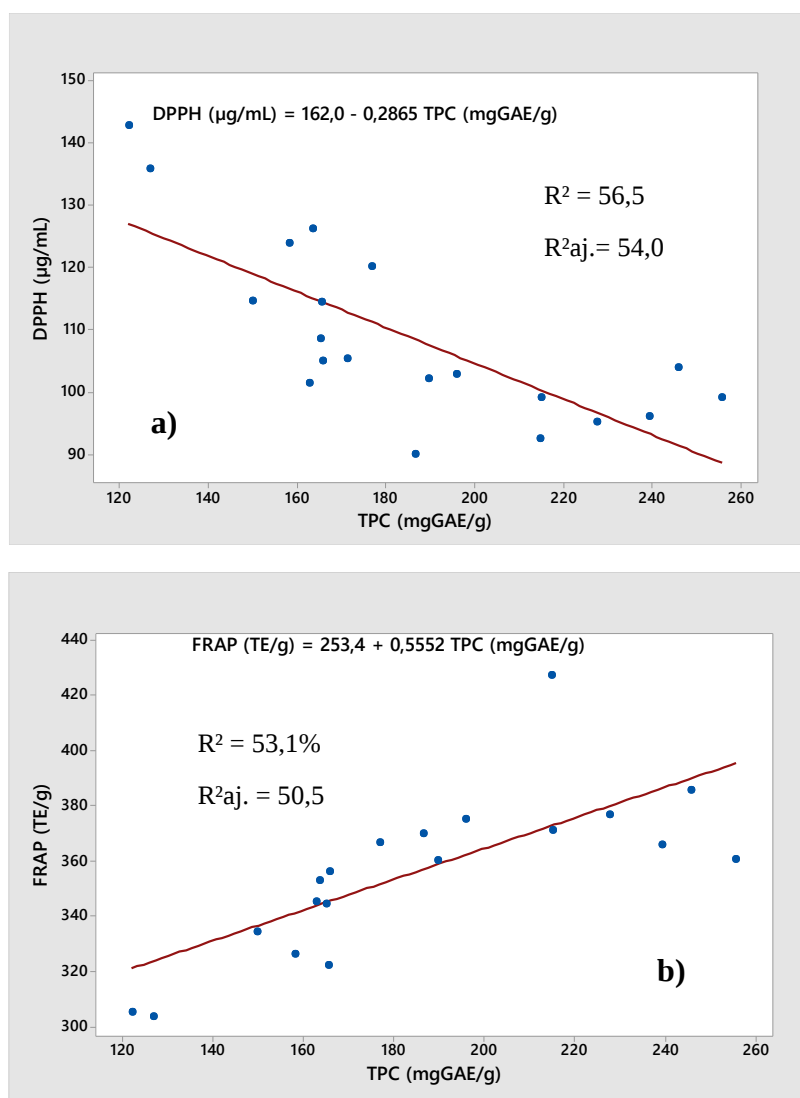


Figure 49. Régression linéaire entre les TPT et l'activité antioxydante (a-DPPH ; b-FRAP)

Conclusion

L'approche de MSR appliquée dans cette étude nous a permis de proposer pour chacune des deux plantes, des conditions adéquates permettant d'optimiser l'extraction des molécules bioactives notamment les composés phénoliques. Ces conditions sont égales à 12,4 mL/g de poudre, 50,4°C, 124,8 min pour l'espèce *E. camaldulensis* et 11,6 mL/g, 44,8°C, 151,3 min pour l'espèce *C. citratus*. Ces résultats montrent que l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *E. camaldulensis* nécessite une plus grande quantité de solvant et une température supérieure comparativement à l'espèce *C. citratus*. Par contre, cette dernière nécessite des durées relativement plus longues et à faible température.

Parmi les trois variables indépendantes étudiées, on peut retenir que le facteur ratio liquide-solide (A) est le plus influent sur les réponses mesurées suivie de la température (B). Par contre, le temps d'extraction n'a qu'une influence relativement faible dans la plage étudiée.

Les rendements d'extraction ainsi que les TPT enregistrés dans les différents extraits étaient plus élevés dans les échantillons de feuilles de *E. camaldulensis* par rapport à ceux de *C. citratus*. Par contre, en ce qui concerne les TFM, les teneurs les plus élevées ont été détectées dans les extraits de *C. citratus*. Les résultats ont également montré que les extraits de *E. camaldulensis* étaient les plus actifs en termes d'activités antioxydantes mesurées.

***Chapitre 4 : Caractérisation des extraits et
identification des principaux flavonoïdes***

Chapitre 4 : Caractérisation des extraits et identification des principaux flavonoïdes

Introduction

Le présent chapitre a pour objectif principal de caractériser les grands groupes chimiques présents dans les échantillons d'extraits optimisés et d'identifier les composés flavonoïdes majoritaires. La première partie de ce chapitre a été consacrée à la caractérisation qualitative et quantitative des extraits des deux plantes, et la deuxième partie a porté sur l'identification des flavonoïdes majoritaires présents dans les extraits des deux plantes étudiées à l'aide de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à source ionisation Electrospray (HPLC-ESI-MS).

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué essentiellement des extraits des deux plantes obtenus via le procédé d'extraction présenté dans le Chapitre 3 (II.1. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. ; II.2. Optimisation de l'extraction des composés bioactifs de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf).

L'ensemble du matériel de laboratoire qui est composé de réactifs, de solvants et d'équipements a déjà été présenté dans la partie « Matériel et méthodes » du chapitre 2.

I.2. Description des méthodes de caractérisation

I.2.1. Caractérisation qualitative

I.2.1.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les flavonoïdes présents dans les différents extraits ont qualitativement été mis en évidence en procédant par migration sur une plaque CCM de gel de silice. Ainsi donc, des extraits ont été préparés dans du méthanol à une concentration de 20 mg/mL. Ensuite à l'aide des tubes capillaires de 5µL, des solutions de chaque extrait ont été déposés sous forme de spots sur la plaque CCM. Le développement a été fait en utilisant comme éluant le mélange butanol-acide acétique-eau (65/15/20 ; v/v/v) dans une cuve (20×20 cm). L'atmosphère de la cuve a été au préalable saturée pendant 30 minutes en utilisant du papier filtre Whatman N°1. À la fin de la migration, la plaque a été retirée de la cuve puis séchée à l'étuve (105°C) pendant environ 5

min puis pulvérisée à l'aide du réactif de NEU (révélateur des flavonoïdes). Après pulvérisation du réactif, la plaque a été séchée à nouveau à l'étuve à 105°C pendant 5 minutes. Les flavonoïdes sont observés sous forme de tâches fluorescentes sous une lampe UV à 365 nm. L'opération a été réalisée en trois essais identiques pour chaque extrait optimisé de chacune des deux plantes.

I.2.1.2. Analyse par spectroscopie infrarouge (IR)

L'empreinte infrarouge de chaque échantillon d'extrait a été obtenu en utilisant l'appareil FT-IR ALPHA de Bruker en mode ATR (Réflexion Totale Atténuée). Les poudres fines de chaque échantillon d'extrait ont été étalées sur le cristal de ZnSe et l'ensemble est soumis à une presse afin d'assurer un enregistrement des spectres de qualité. Les spectres ont été enregistrés après une accumulation de 24 scans entre les nombres d'onde de 600 et 4000 cm^{-1} .

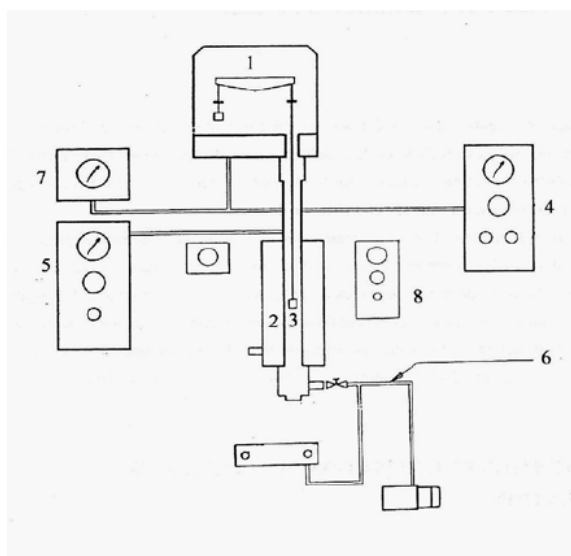
I.2.1.3. Analyse au spectrophotomètre UV-visible à balayage

Afin d'examiner les caractéristiques d'absorption des solutions d'extraits bruts optimisés des deux plantes, des analyses au spectrophotomètre UV-visible à balayage ont été réalisées dans la gamme de 200 nm à 700 nm en comparaison avec des spectres de 6 standards de composés phénoliques purs réalisés dans les mêmes conditions. Tous les échantillons ont été au préalable préparés dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL. Afin d'obtenir des absorbances inférieures à 1, les solutions des standards ont été diluées à 20 $\mu\text{g/mL}$ tandis que celles des extraits bruts (EO : Eucalyptus Optimisé ; CO : Cymbopogon Optimisé) ont été ramenées à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. La solution du méthanol a été utilisée comme blanc.

I.2.1.4. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les teneurs en cendres totales des extraits H_2O , $\text{EtOH}_{70\%}$ et $\text{EtOH}_{100\%}$ ont été déterminées à l'aide d'un instrument Setaram SETSYS Evolution TGA 16/18 (Figure 50). Les courbes TG ont été enregistrées avec une vitesse de chauffe de 10°C/min dans une gamme de températures de 25 à 800°C, en utilisant des creusets d'alumine et des échantillons d'une masse d'environ 5 mg. Les expériences ont été réalisées sous atmosphère d'air à un débit de 50 mL/min jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

Pour l'analyse de la stabilité thermique, les courbes TG-dTG simultanées des extraits ont été réalisées sous atmosphère d'azote à un débit de 30 mL/min. Des creusets en alumine et des échantillons d'environ 5 mg ont été testés à une vitesse de chauffage de 10°C/min et une température comprise entre 25 et 950°C.



- 1 Microbalance optique
- 2 Four
- 3 Echantillon
- 4 Dispositif de gaz porteur
- 5 Dispositif de gaz auxiliaire (gaz-oxydant)
- 6 Dispositif de vide primaire
- 7 Manomètre de la microbalance
- 8 Dispositif de balayage de gaz de protection du four

Figure 50. Analyseur thermogravimétrique SETSYS-1750 CSEVOL

I.2.2. Caractérisation quantitative

La caractérisation quantitative a porté essentiellement sur la quantification des flavonoïdes totaux et phénoliques totaux présents dans les différents extraits des deux plantes étudiées. Les protocoles détaillés sont disponibles dans la section « I.2.4. Dosages des composés bioactifs dans les extraits par spectrophotométrie UV-visible » du chapitre 2.

I.3. Identification des composés flavonoïdes par analyses LC-MS

I.3.1. Séparation des composés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

L'identification des composés flavonoïdes par la spectrométrie de masse suppose au préalable une étape de séparation en amont effectuée par HPLC. Ce dispositif est muni d'une colonne ayant des caractéristiques bien définies dans laquelle les molécules vont être séparées en fonction de leur affinité entre cette dernière et la phase liquide.

Dans la présente étude, une chaîne HPLC de type Waters Alliance 2695 couplée au Waters QToF API-US (Figure 51) a été utilisée munie d'une colonne de type Phenomenex Kinetex C18 EVO (150 x 2.1 mm i.d., 100 Å particle size). Il s'agit d'une colonne en phase inverse, avec une phase stationnaire C18 recouverte de TMS (triméthylsilyle). La température du four de la colonne était maintenue à 40°C et celle du passeur automatique d'échantillon à 20°C. Un gradient binaire de solvant a été utilisé avec un débit de 0,25 mL/min et un volume d'injection

de 5 μ L. Le système de solvants est composé du méthanol (solvant A) et de l'eau acidifiée (Eau + 0,01% d'acide formique, solvant B) avec un gradient décrit comme suit : A = 10 %, B = 90 % à t = 0 min; A = 30 %, B = 70 % à t = 6 min; A = 35 %, B = 65 % à t = 11 min; A = 50 %, B = 50 % à t = 18 min; A = 90 %, B = 10 % à t = 23 min; A = 100 %, B = 0 % à t = 25 min; A = 100 %, B = 0 % à t = 27 min, A = 10 %, B = 90 % à t = 30 min.

I.3.2. Spectromètre de masse Waters QToF API-US

Le spectromètre de masse Waters QToF-US muni d'une source d'ionisation Electrospray (ESI) a été utilisé en modes négatif et positif. Les potentiels étaient définis comme suit : capillaire : 3,1 kV ou -3,1 kV (en mode négatif), cône : 30 V ou -30 V. La température de la source était de 80°C et la désolvatation fixée à 120°C (une fois couplée à la LC, la température de la source est fixée à 120°C et celle de la désolvatation à 300°C). De l'azote sec est utilisé au niveau du cône avec un débit de 50 L/h et gaz de désolvatation à un débit de 500 L/h. La gamme d'ions de masse m/z 50-2000 a été sélectionnée au niveau du quadrupôle et tous les ions sont transmis dans le champ de l'analyseur ToF (Time-Of-Flight) pour l'analyse de masse avec un temps d'intégration de 1s (Résolution 7 000 à m/z 500). L'acquisition des données est ensuite effectuée jusqu'à l'obtention de données acceptables moyennées sur typiquement à 20 balayages.

Les masses exactes des différents composés identifiés dans les extraits ont été déterminées en mode négatif ESI(-) par analyse à haute résolution (Résolution 8000) en utilisant une molécule co-injectée utilisée comme masse de référence (lock mass).

Les analyses LC-MS/MS ont consisté à extraire les masses spécifiques des ions d'intérêt et à les soumettre à des collisions avec de l'argon dans la cellule de collision. Des énergies de collision spécifiques ont été appliquées à chaque ion dans le but de produire des signaux d'ions fragments caractéristiques et suffisamment intenses. Pour certains ions, des analyses pseudo-MS³ ont été aussi effectuées en induisant des dissociations en source par augmentation de l'énergie de dissociation au niveau du cône.

Quant aux analyses semi-quantitatives permettant la quantification des composés identifiés, elles ont consisté à effectuer des expériences LC-MS en ajoutant un standard interne de concentration connue. Les concentrations des composés d'intérêts ont été évaluées par rapport à celle du standard interne par comparaison des aires des pics. Toutes les analyses ont été répétées trois fois. A partir de l'intégration des signaux ioniques observées en LC-MS, l'abondance relative de chaque composé flavonoïde a été calculée par intégration à l'aide de l'algorithme d'intégration, disponible sous le logiciel MassLynx V 4.1 (Waters, Manchester,

UK) par rapport à l'étalon. Les concentrations ont été exprimées en mg/g de poudre extraite. L'abondance relative des flavonoïdes dans chacun des 20 extraits de chaque plante a été estimée en additionnant les abondances relatives individuelles pour chaque composé.

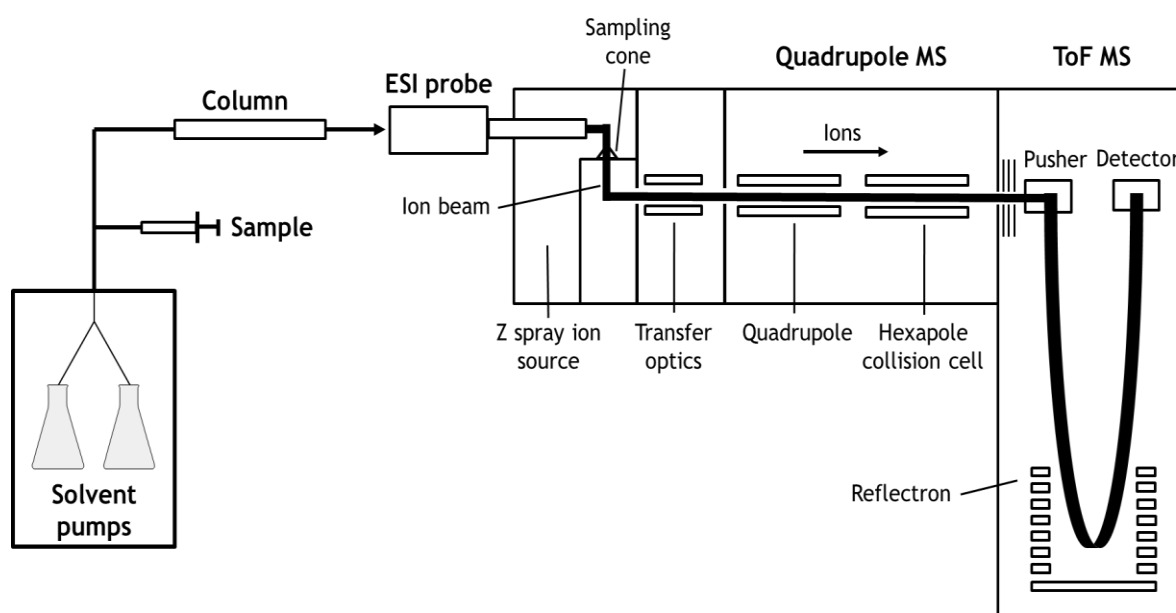


Figure 51. Représentation schématique de la HPLC couplée au spectromètre de masse Waters QToF API-US [195]

II. Résultats et discussion

II.1. Caractérisation des extraits

II.1.1. Méthodes qualitatives

II.1.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode analytique de routine dans l'analyse rapide des constituants phytochimiques et est basée sur la migration différentielle des composés contenus dans un mélange complexe en fonction de leur affinité entre une phase stationnaire (généralement le gel de silice) et une phase mobile (l'éluant, dont la composition est fonction de la nature des composés cibles). La Figure 52 présente une plaque CCM réalisée avec des extraits optimisés de *E. camaldulensis* (EC), de *C. citratus* (CC) et de 6 standards de molécules pures disponibles à savoir la quercétine (QU), la rutine (RU), l'héspéridine (HE), le naringine (NA), l'apigénine (AP) et l'acide gallique (AG). L'objectif recherché était de mettre en évidence les composés flavonoïdes présents dans chacun des extraits. Plusieurs bandes fluorescentes ont été observées sous une lampe UV à 365 nm après pulvérisation de la plaque avec le réactif de NEU (révélateur des flavonoïdes).

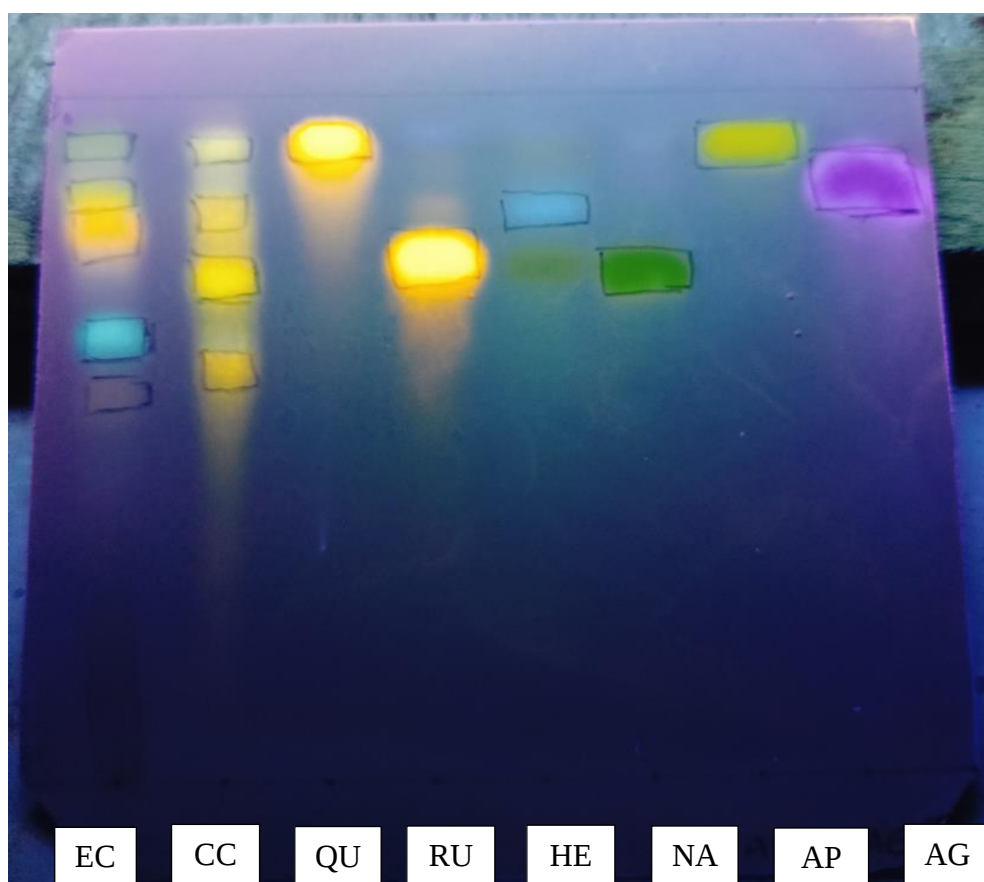


Figure 52. Photo de la plaque CCM.

Un minimum de 5 bandes fluorescentes ont été observées après migration des extraits de *E. camaldulensis* et 4 bandes provenant de la migration des extraits de *C. citratus*. Les principales colorations des bandes observées (jaune, jaune orangée, bleue claire, etc.) pourraient indiquer la présence des composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les anthocyanes, les tanins, etc. dans les extraits de ces deux plantes.

Tableau 15 : rapports frontaux des standards de flavonoïdes analysés

Composés	Quercétine	Rutine	Hespéridine	Naringine	Apigénine	Acide gallique
Rapports	0,8±0,02	0,55±0,04	0,56±0,03	0,61±0,03	0,84±0,04	0,79±0,03
frontaux	(jaune)	(orange)	(marron)	(marron)	(jaune-vert)	(bleue violacée)

De plus, à partir des comparaisons des rapports frontaux des 6 standards analysés dans les mêmes conditions (Tableau 15), on pourrait suggérer que l'extrait optimisé de *E. camaldulensis*

pourrait contenir probablement de la quercétine, de la rutine, de l'apigénine, de l'acide gallique et celui de *C. citratus* de la rutine, de l'héspéridine, de la naringine et de l'apigénine

II.1.1.2. Spectres d'analyse infrarouge (IR)

La Figure 53 présente le profil IR des extraits obtenus dans les conditions optimales d'extraction des feuilles de *E. camaldulensis* (Figure 53-EC) et de *C. citratus* (Figure 53-CC). On observe plusieurs bandes d'absorption correspondant à des vibrations des groupes fonctionnels spécifiques. Des bandes communes aux deux extraits sont observées aux nombres d'ondes suivants : 3300 ; 2900 ; 1750 ; 1570-1600 ; et 1030 cm^{-1} . La large bande observée autour de 3300 cm^{-1} est attribuable aux élongations des liaisons O-H propres aux phénols et aux sucres [196, 197] et celle apparaissant à 2900 cm^{-1} confirme la présence de liaisons C-H sur carbone sp^3 ($-\text{CH}_3$) et ($-\text{CH}_2-$) dans les deux échantillons. Au nombre d'onde autour de 1700 cm^{-1} , un épaulement important est observé sur les deux spectres FTIR indiquant la présence probable des groupes carbonyles $-\text{C}=\text{O}$ caractéristiques des cétones aromatiques ou des acides carboxyliques [196]. Ces mêmes auteurs ont aussi rapporté que les pics observés dans la région entre les nombres d'ondes 1604 et 1444 cm^{-1} pourraient être attribués aux vibrations des doubles liaisons $-\text{C}=\text{C}-$ des anneaux aromatiques. Les vibrations des liaisons C-N des amines aromatiques et des liaisons C-N des amines aliphatiques peuvent être associées respectivement aux nombres d'ondes à 1330 et 1030 cm^{-1} , avec la bande 1030 cm^{-1} de plus forte intensité [198]. Par ailleurs, la bande à 1030 cm^{-1} pourrait également indiquer la présence des liaisons $-\text{C}-\text{O}-$ des alcools, des acides carboxyliques, des esters, et des éthers [189].

Les différences majeures entre les spectres FTIR des deux plantes résident essentiellement dans l'apparition des bandes à 1515, 1450, 1180 cm^{-1} pour *E. camaldulensis* et à 1370, 1250 cm^{-1} pour *C. citratus*. Les bandes à 1450 et 1180 cm^{-1} sont attribuables respectivement aux liaisons C-H et C-OH des acides carboxyliques indiquant la présence probable des tanins hydrolysables [189], tandis que pour l'espèce *C. citratus*, les vibrations enregistrées aux alentours de 1370 et 1250 cm^{-1} pourraient être associées respectivement aux liaisons C-H des alcanes et C-O des groupes des polyols, notamment des hydroxyl-flavones et des catéchines et les sucres [189].

L'interprétation de ces résultats montre la présence d'une diversité de groupements fonctionnels dans les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. La prédominance des différents groupes fonctionnels tels que les hydroxyles (OH), les carbonyles (C=O), les carboxyliques (COOH) pourraient suggérer la présence des composés phénoliques dans les extraits analysés.

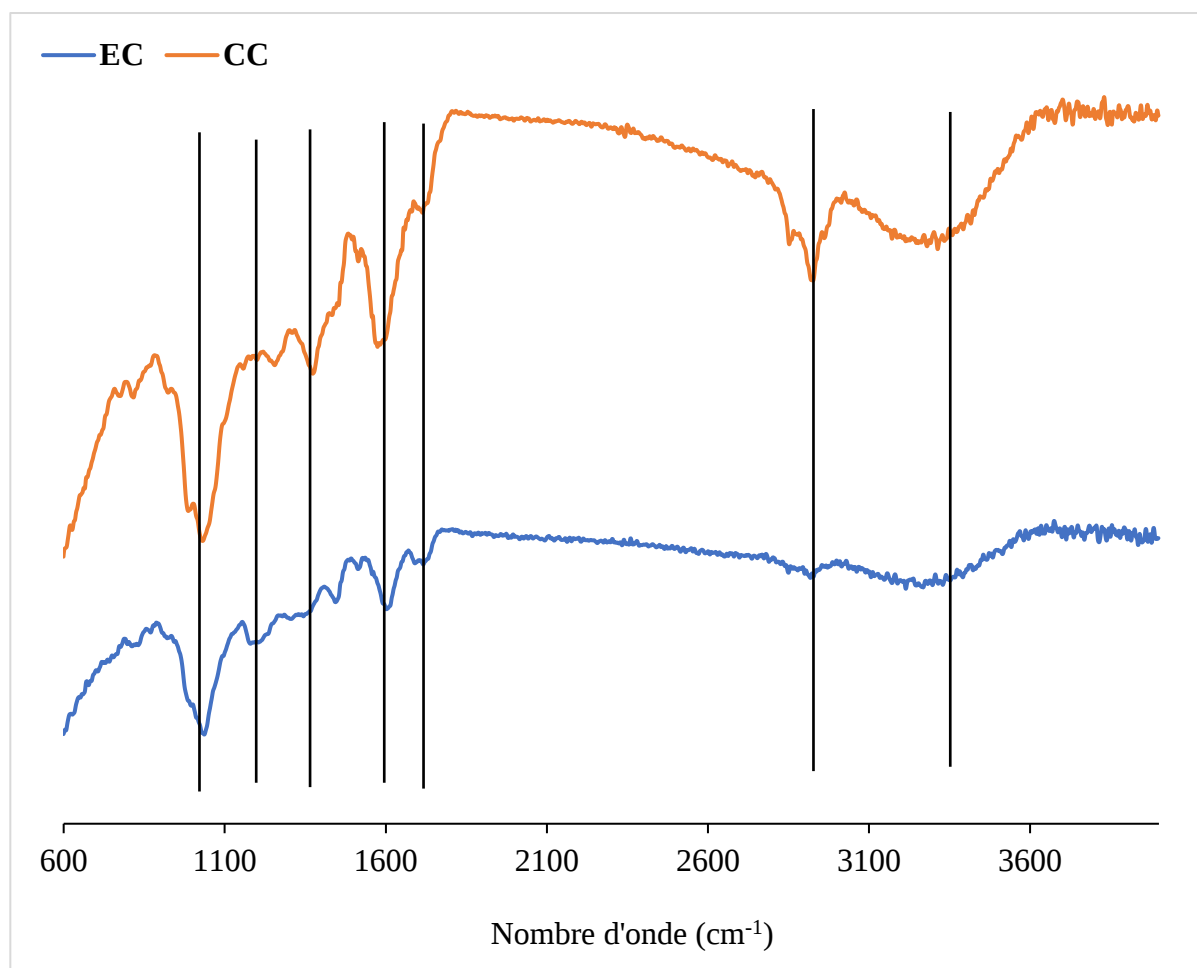


Figure 53. Spectre IR des extraits optimisés (EC-*Eucalyptus camaldulensis* ; CC-*Cymbopogon citratus*)

II.1.1.3. Spectres UV-vis de quelques standards flavonoïdes en comparaison avec les extraits bruts des deux plantes

Les caractéristiques d'absorption dans l'UV-vis des extraits bruts ont été examinées en faisant une comparaison avec les spectres d'absorption de 6 standards de composés phénoliques disponibles, à savoir la quercétine, la rutine, l'hespéridine, la naringine, l'apigénine et l'acide gallique. Les structures de ces 6 composés standards sont présentées sur la Figure 54.

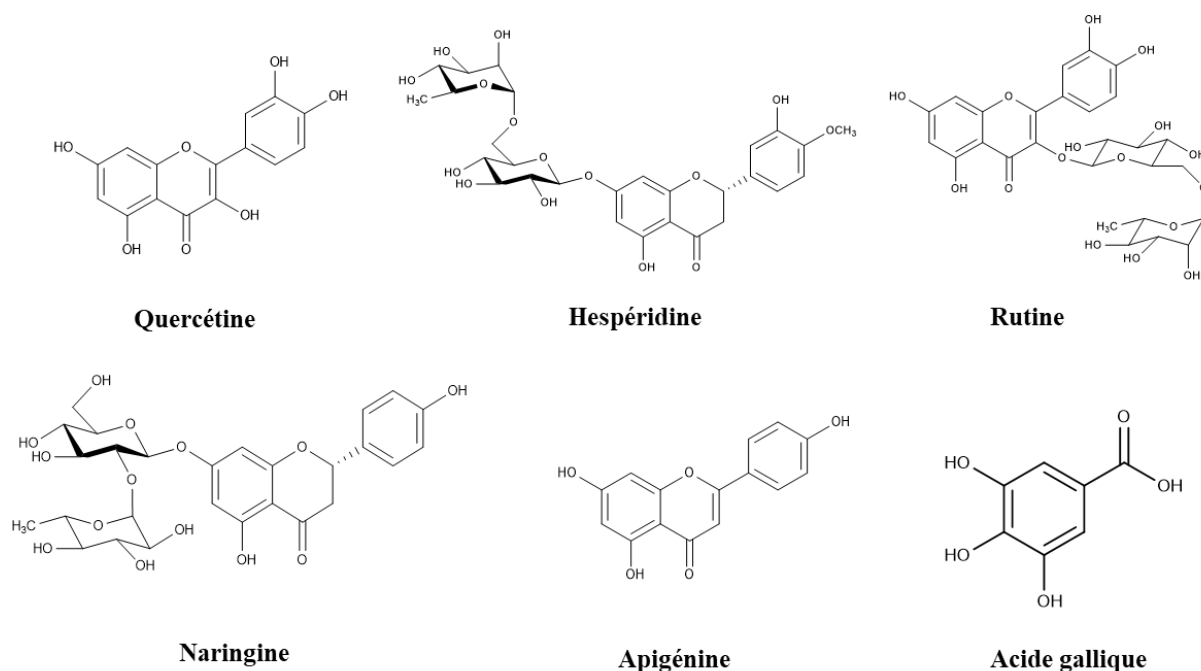


Figure 54. Structures des composés standards analysés

Le spectre d'absorption UV-vis de la quercétine a présenté deux fortes absorbances à 260 nm et 370 nm (Figure 55) et est quasiment identique à celui de la rutine dont les bandes d'absorption élevées sont observées à 260 nm et 360 nm. Cette forte ressemblance entre les spectres UV-vis de ces deux composés est probablement liée au fait que la rutine est un flavonoïde *O*-diglycosylé à aglycone quercétinique et que ces deux molécules font partir de la même famille, à savoir les flavonols. De même, les spectres UV-vis de l'hespéridine et de la naringine se superposent quasiment avec une absorption maximale environ 280 nm suivie d'un léger épaulement autour de 330 nm (Figure 55). Ces deux molécules sont de la famille des flavanones avec l'hespéridine étant un dérivé 7-*O*-rutinoside de l'hespérétine (aglycone) et la naringine, un dérivé rutinoside de la naringénine (aglycone). L'apigénine qui est un flavonoïde de type flavone, son spectre UV-vis a montré deux bandes d'absorption maximale, à savoir une première bande plus étroite observée autour de 260 nm et une deuxième très large observée à 330 nm. Enfin, le spectre UV-vis de l'acide gallique a présenté une unique bande d'absorption intense observée autour de 280 nm et qui semble être proche des caractéristiques des spectres d'absorption des acides phénoliques [199].

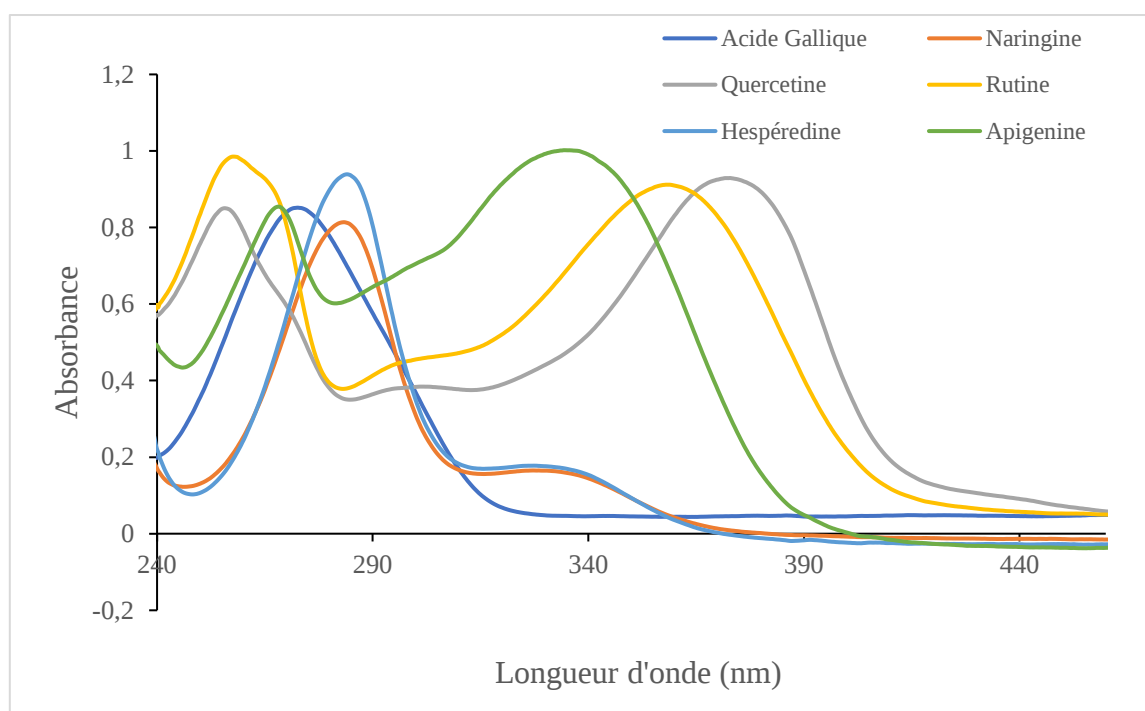


Figure 55. Spectres UV-visibles de quelques standards phénoliques

Quant aux spectres UV-vis des extraits bruts optimisés, il a été observé une bande d'absorption maximale de l'extrait optimisé de Eucalyptus (EO) aux environs de 280 nm, tandis que celui de Cymbopogon Optimisé (CO) a montré deux bandes d'absorption observées respectivement à 280 nm et 330 nm (Figure 56).

En se basant sur les différentes caractéristiques d'absorption ci-dessus décrites, on pourrait soupçonner la présence probable de la quercétine, la rutine et l'acide gallique dans l'extrait EO tandis que le naringine, l'hespéridine et l'apigénine pourraient être rencontrés dans l'extrait CO.

De manière générale, l'analyse des spectres UV-vis a été bénéfique, car elle a permis de fournir certaines informations préliminaires sur la présence de certains composés ou groupes de composés dans les deux extraits optimisés.

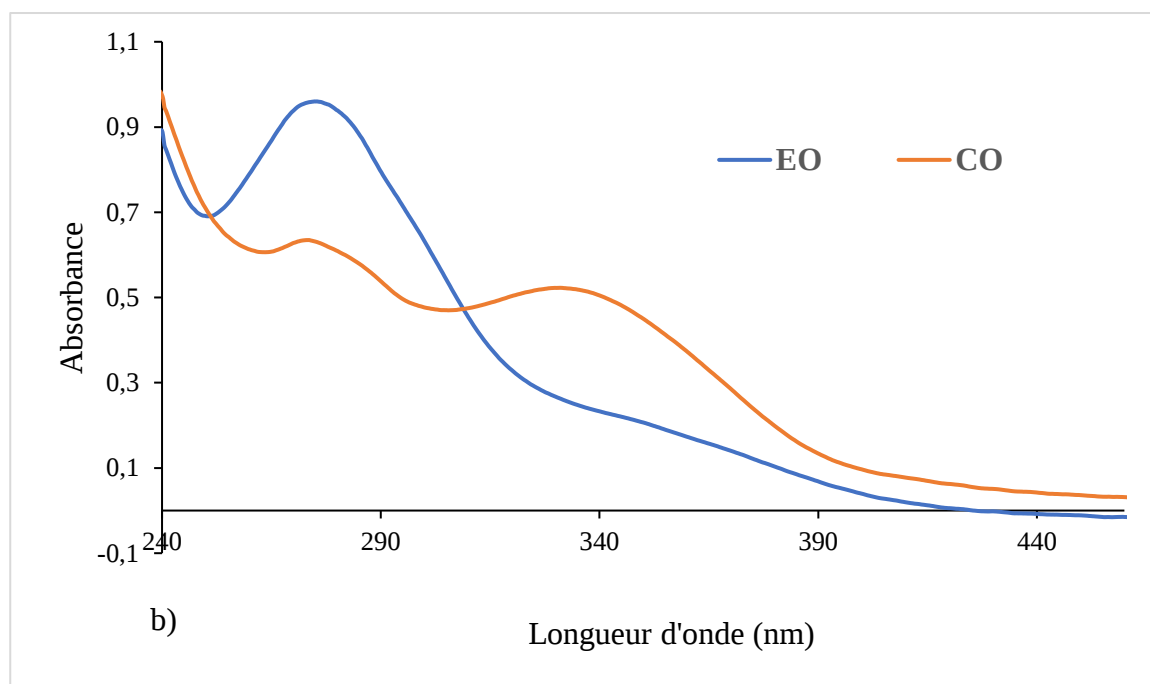


Figure 56. Spectres UV-visibles des extraits optimisés de *Eucalyptus camaldulensis* (EO) et de *Cymbopogon citratus* (CO))

II.1.1.4. Analyse thermogravimétrique (ATG) : étude de la stabilité thermique des constituants par pyrolyse

L'analyse par ATG est un outil de choix non seulement dans la caractérisation thermique de la biomasse mais aussi des extraits secs végétaux. Elle a été utilisée dans cette étude dans le but de fournir via un processus de pyrolyse, des informations capitales sur les différentes phases de décomposition thermique des substances contenues dans les extraits en fonction de la température et du temps.

Plusieurs phases de décomposition thermique ont été observées en fonction de la température de chauffe et sont spécifiques du type d'extrait (Tableau 16). Ainsi, on observe sur la courbe dTG de l'extrait de *E. camaldulensis* (Figure 57-a) 4 phases (I, II, III, IV), tandis que l'extrait de *C. citratus* (Figure 57-b) a présenté principalement 3 phases (I, II, III). La phase I en général correspondrait à la phase d'élimination de l'humidité (évaporation de l'eau résiduelle) dans ces deux échantillons d'extraits [200, 201]. Par ailleurs, certains composés volatils ou de faibles poids moléculaires peuvent aussi être dégradés durant cette première phase [201]. Des pertes de 7,2% et 21,6% ont été respectivement enregistrées dans les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. L'espèce *C. citratus* semble contenir particulièrement une diversité de composés mono et sesquiterpènes et bien d'autres composés à faibles poids moléculaires susceptibles d'être dégradés à basse température [50]. Ceci pourrait justifier en partie cette perte importante

de masse observée comparativement à l'extrait de *E. camaldulensis* au cours de la phase d'élimination d'eau. Quant à la phase II, elle est comprise entre 104 à 255°C pour l'espèce *E. camaldulensis* et entre 196 à 510°C pour *C. citratus* et serait associée à des dégradations importantes de plusieurs composés organiques notamment des composés terpéniques de haut poids moléculaires [198, 202]. Les pertes de masses observées étaient de 19,2% et 41,0% respectivement pour l'espèce *E. camaldulensis* et *C. citratus*. L'extrait de *E. camaldulensis* a présenté une stabilité thermique plus grande par rapport à celui de *C. citratus* en montrant des pertes de masses assez faibles. Des tendances similaires pour l'extrait de *E. camaldulensis* avaient été rapportées par Gullon et (2017) en étudiant la stabilité thermique des extraits hydroéthanoliques des feuilles de *E. globulus* avec une bonne stabilité des constituants jusqu'aux environs de 200°C. La phase III observée aux températures comprises entre 255 à 400°C pour *E. camaldulensis* a provoqué une perte de masse d'environ 21,6% et pourrait être associée à l'élimination des principaux dérivés terpéniques [198]. En revanche, la phase III de l'extrait de *C. citratus*, détectée entre 510-765°C, mène à une perte de masse d'environ 26% et la phase IV de *E. camaldulensis* (505-725°C) entraîne une perte de masse de 47%. Ces deux phases sont attribuables à la dégradation des composés antioxydants présents respectivement dans les extraits des deux plantes [198, 202]. Au regard des différents phénomènes thermiques observés dans les deux types d'extrait analysés, on remarque que l'extrait optimisé de *E. camaldulensis* a présenté la meilleure stabilité thermique avec une $T_{50\%}$ la plus élevée (420°C) par rapport à celle de *C. citratus* qui a enregistré la $T_{50\%}$ la plus faible (350°C).

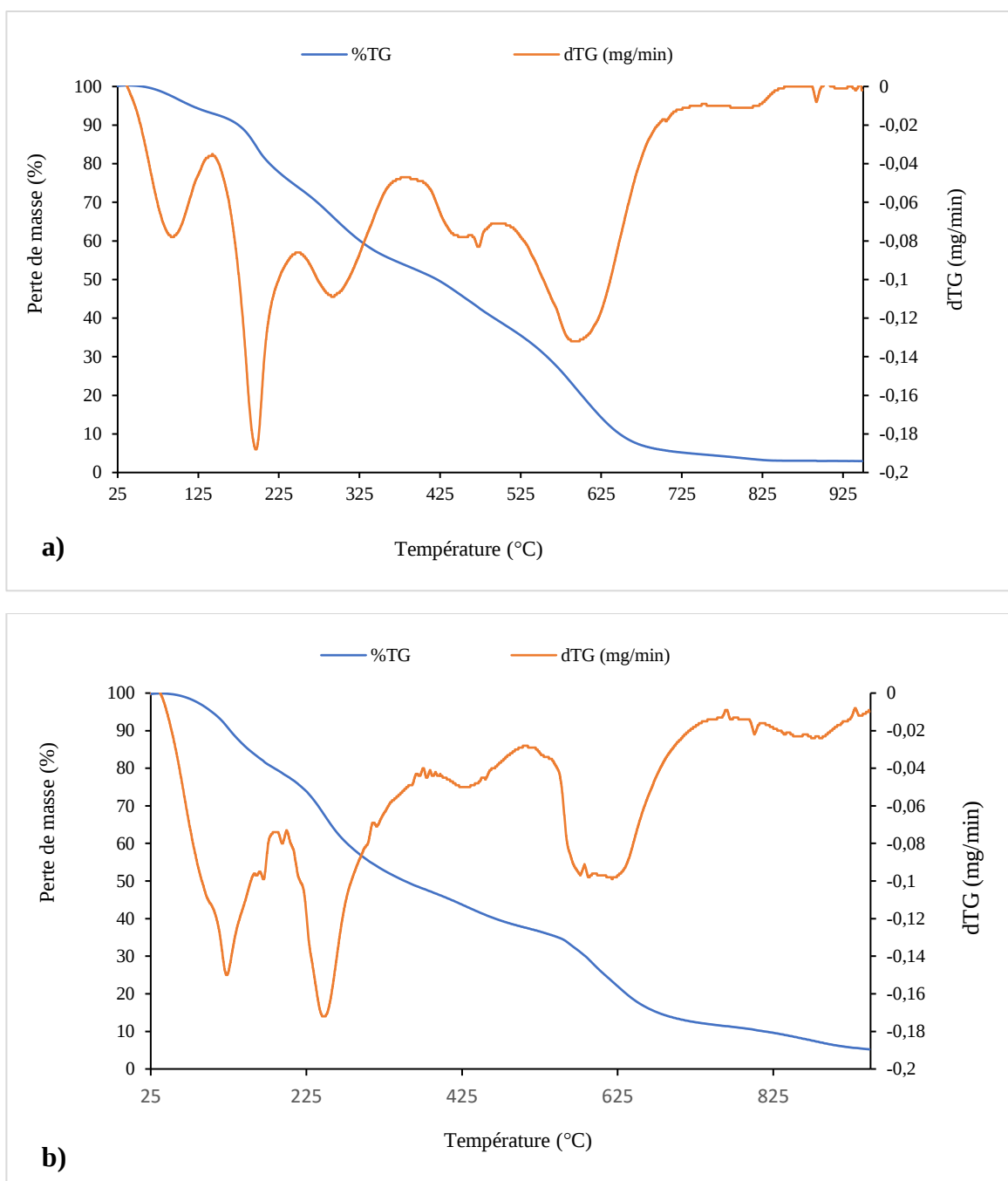


Figure 57. Thermogrammes des extraits optimisés des deux plantes en conditions de pyrolyse
(a-*E. camaldulensis* ; b-*C. citratus*)

Tableau 16 : paramètres thermiques obtenus par pyrolyse sous atmosphère inerte (N₂) des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*

Type d'extrait	Phases de décomposition	Plages de T°C	Température du pic (°C)	Pertes de masse (%)	T _{50%} (°C)
<i>E. camaldulensis</i>	I	30-140	92	7,2	420
	II	140-255	195	19,2	
	III	255-400	293	21,6	
	IV	505-725	595	47,0	
	Résidus	à 950	---	97,1	
<i>C. citratus</i>	I	25-196	122	21,6	350
	II	196-510	250	41,0	
	III	510-765	622	26,0	
	Résidus	à 950	---	94,8	

T_{50%} : température correspondante à la perte de 50% de la masse.

II.2. Caractérisation quantitative

II.2.1. Teneurs en phénoliques totaux (TPT) par spectrophotométrie UV-visible

La caractérisation quantitative a consisté à doser les TPT présents dans les différents extraits préparés en utilisant la spectrophotométrie UV-visible. Ainsi, dans les conditions optimales d'extraction, les teneurs en composés phénoliques totaux étaient de 342,8 mg EAG/g et 238,8 mg EAG/g respectivement pour l'espèce *E. camaldulensis* et *C. citratus*. On note une différence significative entre les teneurs en composés phénoliques présents dans ces deux espèces, ce qui probablement liée aux propriétés intrinsèques des deux espèces de plante. En outre, la variation importante des teneurs en polyphénols totaux obtenues lors de l'élaboration de la MSR indique que, pour une même espèce, la variation des paramètres d'extraction a une influence significative sur la récupération des composés phénoliques. Des teneurs en polyphénols totaux de 110,1 mg EAG/g obtenues à partir d'une fraction aqueuse des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* et inférieures aux nôtres avaient été rapportées par Singab et al. (2011) [127]. De même, Sourabié et al. (2020) ont récemment rapporté qu'une teneur en polyphénols totaux de 145,1 mg EAG/g pouvait être obtenue à partir des feuilles de *E. camaldulensis* en effectuant une décoction aqueuse dans les conditions de ratio liquide-solide de 10 mL/g et durant 30 min. Dans le même sens, des travaux réalisés sur des feuilles de *C. citratus* ont permis également de mettre en évidence des teneurs assez importantes en phénoliques totaux. Des teneurs de 71,9

mg EAG/g et 116 mg EAG/g ont récemment été trouvées dans des extraits à base des feuilles de *C. citratus* respectivement par Muala et al. (2021) [93] et Naseem et al. (2021) [129].

Ces résultats indiquent que les espèces *E. camaldulensis* et *C. citratus* constituent des sources potentielles en composés phénoliques et quantifiables au spectrophotomètre en utilisant le réactif Folin-ciocalteu (FCR).

II.2.2. Teneurs en flavonoïdes majeurs par analyse LC-MS

Les composés flavonoïdes majoritairement présents dans les extraits des deux plantes ont fait l'objet de quantification au moyen d'un standard interne de concentration connue. Cette analyse a permis d'obtenir des concentrations de 24,7 mg/g et 51,1 mg/g d'extrait des principaux composés flavonoïdes présents respectivement dans les extraits des feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. La détermination des teneurs en utilisant cette méthode offre une précision maximale quant aux teneurs exactes des composés présents dans les extraits.

II.3. Identification des flavonoïdes majeurs par analyse LC-MS

L'identification structurale des composés majeurs présents dans les extraits notamment les composés flavonoïdes est d'un intérêt capital dans l'atteinte des objectifs de cette thèse. L'analyse LC-MS est une méthode analytique efficace pour la détermination structurale des composés flavonoïdes présents dans un mélange complexe. En fonction des caractéristiques structurales des molécules, elle attribue un temps de rétention spécifique à chaque composé présent dans l'échantillon. Dans les travaux de thèse de Semay (2023), [13] sur l'analyse des flavonoïdes par LC-MS, il a été rapporté que les flavonoïdes sont de manière générale élués par ordre décroissant du degré de glycosylation. Les composés tri- et di-glycosylés sont élués en première position (entre 10 à 15 min), suivis des mono-glycosylés (autour de 15 min) et enfin les aglycones (plus hydrophobes) sont élués entre 18 à 20 minutes. Quant aux flavonoïdes comportant une unité d'acide uronique, ils sont détectés au-delà de la 20^{ième} minute de run en utilisant une colonne LC de type C18 [195].

Ainsi, après l'obtention des extraits dans les différentes conditions du plan d'expérience et les extraits optimisés de chacune des deux plantes, nous avons dans un premier temps procédé à l'identification structurale des composés cibles majeurs, puis dans un second temps à l'évaluation de leurs teneurs respectives (Figure 58).

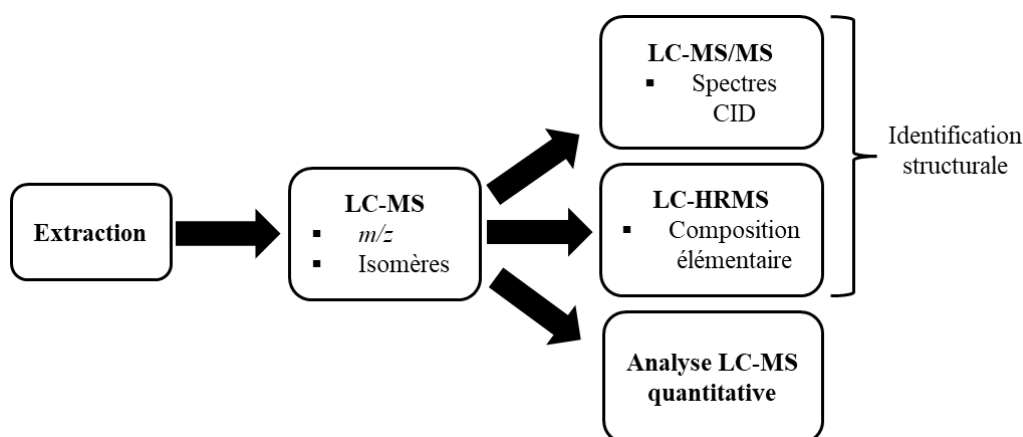


Figure 58. Flux analytique général utilisé pour l'analyse des extraits de plantes [195]).

II.3.1. Flavonoïdes des extraits de *Eucalyptus camaldulensis*

D'après l'analyse des expériences LC-MS présentées dans le Tableau 17, 8 composés principaux sont détectés sous forme d'ions $[M-H]^-$ et sont caractérisés par 7 temps de rétention différents ($TR = 12,2 ; 13,2 ; 14,1 ; 15,6 ; 16,7 ; 17,3$ et $19,0$ min) et 7 compositions élémentaires. Il est intéressant de noter que les deux isomères détectés ne sont pas des molécules co-éluées. Le courant ionique total (TIC) de l'extrait optimisé et le chromatogramme extrait de tous les composés sont présentés dans l'annexe 1 (Figure IS.1.). En utilisant 4 standards flavonoïdes disponibles dans le commerce, à savoir la quercétine 3-*O*-rutinoside, la quercétine 3-*O*-glucoside, la quercétine 3-*O*-glucuronide et le kaempférol 3-*O*-glucuronide, comme molécules de référence, 4 (sur 8) molécules ont été facilement identifiées comme étant de la quercétine 3-*O*-rutinoside (**4** ; $TR = 14,1$ min ; m/z 609) ; quercétine 3-*O*-glucoside (**5** ; $TR = 15,6$ min ; m/z 463), quercétine 3-*O*-glucuronide (**7** ; $TR = 17,3$ min ; m/z 477) et kaempférol 3-*O*-glucuronide (**8** ; $TR = 19,0$ min ; m/z 461) (Tableau 3). Ces 4 flavonoïdes ont été précédemment identifiés dans les extraits de *E. camaldulensis* et de plusieurs autres espèces du genre *eucalyptus* [203]–[205]. Les chromatogrammes ainsi que les spectres de masses CID de l'ensemble des 8 composés identifiés des extraits optimisés de *E. camaldulensis* sont disponibles en Annexe.1.

Tableau 17 : Informations structurales des flavonoïdes identifiés dans l'extrait optimisé de *E. camaldulensis*.

Com- posés	TR (min)	Composition élémentaire [M-H] ⁻	m/z [M-H] ⁻	Masses exactes	Δ (ppm)	Unités glycanes	Aglycones	Quantificatio n (mg/g)
1	12,2	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆ ⁻	595	595,1299	5,7	O-hexoside +118 u	Isorhamnétine	0,48±0,00
2	12,2	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431	431,0978	5,6	C-hexoside	Apigénine	0,79±0,00
3	13,2	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻	431	431,0978	2,8	C-hexoside	Apigénine	1,50±0,00
4	14,1	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609	609,1456	5,9	3-O-rutinoside	Quercétine	0,71±0,00
5	15,6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463	463,0877	6,5	3-O-glucoside	Quercétine	1,05±0,00
6	16,7	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593	593,1506	0,2	O-hexose-rhamnose	Kaempférol	0,58±0,01
7	17,3	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ ⁻	477	477,0669	0,4	3-O-glucuronide	Quercétine	5,80±0,30
8	19,0	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂ ⁻	461	461,0720	2,2	3-O-glucuronide	Kaempférol	14,79±0,50

Δ (ppm) : Erreur de masse en parties par million (ppm) ; TR : temps de rétention (min). Les compositions élémentaires basées sur les mesures des masses exactes ont été déterminées par analyse MS à haute résolution et chaque composé a été quantifié (mg/g) en utilisant la quercétine comme étalon interne

Les 4 autres composés (**1**, **2**, **3** et **6**) ont été provisoirement identifiés sur la base des expériences LC-MS/MS étayées par des données de la littérature (Tableau 17). Les expériences de dissociations induites par collisions (CID – Collision-induced Dissociation) sur les ions flavonoïdes sont généralement réalisées à basse énergie cinétique (~15 eV) et à haute énergie cinétique (~45 eV) pour générer des données complémentaires. À basse énergie cinétique, la plupart des éliminations des sucres sont générées, ce qui permet de distinguer les O- des C-glycosides, de déterminer la composition de l'aglycone et de différencier les di-O-glycosides des O-diglycosides [136, 206]. À une énergie cinétique plus élevée, des décompositions (consécutives) des ions aglycones sont induites et fournissent des informations clés sur la structure de l'aglycone [136].

En ce qui concerne le composé **1** (TR = 12,2 min ; m/z 595), la molécule déprotonée [M-H]⁻ a été détectée à m/z 595 et, sur la base de la mesure de la masse exacte, une composition C₂₆H₂₇O₁₆⁻ a été déterminée pour les ions chargés négativement. Le spectre de masse CID du composé **1** (15 eV) est présenté en *Annexe.1* et montre des pertes consécutives de 118 u (fragment inconnu) et de 162 u (hexoside) pour obtenir les ions aglycones détectés à m/z 315. Dans des conditions d'énergie cinétique élevée (45 eV), les ions aglycones ont subi une décomposition caractéristique de l'aglycone isorhamnétine [205, 207].

Les composés **2** (TR = 12,2 min ; m/z 431) et **3** (TR = 13,2 min ; m/z 431) ont été identifiés comme deux isomères de C-glycosides de flavonoïdes (Tableau 17). En effet, étant donné que les flavonoïdes C-glycosylés présentent une forte liaison C-C glycane/aglycone, les clivages croisés des anneaux de sucre deviennent plus favorables que la perte de sucre et les spectres de masse CID n'affichent pas les ions aglycones [134]. Au lieu de cela, les pertes neutres de 90 et 120 u des ions précurseurs m/z 431 génèrent les ions fragment m/z 341 [(M-H)-90]⁻ et m/z 311 [(M-H)-120]⁻ qui caractérisent la C-glycosylation. Les ions fragments détectés à m/z 311 peuvent indiquer que l'aglycone est l'apigénine (MW = 270 g/mol). Les ions **2** et **3** peuvent donc correspondre aux isomères 6-C et 8-C de l'hexoside d'apigénine [134, 208, 209]. Les spectres de masse CID à 15 eV et 45 eV sont disponibles en *Annexe.1*.

Enfin, en ce qui concerne la molécule **6** (TR = 16,7 min ; m/z 593), le spectre de masse CID enregistré à faible énergie cinétique présente une perte unique de disaccharide de 308 u qui pourrait correspondre à une perte d'hexose-rhamnose, donnant les ions aglycones à m/z 285, susceptibles d'être associés au kaempférol. La séquence de sucres sur l'aglycone a été déterminée par des expériences CID en mode d'ionisation positive avec l'observation des pertes neutres consécutives de rhamnose (146 u) et d'hexose (162 u). En plus des pertes de masse caractéristiques, la perte de l'ensemble de la fraction disaccharide en mode d'ionisation négative implique que le rhamnose et l'hexose constituent une fraction disaccharide [210, 211].

Outre les 8 composés flavonoïdes glycosylés identifiés, d'autres signaux significatifs ont été détectés à m/z 475, m/z 503 et m/z 1255. Ces pics pourraient être attribués à des composés phénoliques tels que des tanins hydrolysables ou des acides phénoliques qui sont souvent détectés à des teneurs élevées dans des extraits de l'espèce *E. camaldulensis* ou d'autres espèces du genre eucalyptus [190, 212].

II.3.2. Flavonoïdes des extraits de *Cymbopogon citratus*

Pour l'espèce *C. citratus*, les expériences LC-MS réalisées ont permis de détecter 10 composés majeurs sous forme d'ions pseudo-moléculaires présentés dans le Tableau 18 avec 10 temps de rétention spécifiques et 7 compositions élémentaires différentes indiquant ainsi la présence de 6 isomères. Le courant ionique total (CIT), le courant ionique extrait (CIE) ainsi que les spectres de masse CID de tous les 10 composés identifiés dans les extraits de *C. citratus* sont disponibles en *Annexe.2*.

Ces 10 composés détectés ont essentiellement été identifiés sur la base des résultats des expériences LC-MS/MS et LC-HRMS effectuées et soutenus par des données de la littérature

(Tableau 18). Les analyses LC-HRMS ont permis d'attribuer à chacun des 10 composés une composition élémentaire spécifique avec des erreurs de masse $\leq 1,7$ ppm.

Pour le composé **1** (TR = 10,2 min ; m/z 579), les ions pseudo-moléculaires de la molécule déprotonée $[M-H]^-$ ont été détectés à m/z 579. La mesure de la masse exacte a indiqué une composition élémentaire de $C_{26}H_{27}O_{15}^-$ en mode d'ion négatif. Le spectre de masse CID (15 eV) a présenté des ions fragments caractéristiques respectivement à m/z 489 $[(M-H)-90]^-$ et à m/z 459 $[(M-H)-120]^-$ au départ des ions pseudo-moléculaires m/z 579 $[M-H]^-$ (Annexe 1 ; Figure IS.10). Selon les données de la littérature, la perte de ces fragments neutres (90 u; 120 u) caractérisent une C-glycosylation (hexose) dont la dissociation a lieu à l'intérieur du cycle saccharide (fragmentation croisée), [134]. Ensuite, des ions fragment détectés à m/z 399 et 369 ont été observés et correspondent respectivement à $[(M-H)-120-60]^-$ et $[(M-H)-120-90]^-$, ce qui caractérisent la présence d'une nouvelle C-glycosylation et cette fois-ci avec comme unité saccharide, un pentose. Les ions fragment à m/z 399 sont donc constitués de la masse de l'aglycone (285 u) + la masse d'un fragment de l'hexose (42 u) + la masse d'un fragment du pentose (72 u), de même que m/z 369 est composé de la masse de l'aglycone (285 u) + de la masse d'un fragment de l'hexose (42 u) + la masse d'un fragment du pentose (42 u). Ce schéma de fragmentation a déjà été décrit dans la littérature [208, 213]. Le composé **1** a donc été identifié comme un dérivé de la lutéoline : la lutéoline 6-C-hexosyl-8-C-pentosyl. Ce composé a déjà été identifié dans les extraits de *C. citratus* [208].

Les composés **2** & **9** sont deux isomères détectés aux temps de rétention respectifs de 11,0 min et 15,1 min avec un rapport masse sur charge de la molécule déprotonée m/z 563 $[M-H]^-$:

- ✓ Les analyses CID (15 eV et 45 eV) du composé **2** a présenté un schéma de fragmentation menant aux ions fragment à m/z 545 $[(M-H)-18]^-$, m/z 503 $[(M-H)-60]^-$, m/z 473 $[(M-H)-90]^-$. Ces ions fragment sont caractéristiques d'une C-pentosyl flavone [213]. De plus, des ions fragment à m/z 443 $[(M-H)-120]^-$, m/z 383 $[(M-H)-180]^-$ et m/z 353 $[(M-H)-210]^-$ mettent en évidence une dissociation croisée au sein d'un cycle hexose (présence d'une C-glycosylation) ou les ions fragment m/z 353 seraient composés de la masse de l'aglycone (A) + celles des deux morceaux du pentose et de l'hexose (m/z 353 (A+84)). On obtient donc une masse de l'aglycone déprotoné de 269 attribuable à l'apigénine (MW 270). Le composé **2** a alors été identifié comme étant de l'apigénine 6-C-pentosyl-8-C-glucosyl ou de l'apigénine 6-C-hexosyl-8-C-pentosyl. En outre, nous notons que l'apigénine 6-C-pentosyl-8-C-hexosyl a déjà été identifié dans des extraits de feuilles de *C. citratus* [208].

- ✓ Par ailleurs, le composé **9** a montré un mode de fragmentation différent de celui précédemment décrit en analyse CID (15 eV). Des ions fragment ont été détectés à m/z 473 [(M-H)-90]⁻ et m/z 417 [(M-H)-146]⁻ indiquant la présence d'un C-déoxyhexosyl flavone [213]. Ensuite, la détection des ions fragment à m/z 399 [(M-H)-146-18]⁻, m/z 357 [(M-H)-146-60]⁻, m/z 327 [(M-H)-146-90]⁻ correspondrait à une dislocation croisée d'un cycle pentosyl lié à l'aglycone via une liaison C-C avec libération d'une molécule d'eau. Ceci suggère que les ions fragments à m/z 327 correspondraient à la masse de l'aglycone (A + 42 u) donnant ainsi une masse de 285 u, probablement de la lutéoline. Le composé **9** a donc été provisoirement identifié comme étant un dérivé de la lutéoline : la lutéoline 6-C-rhamnosyl-8-C-pentosyl ou la lutéoline 8-C-rhamnosyl-6-C-pentosyl.

Les composés **3** et **8** sont également deux isomères apparus aux temps de rétention respectifs de TR = 11,7 min et TR = 14,1 min avec des ions pseudo-moléculaires à m/z 593 [M-H]⁻ :

- ✓ Les expériences CID (15 eV ; 45 eV) des ions **3** ont fourni des ions fragments à m/z 503 [(M-H)-90]⁻ et m/z 473 [(M-H)-120]⁻ indiquant la présence d'un C-hexosyl flavone. Par contre, la présence des ions fragment à m/z 447 [(M-H)-146]⁻ montre l'élimination entière d'une unité déoxyhexose mettant en évidence une O-glycosylation. D'autres éliminations consécutives ont aussi été détectées à m/z 429 [(M-H)-146-18)], m/z 357 [(M-H)-146-90)], m/z 327 [(M-H)-120]⁻ qui caractérisent une C-glycosylation avec les ions fragment à m/z 327 correspondant à la masse de l'aglycone + 42 u. Ceci mène globalement à une masse de 285 u pour l'ion fragment aglycone de type flavone, dont l'identité probable est de la lutéoline. Le composé **3** est par conséquent attribuable à la lutéoline 6-C-hexosyl-2''-O-rhamnoside ou encore appelé de l'isoorientine 2''-O-rhamnoside. La présence de cette molécule dans les extraits des feuilles de *C. citratus* a aussi été rapporté par Figueirinha et al. (2008) [208].
- ✓ Quant au composé **8**, des fragments caractéristiques ont été observés à la suite des expériences CID réalisées à 15 eV et 45 eV. En effet, la détection des ions fragment à m/z 447 [(M-H)-146]⁻ suivi des ions m/z 285 [(M-H)-146-162]⁻ à partir des ions pseudo-moléculaires à m/z 593 [M-H]⁻, caractérise des pertes successives d'une unité rhamnose (146 u) et d'une unité hexose (162 u). L'information structurale fondamentale est la présence d'une liaison de type O-diglycosylé entre l'aglycone et la fraction glycane. De plus, l'intensité relativement importante du signal correspondant aux ions fragment m/z 447 suggère que le rhamnose en position terminale serait rattaché à l'hexose via une

liaison ($I \rightarrow 2$) d'après les travaux rapporté par Cuyckens et Claeys, (2004) [134]. A des énergies de collision élevées (45 eV), le spectre CID des ions fragment de l'aglycone (m/z 285) a montré des fragments caractéristiques attribuables à de la lutéoline. Ainsi, le composé **8** a été identifié comme étant de la lutéoline 7-*O*-néohespéréside, un composé précédemment identifié dans des extraits des feuilles de *C. citratus* [208].

Le composé **4** (TR = 11,9 ; m/z 549 [M-H]⁻) dont l'analyse CID à 15 eV a présenté des ions fragment successifs à m/z 531 [(M-H)-18], m/z 489 [(M-H)-60], et m/z 459 [(M-H)-90] met en évidence la présence d'une C-pentosyl flavone- [134], [208]. De plus, d'autres fragments détectés à m/z 441 [(M-H)-90-18]⁻, m/z 399 [(M-H)-90-60]⁻ et m/z 369 [(M-H)-90-90]⁻ indique à nouveau la présence d'un C-pentosyl flavone. Ceci suggère que la masse du fragment à m/z 369 correspondrait à celle de l'aglycone + 84 u. On obtient alors un rapport m/z 285 qui pourrait indiquer la présence de la lutéoline. Le composé **4** a ainsi été identifié comme étant de la lutéoline 6-C-pentosyl-8-C-pentosyl, un composé déjà mis en évidence dans les extraits des feuilles de *C. citratus* [208].

Pour le composé **5** (TR = 13,2 min ; m/z 447 [M-H]⁻), le spectre CID à 15 eV indique une élimination d'une unité hexose (162 u) donnant des ions fragment aglycone à m/z 285 [(M-H)-162]⁻. Une telle élimination met en évidence la présence d'une *O*-glycosylation entre l'aglycone et la fraction glycane. A haute énergie de collision (45 eV), ces ions fragment aglycone ont présenté un schéma de fragmentation caractéristique qui peut être associé à de la lutéoline. Le composé **5** a donc été identifié comme étant de la lutéoline *O*-glucoside, déjà détecté dans les extraits de *C. citratus* [208].

Le composé **6** (TR = 13,3 ; m/z 577 [M-H]⁻) et le composé **7** (TR = 14,0 ; m/z 577 [M-H]⁻) sont deux isomères détectés dans les extraits avec des schémas de fragmentation assez différents en analyse CID :

- ✓ Sur le spectre CID des ions du composé **6**, on retrouve des ions fragments à m/z 457 [(M-H)-120]⁻, m/z 413 [(M-H)-120-44]⁻, et m/z 293 [(M-H)-120-44-120]⁻. Ces fragments pourraient être issus des fragmentations croisées à l'intérieur de deux cycles hexoses (di-C-glycosylés) avec élimination d'un fragment neutre (44 u) qui pourrait être une molécule de CO₂. Par conséquent, les ions fragment à m/z 293 constitueraient une combinaison de la masse de l'aglycone + 24 u. Cela mène à une masse des ions de l'aglycone à m/z 269 (MW = 270) attribuable à de l'apigénine. Le composé **6** a donc été identifié comme étant de l'apigénine 6-C-hexosyl-8-C-rhamnosyl ou apigénine 6-C-rhamnosyl-8-C-hexosyl [214].

- ✓ Quant à l'isomère (composé **7**), le spectre CID indique une perte d'une unité hexose à partir des ions pseudo-moléculaires m/z 577 $[M-H]^-$ pour donner des ions fragment à m/z 415 $[(M-H)-162]^-$, cela soutient l'hypothèse de la présence d'une O-hexosyl flavone. De plus, d'autres ions fragment ont aussi été détectés à m/z 353 $[(M-H)-162-62]^-$, m/z 325 $[(M-H)-162-90]^-$, m/z 311 $[(M-H)-162-104]^-$, m/z 297 $[(M-H)-162-118]^-$, et m/z 285 $[(M-H)-162-130]^-$. Ces ions fragments pourraient provenir des fragmentations croisées d'une unité de déoxyhexose (146 u). Ainsi, on démontre que les ions fragment à m/z 285 correspondraient à la masse combinée de l'aglycone + 16 u (second morceau du déoxyhexose). On obtient alors un rapport masse sur charge m/z 269 correspondant à de l'apigénine ionisée (MW = 270). Le composé **7** peut donc être attribué à de l'apigénine 6-C-rhamnosyl-7-O-hexosyl.

Le spectre CID relatif au composé **10** (TR = 16,2 ; m/z 575 $[M-H]^-$) a montré un signal pour les ions fragment caractéristiques à m/z 429 $[(M-H)-146]^-$ et à m/z 411 $[(M-H)-146-18]^-$ mettant en évidence l'élimination d'une unité de déoxyhexose suivie d'une molécule d'H₂O. La perte de l'unité déoxyhexose met en évidence la présence d'une liaison O-glycosylée. Des fragmentations plus poussées sont nécessaires afin de mieux élucider l'identité exacte de ce composé. Par ailleurs, les travaux rapportés par Figueirinha et al. (2008) [208] sur des extraits des feuilles de *C. citratus* ont montré des fragments supplémentaires issus de ce composé notamment à m/z 367 ; m/z 357 ; m/z 337. Ce composé a été partiellement identifié par ces auteurs comme étant un dérivé de la lutéoline (lutéoline C-(6-déoxy-pento-hexos-ulosyl)-X''-O-rhamnosyl).

Tableau 18 : informations structurales des flavonoïdes identifiés dans l'extrait optimisé de *C. citratus*.

Com- posés	TR (min)	Composition élémentaire [M-H] ⁺	m/z [M-H] ⁺	Masses exactes	Δ (ppm)	Unités glycanes	Aglycones	Quantification (mg/g)
1	10,2	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ ⁺	579	579,1350	1,7	6-C-hexosyl-8-C-pentosyl	Lutéoline	3,2±0,1
2	11,0	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁺	563	563,1401	0,7	6-C-pentosyl-8-C-hexoside	Apigénine	7,5±0,4
3	11,7	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁺	593	593,1506	0,3	6-C-glucosyl-2''-O-rhamnose	Lutéoline	9,7±0,2
4	11,9	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄ ⁺	549	549,1244	0,7	6-C-pentosyl-8-C-pentoside	Lutéoline	4,5±0,4
5	13,2	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁺	447	447,0927	0,4	O-glucoside	Lutéoline	4,3±0,2
6	13,3	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ ⁺	577	577,1557	1,6	6-C-glucoside-8-C-rhamnopyranoside	Apigénine	1,7±0,1
7	14,0	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ ⁺	577	577,1557	1,6	6-C-déoxyhexoside-7-O-glucoside	Apigénine	1,3±0,2
8	14,1	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁺	593	593,1506	0,3	7-O-néohespéréside	Lutéoline	8,3±0,3
9	15,1	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ ⁺	563	563,1401	0,7	-C-rhamnosyl-C-pentoside	Lutéoline	5,0±0,2
10	16,2	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄ ⁺	575	575,1401	0,3	X''-O-rhamnosyl C-(6-déoxy-pento-hexos-ulosyl)	Lutéoline	5,7±0,1

Δ (ppm) : Erreur de masse en parties par million (ppm) ; TR : temps de rétention (min). Les compositions élémentaires basées sur les mesures des masses exactes ont été déterminées par analyse MS à haute résolution et chaque composé a été quantifié (mg/g) en utilisant la quercétine comme étalon interne

En résumé, le regard critique que nous pouvons avoir sur l'ensemble des composés flavonoïdes identifiés dans les différents extraits de ces deux plantes est que, tous les composés étaient des dérivés glycosylés, soit O-glycosylé, soit C-glycosylé ou encore O,C-diglycosylé. Tous les composés étaient principalement de la famille des flavones et des flavonols.

Si nous considérons l'espèce *E. camaldulensis*, nous avons fait le constat que les extraits contiennent une forte dominance des dérivés flavonoïdes O-glycosylés tandis que, les dérivés C-glycosylés étaient à une proportion relativement faible (en dessous de 10%). Aussi, nous avons remarqué la présence des flavonoïdes O-glycosylés dont l'unité saccharide est rattaché à un acide uronique. Ce groupe spécifique était absent dans les extraits de *C. citratus*. De plus,

les deux flavonoïdes de type uronide à savoir la quercétine *O*-glucuronide et le kaempférol *O*-glucuronide étaient les deux composés les plus abondants (environ 60%) parmi les 8 composés flavonoïdes identifiés des extraits de feuilles de *E. camaldulensis*. Cependant, aucun dérivé de *O,C*-diglycosylé n'a été détecté dans les extraits de cette espèce.

Quant à l'espèce *C. citratus*, des dérivés *O*-glycosylés, *C*-glycosylés et *O,C*-diglycosylés ont été mis en évidence respectivement à des proportions de 24,6%, 42,8% et 32,6% avec une prédominance des dérivés *C*-glycosylés. En outre, les flavonoïdes identifiés des extraits de cette plante étaient essentiellement de la famille des flavones tandis que ceux de l'espèce *E. camaldulensis* étaient composés de principalement de flavonol mais aussi de flavone.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence dans un premier temps la présence des composés phénoliques dans les extraits optimisés en appliquant des méthodes de caractérisation qualitative et aussi quantitative. Puis, dans un second temps, nous avons procédé à l'identification structurale des composés flavonoïdes majeurs présents dans chacun des échantillons d'extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* par l'analyse LC-MS. Environ une dizaine de composés flavonoïdes a été identifiée dans les extraits de chacune des deux plantes. L'espèce *E. camaldulensis* a présenté des concentrations élevées en dérivés flavonoïdes *O*-glycosylés tandis que *C. citratus* était particulièrement riche en flavonoïdes de type flavone *C*-glycosylé. Par ailleurs, étant donné que la plupart de ces molécules sont sensibles aux variations de plusieurs facteurs environnementaux, il serait intéressant d'explorer différentes conditions de stockage afin d'identifier celles permettant leur conservation optimale sur une longue durée.

***Chapitre 5 : Etude de la stabilité des extraits et
proposition d'une formulation optimisée***

Chapitre 5 : Etude de la stabilité des extraits et proposition d'une formulation optimisée

Introduction

Dans ce chapitre, l'objectif est de présenter les résultats de l'étude de la stabilité des composés bioactifs présents dans les différents échantillons d'extraits stockés sous différentes conditions de conservation. En effet, il a été démontré que les facteurs tels que la température, la forme galénique (poudre, liquide, concentration,...), la nature du solvant, le pH, la lumière, ou encore la présence d'ions métalliques ou d'oxydants, etc., peuvent influencer la stabilité des composés phénoliques durant le stockage des extraits [173, 215–218]. Par exemple, des études ont montré que l'élévation de la température ou du pH induit des dégradations rapides des flavonoïdes [173].

Le travail décrit dans ce chapitre a consisté, dans un premier temps, à évaluer l'influence de la nature du solvant, du temps de stockage et de la température de conservation sur la stabilité des composés phénoliques présents dans deux extraits optimisés, à savoir EO (Eucalyptus Optimisé) et CO (Cymbopogon Optimisé), via la détermination des TPT, des TFT ainsi que des propriétés antioxydantes (DPPH et FRAP). Les concentrations résiduelles des flavonoïdes majoritaires (TFM résiduelles) identifiés au préalable dans les deux extraits EO et CO ont été déterminées dans les différents échantillons après 150 jours de stockage par analyse en chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Dans un second temps, un plan de formulation à partir des extraits optimisés (EO et CO) des deux plantes est proposé. Les conditions d'optimisation des formulations des deux extraits ainsi que les propriétés antioxydantes ont été déterminées.

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel

Le matériel de laboratoire suivant a été utilisé :

- un four thermostatique *Arcos CT 50 SH*
- un réfrigérateur et un congélateur *LG Model N° : GR-242MF*
- une minicentrale d'acquisition des températures *ALMEMO 28909*

Les extraits optimisés des deux plantes à partir du procédé de méthodologie de surface de réponse (MSR) développé ont servi à préparer tous les échantillons pour les études de stabilité.

I.2. Méthodes

I.2.1. Description de la méthodologie d'étude de la stabilité

L'étude du vieillissement des extraits optimisés des feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* a consisté à évaluer l'influence de la nature du solvant, de la température et de la durée du stockage sur la stabilité des composés phénoliques présents dans les extraits (TPT et TFT), ainsi que leurs propriétés antioxydantes (DPPH et FRAP). Les échantillons ont donc été conditionnés sous forme liquide (aqueuse et hydro-éthanolique) et sous forme sèche. En effet, la plupart des produits phytosanitaires utilisés par les maraîchers sont acquis soit à l'état sec (sous forme de poudre) soit sous forme de solution concentrée. Dans les deux cas de figure, ces pesticides sont dilués avec de l'eau avant l'utilisation pour le traitement des cultures. Le solvant hydro-éthanolique est le meilleur solvant d'extraction des extraits retenu dans cette étude. L'étude de stabilité des extraits dissous dans ces deux solvants supports a été comparée à l'extrait sec. Aussi, les températures de stockage étudiées à savoir $T=50^{\circ}\text{C}$, $T=\text{ambiante}$ ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$), $T=4^{\circ}\text{C}$ et $T=-20^{\circ}\text{C}$, ont été choisies en lien avec les conditions météorologiques du pays, le mode de conservation des pesticides par les producteurs et les conditions de température pouvant inhiber la croissance de la plupart des microorganismes. En effet, en fonction des périodes, des températures maximales peuvent atteindre 40 à 45°C au Burkina Faso. De plus, par faute de moyen adéquat, les pesticides sont conservés à température ambiante avant l'utilisation. L'étude a été réalisée durant la période de novembre à mars (5 mois) correspondante à l'une des périodes d'activité intense de la maraîcher-culture au Burkina Faso.

Les échantillons sont préparés selon les protocoles ci-dessous :

Préparation des échantillons d'extrait sec

Un gramme (1g) d'extrait sec des feuilles de *E. camaldulensis* (EC) et de *C. citratus* (CC) est pesé dans des flacons scellés de 10 mL. Pour chaque plante, 1 flacon contenant l'extrait sec est stocké dans une enceinte à $T=4^{\circ}\text{C}$, $T=\text{ambiante}$ et $T=50^{\circ}\text{C}$. La température du $T=\text{ambiante}$ $\sim 25\pm 5^{\circ}\text{C}$, est obtenue à l'aide d'une minicentrale d'acquisition des températures. A chaque intervalle de temps de 30 jours (1 mois), 10 mg de l'échantillon sont prélevés de chaque flacon pour des analyses quantitatives. Un flacon pour chaque plante est conservé au congélateur à $T=-20^{\circ}\text{C}$ pour mener des études comparatives en référence au temps initial de stockage.

Préparation des échantillons en solution aqueuse (solvant A, H₂O)

Quatre cents milligrammes (400 mg) d'extrait sec des feuilles de *E. camaldulensis* (EC) et de *C. citratus* (CC) sont respectivement pesés puis entièrement solubilisés dans 40 mL d'eau distillée chacun sous une agitation douce afin d'obtenir des solutions de concentration de 10 mg/mL. Ces solutions sont réparties dans des flacons de 10 mL qui sont scellés hermétiquement sous azote atmosphérique. Pour chaque plante, 1 flacon contenant une solution de 10 mg/mL est stocké dans une enceinte à T = 4°C, T ambiante (~ 25±5°C) et à T = 50°C. A chaque intervalle de temps de 30 jours, 1 mL de l'échantillon est prélevé de chaque flacon pour des analyses quantitatives. Un flacon pour chaque plante est conservé au congélateur à T = -20 °C pour mener des études comparatives en référence au temps initial de stockage.

Préparation des échantillons en solution dans l'éthanol 70% (solvant B, EtOH_{70%})

Les échantillons préparés dans le solvant B (éthanol 70%) ont subi le même protocole que ceux précédemment décrits dans le cas du solvant A (eau), en utilisant les mêmes masses de poudre dissoute dans les mêmes quantités de solvant. Seul le solvant est modifié.

I.2.1.1. Dosage des teneurs résiduelles et mesure des activités résiduelles au spectrophotomètre UV-Vis

A partir des prélèvements effectués par intervalle de temps régulier (chaque 30 jours), des solutions de concentration 1 mg/mL ont été respectivement préparées pour tous les échantillons de chaque plante. Pour ce faire, pour les échantillons conservés à l'état sec, 10 mg de poudre prélevés ont été solubilisés dans 10 mL de méthanol. Par contre, pour les échantillons conservés sous forme liquide (dans l'eau ou dans l'éthanol 70%), des dilutions (10 fois) ont été réalisées au départ de 1 mL de solution prélevée de concentration 10 mg/mL.

Les teneurs en phénoliques totaux (TPT), les teneurs en flavonoïdes totaux (TFT), l'activité antiradicalaire DPPH et le pouvoir réducteur FRAP ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (*Jenway 7315*). Ces réponses ont été évaluées par intervalle de 30 jours (1 mois) sur une durée de 150 jours (5 mois). La préparation des solutions ainsi que la lecture des absorbances des solutions ont été réalisées selon les protocoles décrits dans la Section I.2.4. du Chapitre 2. Les concentrations restantes des flavonoïdes majeurs ont été déterminées par analyse LC-MS au temps initial t_0 et après 150 jours de conservation.

I.2.1.2. Quantification des teneurs restantes en flavonoïdes majoritaires par analyses LC-MS

Pour les analyses des différents échantillons en LC-MS après les 5 mois (150 jours) de conservation, des solutions de concentration à 1 mg/mL ont également été préparées selon la procédure décrite précédemment (I.2.1.1.).

Les teneurs initiales (au temps t_0) et restantes (après 150 jours) des flavonoïdes majoritaires des échantillons ont été quantifiées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) au moyen d'un standard interne (quercétine) de concentration connue. Les protocoles d'identification et de quantification utilisés sont ceux décrits dans la section I.3 du Chapitre 4

I.2.2. Description de la méthodologie du plan de formulation

Afin d'obtenir une formulation optimisée à partir des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*, la méthodologie de surface de réponse (MSR) a été appliquée via un plan composite centré de modèle quadratique. Cette approche a été utilisée pour déterminer la combinaison adéquate des extraits des deux plantes qui fournirait une efficacité optimale. Les deux espèces de plantes étudiées ont donc été considérées comme étant deux variables indépendantes avec cinq niveaux différents (-1,32 ; -1 ; 0 ; +1 ; +1,32), et à chaque niveau, une concentration spécifique est attribuée (Tableau 19). L'efficacité des combinaisons a été évaluée en mesurant l'activité antioxydante par les méthodes DPPH et FRAP (deux variables dépendantes). Au total, 14 essais ont été réalisés tel que calculé par la relation :

$$N_t : 2^k + 2 \times k + n_c$$

$$N_t = 2^2 + 2 \times 2 + 6$$

k : nombre de variables indépendantes, $k = 2$

n_c : nombre d'essai au centre du domaine d'étude, $n_c = 6$ essais
(qui est dépendant de l'opérateur).

Le logiciel Design-Expert 13 (version 13.0.5.0) a été utilisé pour générer le plan d'expérimentation ainsi que pour le traitement des données expérimentale. Les variables réponses ont été prédites sous formes de régression polynomiale de second ordre.

Tableau 19 : domaine d'étude avec les niveaux des variables indépendantes

Symboles	Variables indépendantes	Niveaux des variables				
		-1,32	-1	0	+1	+1,32
A	<i>E. camaldulensis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	0,17	0,25	0,50	0,75	0,83
B	<i>C. citratus</i> ($\mu\text{g/mL}$)	0,17	0,25	0,50	0,75	0,83

II. Résultats et discussion

II.1. Etude de la stabilité des composés bioactifs des extraits

II.1.1. Variation des teneurs en phénoliques totaux

Les Figure 59 et 60 présentent l'évolution de la teneur en composés phénoliques totaux (TPT) respectivement dans les extraits des feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* en fonction des différentes conditions de stockage. Les teneurs initiales (au temps t_0) en TPT dans les extraits de *E. camaldulensis* (EC) et de *C. citratus* (CC) sont respectivement de 330,8 mg EAG/g et 171,6 mg EAG/g.

Les graphiques révèlent que les composés phénoliques des extraits solubilisés dans l'eau distillée (Sol.A) ont une plus faible stabilité que lorsqu'ils sont secs ou dissouts dans l'éthanol 70% (Sol.B). Les stabilités, telles qu'évaluées par la mesure des TPT, pour les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* en fonction du temps et du solvant de stockage peuvent être résumées dans l'ordre croissant suivant : *Extrait solubilisé dans le Sol.A < Extrait solubilisé dans le Sol.B < Extrait sec.*

Les TPT mesurées dans tous les échantillons de EC et CC stockés à $T = 50^\circ\text{C}$ ont montré des faibles valeurs indiquant une plus faible stabilité des échantillons comparativement à ceux stockés à T ambiante ($25\pm 5^\circ\text{C}$) et $T = 4^\circ\text{C}$. En effet, à 50°C , les TPT de EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec sont mesurées relativement constantes durant les 30 premiers jours de stockage. Au-delà de cette période, c'est-à-dire de 30 à 90 jours de stockage, une dégradation significative d'environ 40 à 60% des TPT est observée. Après 150 jours de stockage, les TPT restantes de EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec enregistrées sont respectivement de 70, 131 et 88 mg EAG/g d'extrait. Ces concentrations restantes correspondent respectivement à 21%, 40% et 26,7% des concentrations initiales des échantillons. Un constat similaire a été également observé avec les échantillons de CC/Sol.B et CC/Sec, contrairement à CC/Sol.A qui n'a présenté aucune stabilité sur la durée de l'étude. Les TPT restantes de CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec enregistrées après 150 jours de stockage sont respectivement de l'ordre de 11 ; 36 et 56 mg EAG/g d'extraits. Ces valeurs représentent respectivement environ 7%, 21% et 33% des TPT initiales des échantillons.

Lorsque les échantillons sont stockés à T ambiante ($25\pm 5^\circ\text{C}$), les TPT de EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec sont relativement supérieures à celles de CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec, respectivement. Les extraits EC/Sol.A et CC/Sol.A n'ont présenté aucune stabilité (mesure TPT) sur la durée de l'étude. Les valeurs des TPT mesurées après 150 jours de stockage sont respectivement 95 et 28 mg EAG/g d'extrait, correspondant à 29% et 16% des concentrations

initiales. Les extraits EC/Sol.B, EC/Sec, CC/Sol.B et CC/Sec ont présenté une faible dégradation (TPT <10%) durant les 60 premiers jours de stockage, et une dégradation significative de 60 à 150 jours. Les TPT restantes enregistrées après 150 jours de stockage sont de 194 ; 204 ; 53 et 84 mg EAG/g d'extraits, soient respectivement de 59%, 62%, 31% et 49% des TPT initiales.

A $T = 4^{\circ}\text{C}$, la dégradation des extraits CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec a été plus marquée que celle de EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec, respectivement. Les extraits EC/Sol.A et CC/Sol.A ont présenté une plus forte stabilité (>90%) durant respectivement 60 et 30 jours de stockage. Les TPT de CC/Sol.B, CC/Sec, EC/Sol.B et EC/Sec sont restées très importante (>90%) durant les 60 premiers jours de stockage. De 60 à 150 jours de stockage, la dégradation des composés phénoliques de ces derniers est moins marquée comparativement aux échantillons stockés à T ambiante et à $T = 50^{\circ}\text{C}$. Après 150 jours de conservation, les TPT restantes de CC/Sol.B, CC/Sec, EC/Sol.B et EC/Sec mesurées étaient respectivement de 114,9 ; 129,4 ; 216,7 et 248,7 mg EAG/g. En termes de pourcentage, ces valeurs correspondent respectivement à 67%, 75,4%, 65,5% et 75,2%, c'est-à-dire que, dans ces conditions de conservation, plus de 65% des TPT sont conservées.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux rapportés par Ali et al. (2018) [219], qui ont réussi à conserver plus de 95% des TPT présents dans des échantillons d'extraits secs stockés sous des conditions de température de 5°C , à l'obscurité et pendant 180 jours. Dans notre cas, la capacité de conservation des TPT pour les extraits secs à $T = 4^{\circ}\text{C}$ était de l'ordre de 75% pour les échantillons EC (*E. camaldulensis*) et CC (*C. citratus*) durant 150 jours. Ce qui montre une différence d'environ 20% entre les deux études qui pourrait être associée principalement à l'action de la lumière, car ces auteurs ont pris en compte dans leur étude l'influence de la lumière en conservant les échantillons à l'obscurité totale. En effet, dans le cas de notre étude en utilisant des flacons transparents, nos échantillons d'extraits ont dû être exposés à l'action de la lumière qui est capable d'accélérer le processus de décomposition des TPT. Dans le même sens, les travaux de Ferreyra et al. (2023) [220] avaient aussi rapporté une bonne stabilité des composés phénoliques présents dans des extraits bruts conservés à basse température (-20°C et 5°C), tandis que des dégradations importantes ont été signalées lorsque les températures de stockage étaient entre 25°C et 40°C . Sur base de travaux antérieurs, les réductions progressives des TPT constatées dans les différents échantillons peuvent être associées aux influences de plusieurs paramètres qui initient de nombreuses réactions d'oxydation, d'hydrolyse.

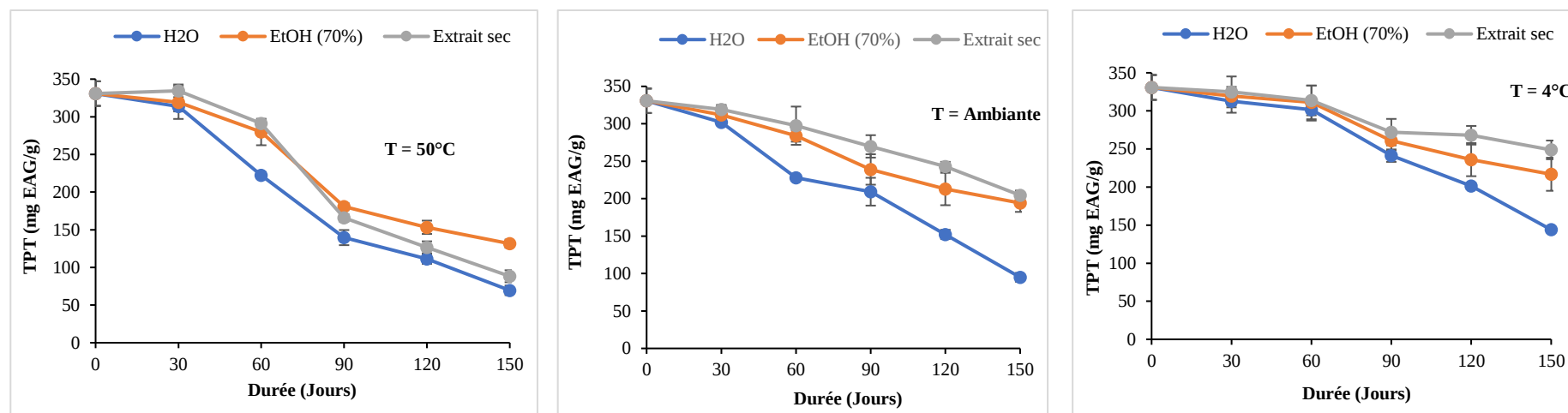


Figure 59. Variation des TPT au cours du stockage (*Eucalyptus camaldulensis*)

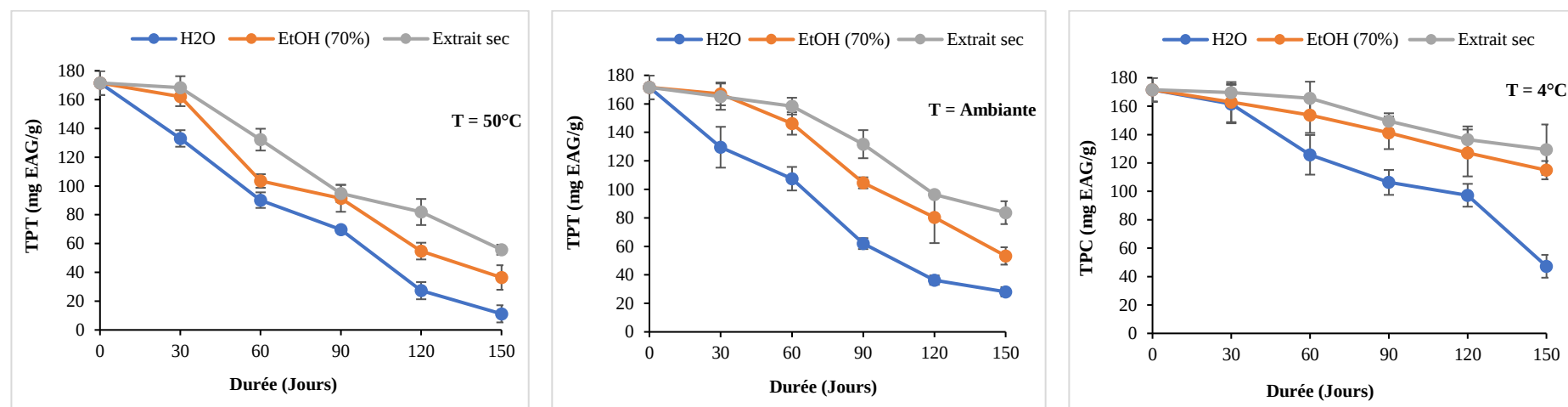


Figure 60. Variation des TPT au cours du stockage (*Cymbopogon citratus*)

II.1.2. Variation des teneurs en flavonoïdes totaux déterminées par dosage au spectrophotomètre UV-vis

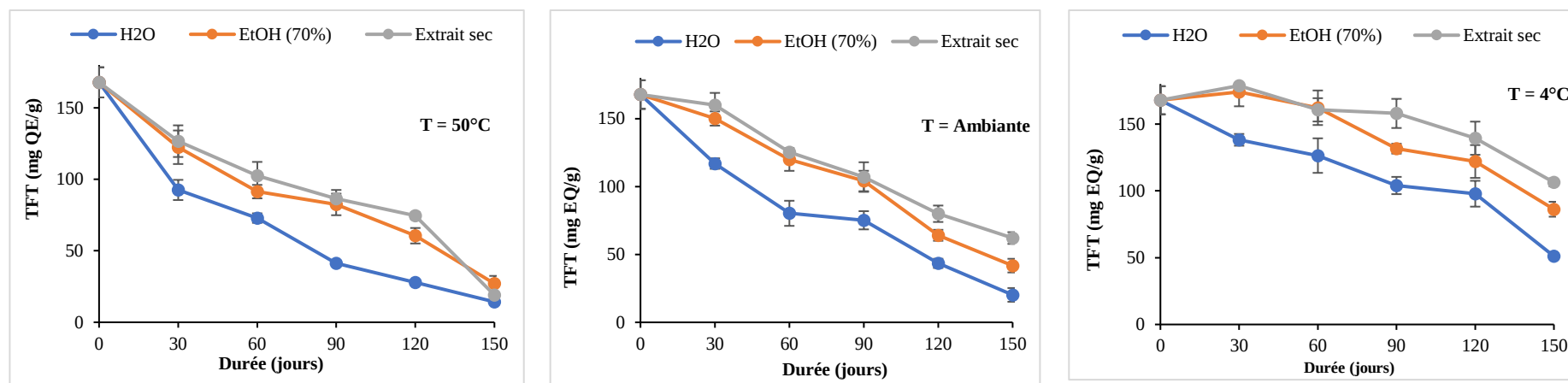
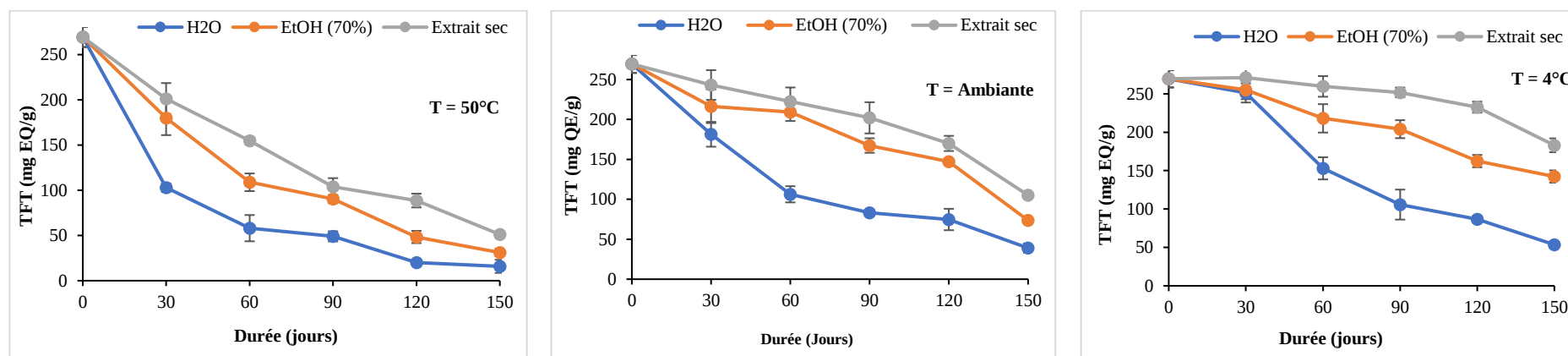
Les Figure 61 et 62 présentent respectivement les variations des teneurs en flavonoïdes totaux (TFT) dans les extraits bruts des feuilles de EC (*E. camaldulensis*) et de CC (*C. citratus*) conservés à différentes conditions de stockage. Au temps t_0 , les TFT initiales étaient de 167,8 mg EQ/g et 269,5 mg EQ/g, respectivement pour *E. camaldulensis* et de *C. citratus*.

De façon générale, l'évolution des courbes des différents graphiques indique une diminution rapide des TFT des extraits solubilisés dans l'eau (Sol.A) en fonction des conditions de stockage, contrairement à ceux stockés soit sous forme sèche ou solubilisés dans de l'éthanol 70% (Sol.B). La capacité de conservation des flavonoïdes présents dans les différents extraits en fonction de la nature du solvant est similaire à celle observée précédemment avec les composés phénoliques totaux (TPT). Elle est classée dans l'ordre croissant de : *Extrait solubilisé dans le Sol.A* < *Extrait solubilisé dans le Sol.B* < *Extrait sec*.

Les tendances des différents graphiques montrent également que les TFT sont plus sensibles à la température de stockage, typiquement $T = 50^{\circ}\text{C}$ vs T ambiante ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) et $T = 4^{\circ}\text{C}$. En considérant $T = 50^{\circ}\text{C}$, il a été remarqué qu'en seulement 30 jours de stockage, les TFT restantes des extraits EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec étaient de 92,6 ; 122,5 et 126,7 mg EQ/g respectivement, correspondant à des pourcentages de pertes respectives de 44,8% 27% et 24,5%. Par contre, pour les extraits CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec, elles étaient respectivement de l'ordre de 102,8 ; 179,9 et 201,2 mg EQ/g correspondant également à des pertes estimées à 61,8%, 33,2% et 25,3%.

En passant aux conditions de température T ambiante ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$), il a été constaté une amélioration de la stabilité des TFT au cours du temps dans tous les échantillons des deux plantes comparativement à ceux soumis aux conditions de température $T = 50^{\circ}\text{C}$. Au bout de 150 jours de stockage à T ambiante, les analyses ont montré que les TFT restantes mesurées dans les extraits étaient à 12,2%, 24,9%, et 37% respectivement pour les échantillons EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec et 30,7%, 51,4% et 63,4% pour les échantillons CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec. Une remarque majeure est que les TFT restantes des extraits de l'espèce *C. citratus* sont environ deux fois plus élevées que celles enregistrées dans les extraits de l'espèce *E. camaldulensis*. Ceci pourrait indiquer que les flavonoïdes de *E. camaldulensis* ont une faible stabilité par rapport à ceux de *C. citratus*.

Enfin, lorsque les échantillons sont conservés à basse température $T = 4^{\circ}\text{C}$, une faible dégradation des flavonoïdes a été mise en évidence au cours du temps surtout dans les échantillons EC/Sol.B, EC/Sec et dans les échantillons de CC/Sol.B, CC/Sec. Les variations significatives des TFT dans ces échantillons par rapport aux TFT initiales ont été constatées qu'après 90 jours de stockage pour les échantillons EC/Sol.B et CC/Sol.B et au-delà de 120 jours de stockage pour ceux de EC/Sec et CC/Sec. Les formes sèches ont donc présenté les taux de stabilité les plus élevés. Après les 150 jours de conservation, les TFT restantes enregistrées dans les différents échantillons étaient de 30,7%, 51,4%, et 63,4% pour les extraits EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec et de 19,9%, 52,8% et 67,9% respectivement pour CC/Sol.A, CC/Sol.B et CC/Sec. Dans ce cas précis, en dehors des extraits des deux plantes solubilisées dans le Sol.A, tous les autres ont montré une stabilité similaire. Ceci indique que les conditions de stockage à basse température sont indispensables pour la conservation des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* tandis que ceux des feuilles de *C. citratus* se conservent relativement mieux tant aux conditions de basse température qu'aux conditions de T ambiante.

Figure 61. Variation des TFT au cours du temps (*Eucalyptus camaldulensis*)Figure 62. Variation des TFT au cours du temps (*Cymbopogon citratus*)

II.1.3. Variation des teneurs en flavonoïdes majoritaires (TFM) par analyse LC-MS

Huit composés flavonoïdes majoritaires avaient précédemment été identifiés dans l'extrait optimisé des feuilles de *E. camaldulensis* et dix composés flavonoïdes chez l'espèce *C. citratus* par analyse LC-MS (voir Chapitre 4). Les concentrations de chacun de ces composés au temps initial t_0 ainsi que leurs concentrations restantes obtenues après 5 mois de conservation dans les différentes conditions de stockage sont consignées dans les Tableaux 20 et 21, respectivement pour *E. camaldulensis* et pour *C. citratus*. Au temps initial t_0 , la teneur totale de l'ensemble des huit flavonoïdes majoritaires présents dans l'extrait optimisé de *E. camaldulensis* était de 27,0 mg/g de matières végétales et celle de *C. citratus* était de 51,1 mg/g de matières végétales. En fonction des différentes conditions de stockage, la concentration restante la plus faible obtenue après 150 jours de stockage était de 1,6 mg/g et celle la plus élevée était de 24,9 mg/g pour les échantillons de *E. camaldulensis* (Tableau 20). Pour les échantillons de *C. citratus*, ces valeurs étaient respectivement de 2,1 mg/g et 42,2 mg/g (Tableau 21).

Les données des Tableaux 20 et 21 révèlent une dégradation complète de certains composés et une diminution significative des teneurs pour d'autres, sous les différentes conditions de conservation des échantillons. Le solvant A (eau distillée) est le milieu de conservation dans lequel le taux le plus élevé de dégradation des flavonoïdes a été enregistré. Ceci confirme en partie la faible teneur des TFT restantes détectées dans ce solvant par dosage au spectrophotomètre UV-vis telle que décrite plus haut. Quant au solvant B (éthanol 70%), il a présenté des capacités de conservation des flavonoïdes majeurs supérieurs à celles du solvant A. Comme on peut le voir dans ces deux Tableaux (20 & 21), l'effet de la température a été décisif sur la dégradation totale ou partielle de plusieurs composés dans les échantillons des deux plantes. Les concentrations restantes des composés obtenues après la durée de conservation sous la température de 50°C sont largement inférieures par rapport à celles obtenues aux basses températures (4°C & -20°C).

En termes de pourcentage de dégradation, la Figure 63 montre une diminution significative des TFM après 150 jours de conservation pour les extraits solubilisés soit dans l'eau (plus de 90%), soit stockés sous $T=\text{ambiante}$ ou 50°C, pour chacune des deux plantes. Tandis que sur la même Figure, il a été constaté que plus de 90% et 80% des TFM ont été conservés après les 150 jours de stockage, respectivement dans les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* conservés à $T = -20^\circ\text{C}$.

Tableau 20 : concentrations restantes des 8 flavonoïdes majoritaires identifiés dans l'extrait optimisé de *E. camaldulensis*.(Données issues des analyses LC-MS des échantillons au temps t_0 et $t = 150$ jours)

	Flav. Majeurs	EO	T° 50°C			T° Ambiante (25±5°C)			T° 4°C			T° -20°C		
N°	[M-H] ⁻	Temps initial t_0	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec
1	595	0,6±0,2	---	---	---	---	0,1±0,0	0,2±0,0	---	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0
2	431	1,0±0,1	---	0,3±0,0	0,2±0,0	0,6±0,1	0,3±0,1	0,3±0,0	0,6±0,0	0,5±0,1	0,5±0,1	0,3±0,0	0,5±0,1	0,4±0,1
3	431	1,4±0,1	0,3±0,0	0,6±0,0	0,4±0,1	0,8±0	0,4±0,1	0,7±0,1	1,4±0,1	0,8±0,2	0,8±0,1	0,8±0,0	1,2±0,2	1,3±0,1
4	609	0,8±0,0	---	---	---	---	0,1±0,0	0,2±0,0	---	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0
5	463	1,2±0,0	---	0,3±0,0	0,4±0,0	---	0,5±0,1	0,7±0,0	---	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,0	1,0±0,1	1,0±0,0
6	593	1,1±0,0	---	0,3±0,0	0,2±0,1	---	0,2±0,0	0,3±0,0	---	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,0
7	477	6,0±0,2	0,3±0,0	1,6±0,0	2,9±0,3	0,3±0,1	3,7±0,3	4,4±0,0	1,3±0,1	6,0±0,1	6,8±0,4	5,1±0,2	7,6±0,1	6,6±0,2
8	461	14,9±0,1	1,0±0,1	3,4±0,2	4,8±0,4	2,5±0,1	8,4±0,4	8,5±0,3	6,4±0,4	13,9±0,1	13,9±0,1	9,5±0,3	14,9±0,3	14,5±0,2
	Total (mg/g)	27,0	1,6	6,5	9,0	4,1	13,8	15,1	9,6	22,7	23,5	17,3	26,4	24,9

Sol.A : solvant A (eau distillée) ; Sol.B : solvant B (éthanol 70%); EO : *Eucalyptus Optimisé* ; CO : *Cymbopogon Optimisé*

Tableau 21 : concentrations restantes (après 150 jours) des 10 flavonoïdes majoritaires identifiés dans l'extrait optimisé de *C. citratus*.(Données obtenues à partir des analyses LC-MS des échantillons au temps t_0 et au $t = 150$ jours)

	Flav. Majeurs	CO	T° 50°C			T° Ambiante (~25±5°C)			T° 4°C			T° -20°C		
N°	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Temps initial t_0	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec	Sol. A	Sol. B	Extrait sec
1	579	3,2±0,1	---	0,8±0,1	0,8±0,0	1,4±0,0	1,1±0,1	1,5±0,1	1,7±0,1	1,8±0,3	2,4±0,1	1,5±0,1	2,2±0,1	2,5±0,2
2	563	7,5±0,4	1,0±0,2	1,7±0,1	1,9±0,0	2,2±0,2	2,4±0,7	3,4±0,2	2,4±0,3	4,1±0,6	5,7±0,5	3,1±0,1	5,4±0,6	5,1±0,2
3	593	9,7±0,2	1,1±0,2	2,5±0,2	3,0±0,1	2,6±0,0	3,0±0,1	4,3±0,1	2,8±0,2	5,3±0,1	8,0±0,2	4,1±0,2	6,8±0,5	7,2±0,3
4	549	4,5±0,3	---	1,3±0,1	1,7±0,1	---	1,7±0,2	2,6±0,1	1,5±0,3	3,1±0,4	3,3±0,5	2,2±0,1	3,7±0,1	3,9±0,1
5	447	4,3±0,2	---	---	1,2±0,1	---	1,4±0,2	1,3±0,2	1,1±0,1	2,2±0,2	3,2±0,1	2,0±0,3	1,4±0,2	1,4±0,0
6	577	1,7±0,1	---	---	0,3±0,0	---	0,4±0,2	0,8±0,0	0,5±0,1	0,9±0,2	1,2±0,1	0,8±0,0	0,9±0,0	0,9±0,0
7	577	1,3±0,2	---	---	0,3±0,0	---	0,3±0,0	0,6±0,1	0,3±0,1	0,7±0,1	0,9±0,2	0,5±0,0	0,7±0,1	0,8±0,1
8	593	8,3±0,3	---	---	2,9±0,3	---	3,0±0,5	4,0±0,3	2,5±0,3	5,2±0,2	7,1±0,5	3,0±0,0	8,2±0,2	9,1±0,2
9	563	5,0±0,2	---	1,7±0,3	1,9±0,3	---	2,1±0,4	2,6±0,1	1,0±0,2	3,3±0,5	4,8±0,1	2,2±0,1	5,3±0,1	5,3±0,2
10	575	5,7±0,1	---	1,2±0,1	1,4±0,3	---	1,3±0,2	1,8±0,0	1,0±0,0	3,8±0,4	4,3±0,2	2,5±0,1	5,8±0,2	6,0±0,4
	Total (mg/g)	51,1	2,1±0,4	9,2±0,9	15,4±1,2	6,2±0,2	16,7±2,5	22,9±1,2	14,8±1,7	30,4±4,0	40,9±2,5	21,7±1,0	40,4±2,2	42,2±1,4

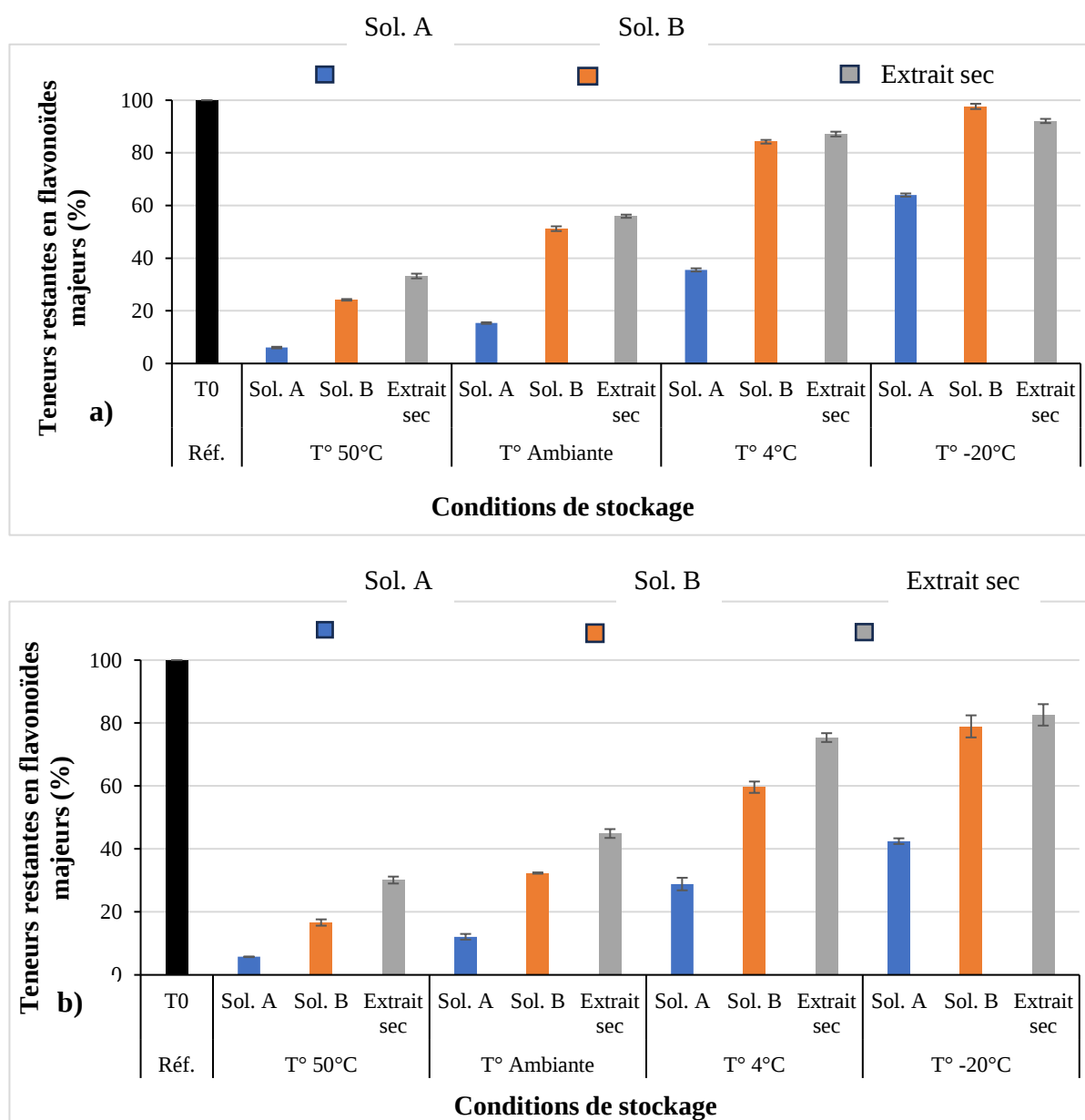


Figure 63. Proportions restantes en flavonoïdes majoritaires obtenues après 5 mois de stockage (a- *E. camaldulensis* ; b- *C. citratus*).

(Proportions déterminées à partir des concentrations restantes des flavonoïdes présents dans chaque extrait. T0 : extrait au temps initial ; Sol. A : solvant A (eau distillée) ; sol. B : solvant B (éthanol70%).

Les données des Tableaux 20 et 21 montrent que les flavonoïdes identifiés dans les extraits de *E. camaldulensis* ont été relativement plus sensibles aux conditions de l'étude par rapport à ceux de l'espèce *C. citratus*. En effet, des dégradations totales de certains composés ont été observées pour les échantillons de *E. camaldulensis* conservés sous la température de 4°C, tandis qu'aucune dégradation totale n'a été détectée à cette température pour les échantillons

de *C. citratus*. De plus, dans les conditions de l'étude, aucune dégradation totale n'a été enregistrée lorsque les échantillons de *C. citratus* sont conservés sous forme sèche. Ce résultat confirme en partie le même constat effectué via les dosages au spectrophotomètre UV-vis pour lesquels les TFT de *C. citratus* avaient présenté des meilleure stabilité à $T = 4^{\circ}\text{C}$ et à T ambiante comparativement à celles de *E. camaldulensis* qui étaient stables uniquement aux basses températures ($T = 4^{\circ}\text{C}$). Selon les travaux de Smith et al. (2000) [216], les flavonoïdes de type flavones semblent avoir une stabilité relativement plus élevée comparativement à celle des dérivées flavonols. Ceci corrobore nos résultats d'identification des flavonoïdes dans les extraits des deux plantes (*Chapitre 4, identification des flavonoïdes majoritaires*). En effet, les flavonoïdes identifiés dans les extraits de *E. camaldulensis* sont majoritairement constitués des dérivés flavonols, tandis que les extraits de *C. citratus* sont riches en flavonoïdes de type flavone. Ceci pourrait justifier en partie cette forte sensibilité des composés de *E. camaldulensis* par rapport à ceux de *C. citratus*.

Des études ont également montré que les flavonoïdes sont susceptibles de se dégrader et perdre leur activité sous l'influence de plusieurs paramètres. C'est le cas par exemple des anthocyanines et des flavan-3-ols qui ont présenté une sensibilité aux fortes températures d'extraction ou de conservation. Plusieurs réactions ont été mises en évidence, notamment des hydrolyses enzymatiques des flavonols glycosides en leurs aglycones correspondants [221]. Selon les travaux de Mochizuki et al. (2002) [222], la faible stabilité des composés flavonoïdes en milieux aqueux pourrait être liée à leurs capacités d'autoxydation en présence d'ions métalliques ou de borate comme cela a été décrit avec la catéchine au cours de leur étude [222]. De plus, d'autres travaux ont aussi mis en évidence le rôle prépondérant de la nature structurale des composés flavonoïdes sur la vitesse de dégradation. En effet, les flavonoïdes comportant un nombre d'hydroxylation élevé semblent se dégrader plus rapidement, tandis que la présence de glycosylation et/ou de groupement méthoxyle semble fournir une meilleure protection aux flavonoïdes [223]. Les travaux de Ferreyra et al. (2023) [220] avaient aussi rapporté une dégradation importante de la (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine dans des extraits stockés durant 3 mois sous des températures de stockage de 25°C et 40°C . La température est donc un paramètre essentiel à prendre en compte pour une meilleure conservation sur une longue durée des TFT présentes dans des extraits de plante.

II.1.4. Variation de l'activité antioxydante des extraits

II.1.4.1. Activité antiradicalaire DPPH

Le pouvoir antiradicalaire DPPH des échantillons a été évalué au cours du temps en procédant par détermination des pourcentages d'inhibition (%). Les Figure 64 et 65 présentent l'activité antiradicalaire (DPPH) enregistrée respectivement pour les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*. Au temps initial t_0 , les échantillons ont présenté des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 98,3% pour *E. camaldulensis* et 88,8% pour *C. citratus*.

Les Figures 64 et 65 montrent que les propriétés antiradicalaires (DPPH) de tous les échantillons diminuent avec l'augmentation du temps et de la température de conservation. Les propriétés antiradicalaires (DPPH) des échantillons de CC (*C. citratus*) ont présenté une diminution plus marquée que celles mesurées avec les extraits de EC (*E. camaldulensis*), aux 3 températures testées, à savoir $T = 50^{\circ}\text{C}$, T ambiant et $T = 4^{\circ}\text{C}$. Il a aussi été observé que les pertes des propriétés antiradicalaires DPPH des extraits sont plus significatives dans les formes liquides (Sol.A & Sol.B) que pour les formes sèches (extraits secs). Les propriétés antiradicalaires des échantillons de EC ont démontré une meilleure conservation comparativement aux échantillons de CC. Les capacités inhibitrices de EC/Sol.B et de EC/Sec sont supérieures à 90% après 30 jours et 60 jours de stockage respectivement à $T = 50^{\circ}\text{C}$ et T ambiante. A $T = 4^{\circ}\text{C}$, des pourcentages d'inhibition supérieurs à 90% ont été relevés après 120 jours (4 mois) de stockage, alors que EC/Sol.A a exhibé des activités similaires en seulement 60 jours de conservation. Après 150 jours de conservation, de fortes diminutions des propriétés antiradicalaires sont notées. Les pourcentages d'inhibition mesurés sont inférieurs à 50% des valeurs initiales (98,3%), c'est-à-dire de l'ordre de 8,8% à 47,5% pour l'ensemble des échantillons de EC.

Dans ces mêmes conditions de conservation, l'activité antiradicalaire DPPH a été significativement plus impactée pour les échantillons de CC comparativement à celle des échantillons de EC. Il a ainsi été observé une chute significative de l'activité DPPH dès les 30 premiers jours de stockage des échantillons de CC conservés à $T = 50^{\circ}\text{C}$ et à T ambiante. Cependant, les propriétés antiradicalaire DPPH des échantillons CC/Sol.B et CC/Sec ont été significativement conservées (> 90%) au bout de 30 jours de stockage. Au-delà des 150 jours de stockage, les pourcentages d'inhibition enregistrés sont de l'ordre de 4,1% à 42,5%. Ces pourcentages d'inhibition sont inférieurs à 50% de l'activité inhibitrice initiale (88,8%).

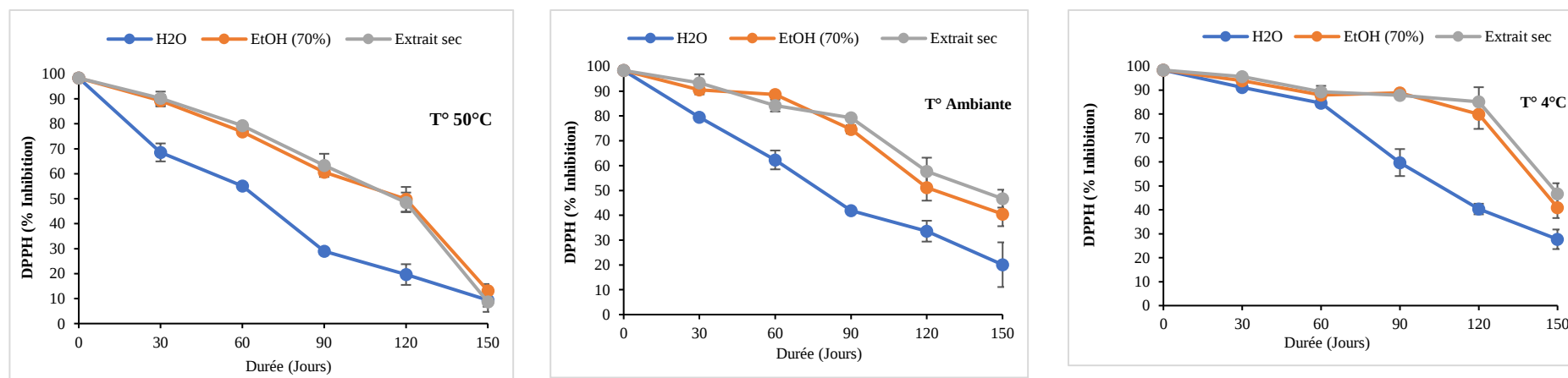


Figure 64. Variation de l'activité antiradicalaire DPPH au cours du stockage (*Eucalyptus camaldulensis*)

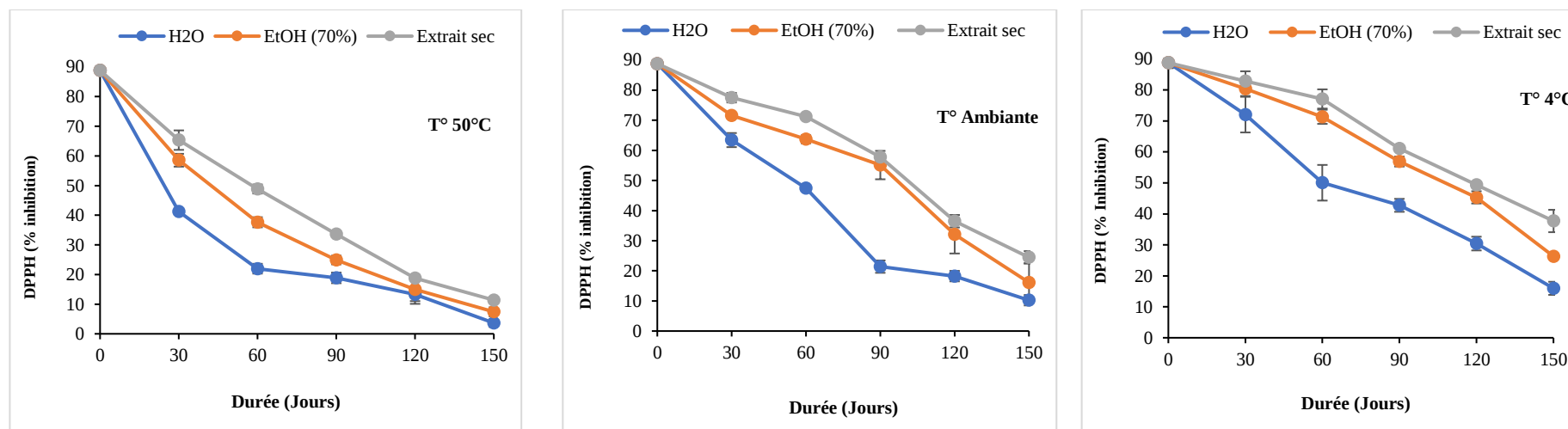


Figure 65. Variation de l'activité antiradicalaire DPPH au cours du stockage (*Cymbopogon citratus*)

II.1.4.1. Pouvoir réducteur FRAP

Le pouvoir réducteur des ions ferriques des extraits a aussi été évalué en fonction des différentes conditions de stockage et est exprimé en milligramme équivalent trolox par gramme d'extrait (mg ET/g d'extrait). Les Figure 66 et 67 montrent respectivement les capacités des extraits de *E. camaldulensis* (EC) et de *C. citratus* (CC) à réduire les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} . Au temps initial t_0 , les extraits EC et CC ont montré des capacités réductrices respectives de 775,6 mg ET/g et 376,1 mg ET/g. Globalement, sur l'ensemble des échantillons analysés, il a été remarqué que les paramètres les plus décisifs sont la durée de conservation, la nature du solvant ainsi que la température de stockage.

En considérant tout d'abord le paramètre nature du solvant (eau distillée & éthanol 70%), il a été constaté qu'à chaque température de stockage, les formes aqueuses (Sol.A) ont enregistré l'activité réductrice la plus faible pour tous les échantillons de EC et CC après les 150 jours de stockage. Par contre, les formes hydro-éthanoliques (Sol.B) et les formes sèches (extrait sec) ont été les plus actives durant toute la durée de conservation et sous toutes les températures de stockage étudiées. Ainsi, en fonction de ce paramètre, la détérioration du pouvoir réducteur des échantillons obéit quasiment au même ordre de dégradation décrit au niveau des teneurs en composés bioactifs (TPT et TFT) des extraits EC et CC : *forme aqueuse (Sol.A) < forme hydro-éthanolique (Sol.B) < forme sèche*.

Quant à l'impact de la variation de la température de stockage, il a été observé que tous les échantillons de EC (EC/Sol.A ; EC/Sol.B ; EC/Sec) stockés à $T = 50^\circ\text{C}$ ont présenté une détérioration progressive de leur activité réductrice FRAP jusqu'au temps $t = 150$ jours. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 66, dans la plage de 60 à 90 jours, ces échantillons ont perdu 50% de leur activité réductrice FRAP. Les proportions restantes des activités obtenues après 150 jours de conservation par rapport à l'activité initiale à t_0 étaient de 6,8%, 11,6% et 7,9%, respectivement pour EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec. Quant aux échantillons de l'espèce *C. citratus*, les tendances indiquent une chute importante de l'activité réductrice FRAP de tous les extraits (CC/Sol.A ; CC/Sol.B et CC/Sec) à $T = 50^\circ\text{C}$ durant les 60 premiers jours du stockage (Figure 67). A cette période, les activités résiduelles n'étaient que seulement 103,3 ; 117,3 et 130,7 mg ET/g, respectivement pour CC/Sol.A ; CC/Sol.B et CC/Sec. Ces valeurs indiquent une baisse de l'activité de plus de 50% à seulement 60 jours de conservation.

Sous les conditions de stockage à T ambiante, des baisses significatives du pouvoir réducteur FRAP ont été enregistrées au cours du temps dans tous les échantillons de EC et CC, mais

relativement faibles par rapport à au cas précédent de $T = 50^{\circ}\text{C}$. Ainsi, les activités résiduelles obtenues après 150 jours, étaient de 115,3 ; 219,1 ; 321,5 mg ET/g correspondant respectivement à 14,8 ; 28,2 ; 41,4% de l'activité initiale pour les échantillons respectifs EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec. Pour ce qui concernent les échantillons CC/Sol.A ; CC/Sol.B et CC/Sec, les activités résiduelles étaient de 40,4 ; 81,5 et 103,1 mg ET/g respectivement, soit environ 10,7 ; 21,7 et 27,4% de l'activité initiale au temps t_0 .

Aux conditions de basse température ($T = 4^{\circ}\text{C}$), on a remarqué une meilleure conservation de la capacité réductrice des échantillons des deux plantes au cours du temps. En effet, après les 150 jours de stockage, les proportions résiduelles de l'activité FRAP des échantillons de EC atteignaient encore 25,6 ; 58,3 et 51,7%, respectivement pour EC/Sol.A, EC/Sol.B et EC/Sec et celles des échantillons de CC étaient de 17,4 ; 32,6 et 39,8%, respectivement pour CC/Sol.A ; CC/Sol.B et CC/Sec.

La diminution des activités antioxydantes observée dans les conditions d'expérimentation peut être justifiée par la faible stabilité de certains constituants phytochimiques tels que les polyphénols et flavonoïdes présents dans les différents échantillons et qui ont subi des dégradations durant le stockage. Ces résultats confirment les corrélations positives qui ont été au préalable établies au cours de ce travail (*Chapitre 3*) entre les activités antioxydantes (DPPH et FRAP) et les teneurs en polyphénols totaux (TPT) présentes dans les extraits.

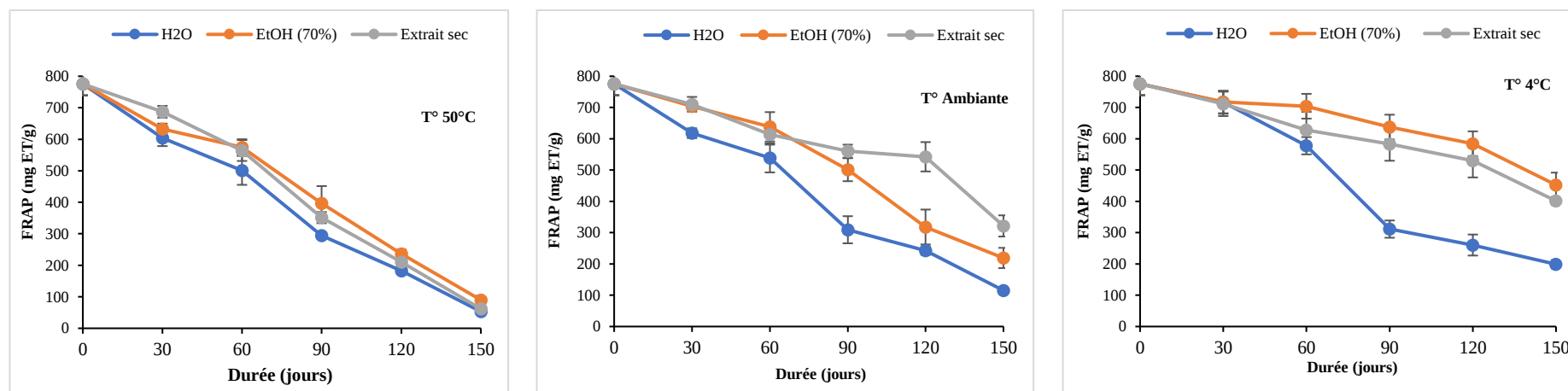


Figure 66. Variation du pouvoir réducteur FRAP au cours du stockage (*Eucalyptus camaldulensis*)

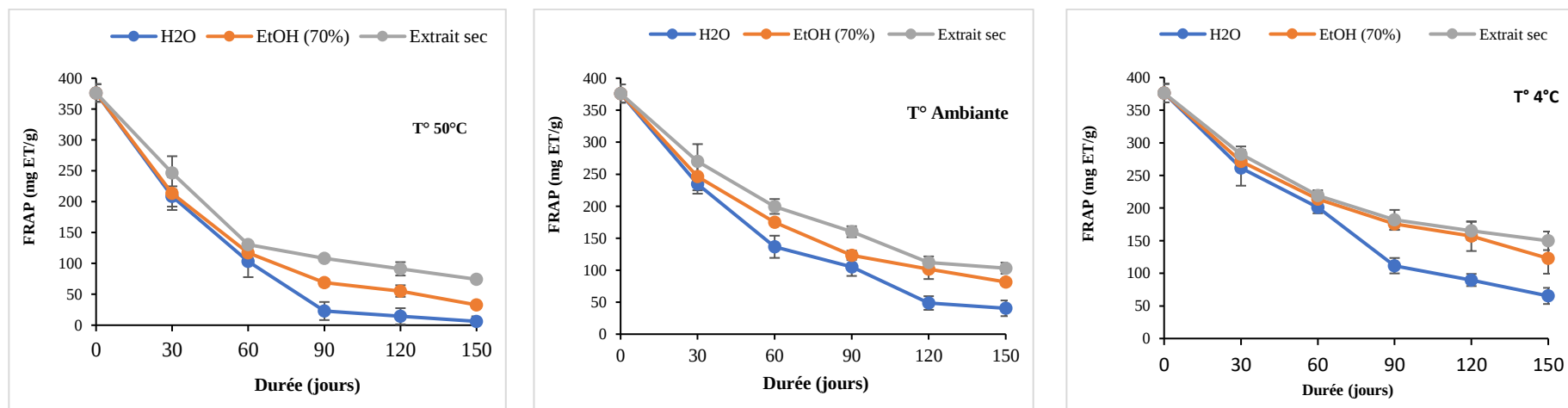


Figure 67. Variation du pouvoir réducteur FRAP au cours du stockage (*Cymbopogon citratus*)

II.2. Proposition d'un plan de formulation à partir des extraits optimisés des deux plantes

Le plan de formulation a consisté à évaluer l'activité antiradicalaire DPPH et le pouvoir réducteur FRAP du mélange des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et de *C. citratus* à différentes concentrations. L'analyse et l'interprétation des données ont permis de définir les concentrations optimales des deux extraits, qui induisent les activités optimales DPPH et FRAP.

II.2.1. Réponse DPPH

En fonction des différentes concentrations testées, l'activité antiradicalaire DPPH a varié de 11,8 µg/mL à 38,2 µg/mL, respectivement enregistrées par les essais n°3 et n°14 (Tableau 22). L'essai n°3 réalisé avec des proportions équivalentes en extrait A et en l'extrait B a présenté la combinaison la plus active (11,8 µg/mL) pour l'activité DPPH. Le Tableau 23 montre que les termes A, B, A², B² ont entraîné des effets significatifs ($p < 0,05$) sur l'activité antiradicalaire DPPH. En effet, les termes B, A² et B² ont présenté des coefficients positifs ce qui implique une baisse significative de l'activité antiradicalaire DPPH, tandis que le terme A a présenté un coefficient négatif. Ces observations traduisent une amélioration significative de l'activité DPPH lorsque la concentration de l'extrait de *E. camaldulensis* (A) augmente dans le mélange. Cependant, l'interaction entre les deux extraits (A et B) n'a entraîné aucun effet significatif sur le pouvoir antiradicalaire DPPH. De plus, les paramètres statistiques présentés dans le Tableau 24 ont indiqué que le modèle est significatif ($p < 0,000$) et présente un bon coefficient de détermination $R^2 = 0,9167$ avec un manque d'ajustement dont la p-value est supérieure à 0,05 (non significatif par rapport à l'erreur pure). La Figure 68 présente la relation entre l'activité antiradicalaire DPPH et les deux variables étudiées (A et B) et l'Equation 13 (Eq. 13) traduit le modèle mathématique polynomial du second ordre de l'activité antiradicalaire DPPH sur la base des valeurs codées des deux variables.

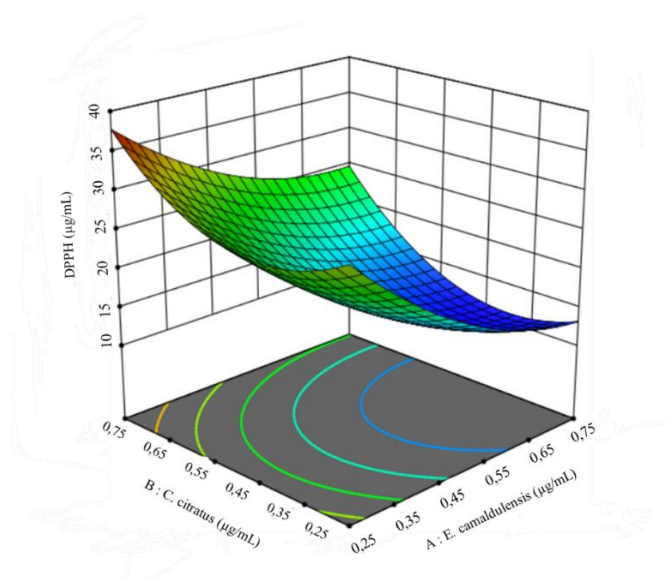


Figure 68. Graphique 3D de l'activité antiradicalaire DPPH en fonction des deux variables A et B

$$DPPH (\mu g/mL) = 16,5 - 7,66A + 4,63B + 1,18AB + 3,67A^2 + 6,48B^2 \quad (Eq. 13)$$

II.2.2. Réponse FRAP

Le mélange des deux types d'extraits à différentes concentrations a enregistré une capacité réductrice FRAP variable de 570,2 mg ET/g à 855 mg ET/g obtenues respectivement par les essais n°13 et n°10 (Tableau 22). L'essai n°10 qui a présenté l'activité la plus élevée est une combinaison de 0,83 µg/mL de A et de 0,50 µg/mL de B. A l'exception des effets liés aux interactions entre les variables A et B, tous les autres termes ont entraîné des influences significatives sur l'activité FRAP (Tableau 23). Le terme linéaire A ainsi que tous les termes quadratiques (A^2 et B^2) ont été bénéfiques au pouvoir réducteur FRAP, tandis que la variation de la variable B a induit un effet linéaire inhibant l'activité réductrice FRAP. L'analyse des variances (ANOVA) a montré un modèle significatif ($p < 0,05$) avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9016$ et un manque d'ajustement d'une p -value $> 0,05$ (Tableau 24). L'analyse a également présenté un coefficient de variation (C.V.%) de 5,26 relativement faible, indiquant une bonne estimation du modèle obtenu. La Figure 69 montre l'effet de la variation des concentrations des extraits (A et B) sur l'activité réductrice FRAP. Le modèle de régression polynomiale ainsi développé est donné par l'Equation 14 (Eq. 14) sur la base des valeurs codées des variables A et B.

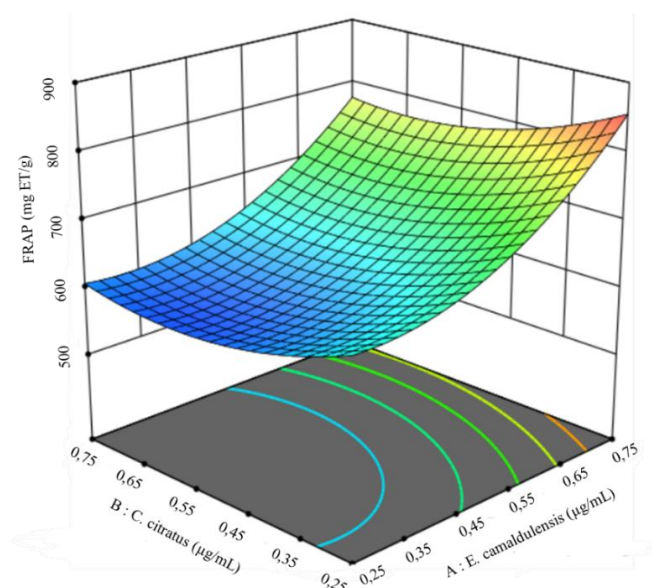


Figure 69. Graphique 3D du pouvoir réducteur FRAP en fonction des deux variables A et B.

$$FRAP \text{ (mg ET/g)} = 630,82 + 92,47A - 31,36B - 8,02AB + 57,13A^2 + 35,36B^2 \quad \text{Eq. (14)}$$

Tableau 22 : base de données présentant les variables indépendantes et les variables dépendantes

Run n°	A	B	DPPH (IC50 µg/mL)		FRAP (mg ET/g)	
			Exp.	Préd.	Exp.	Préd.
1	0,25	0,25	33,00	30,87	678,10	654,31
2	0,75	0,25	12,40	13,19	852,20	855,29
3	0,50	0,50	11,80	16,50	633,40	630,82
4	0,50	0,17	20,60	21,69	724,00	734,02
5	0,50	0,50	18,40	16,50	588,00	630,82
6	0,50	0,50	20,40	16,50	682,50	630,82
7	0,50	0,83	35,40	33,90	625,80	651,24
8	0,50	0,50	12,90	16,50	601,30	630,82
9	0,75	0,75	22,30	24,79	783,60	776,52
10	0,83	0,50	15,20	12,78	855,00	852,36
11	0,50	0,50	19,10	16,50	628,7	630,82
12	0,50	0,50	16,30	16,50	660,20	630,82
13	0,17	0,50	31,00	33,01	570,20	608,30
14	0,25	0,75	38,20	37,77	641,60	607,63

A : *Eucalyptus camaldulensis* ; B : *Cymbopogon citratus* ; Exp. : Expérimentales ; Préd. : Prédites

Tableau 23 : coefficients des régressions polynomiales des modèles et leurs significativités

Termes	DPPH		FRAP	
	Coefficients	p-value	Coefficients	p-value
Constants	16,5	0,000 ^a	630,82	0,000 ^a
Linéaires				
A	-7,66	0,0002 ^a	92,47	0,0001 ^a
B	4,63	0,0047 ^b	-31,36	0,0433 ^b
Interactions				
AB	1,18	0,4929 ^c	-8,02	0,6655 ^c
Quadratiques				
A ²	3,67	0,0245 ^b	57,13	0,0043 ^b
B ²	6,48	0,0012 ^b	35,48	0,0403 ^b
C.V. %	14,91		5,26	
Précision adéq.	11,6733		10,5765	

A : extrait de *E. camaldulensis* ; B : extrait de *C. citratus* ; Significativité : (a) $p\text{-value} < 0,001$; (b) $p\text{-value} < 0,05$; (c) $p\text{-value} > 0,05$; C.V.% : Coefficient de variation (%).

Tableau 24 : analyse ANOVA des modèles de régression

Modèles de régression	R ² (%)	R ² aj. (%)	R ² préd. (%)	F-value du modèle	p-value du modèle	Manque d'ajust. (F-value)	Manque d'ajust. (p-value)
DPPH	91,67	86,47	74,00	17,62	0,0004 ^a	0,6840	0,5991 ^b
FRAP	90,63	84,78	65,60	15,48	0,0006 ^a	1,07	0,4409 ^b

Significativité : (a) $p\text{-value} < 0,05$; (b) $p\text{-value} > 0,05$

Les conditions optimales ont été déterminées en cherchant la désirabilité composite la plus élevée possible pour les deux réponses étudiées, à savoir activité antiradicalaire DPPH et le pouvoir réducteur FRAP. Ainsi, l'objectif étant d'améliorer au maximum ces deux variables réponses, leurs importances ont été multipliées par 3 tandis que celle des variables indépendantes ont été maintenues à 1 (Tableau 25).

Tableau 25 : restrictions sur les variables indépendantes et les variables réponses

Variables	Cible	Limite inférieure	Limite supérieure	Poids inférieur	Poids supérieur	Importance
A : <i>E. camaldulensis</i>	minimiser	0,25	0,75	1	1	1
B : <i>C. citratus</i>	minimiser	0,25	0,75	1	1	1
DPPH	minimiser	11,80	38,20	1	1	3
FRAP	maximiser	570,20	855,00	1	1	3

Les conditions optimales, qui ont été déterminées pour permettre d'améliorer au maximum l'activité antioxydante des extraits tout en utilisant des concentrations les plus faibles possibles des extraits, sont: A = 0,66 µg/mL et B = 0,25 µg/mL (soit un ratio d'environ 2,6/1 ; A/B).

Sous ces conditions optimales, plusieurs analyses ont été réalisées et les résultats expérimentaux et théoriques (prédits par le modèle) ont été comparés. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 26. Aucune différence significative n'a été notée entre les différents résultats obtenus dans un intervalle de confiance à 95%.

Tableau 26 : vérification et confirmation des conditions optimales des activités antioxydantes évaluées

Réponses	DPPH (µg/mL)	FRAP (mg ET/g)
Expérimentales	16,3±2,1	798,6±27,3
Prédites	14,1±3,3	788,3±35,8
IC à 95%	[9,3 ; 18,9]	[735,6 ; 841,0]

IC : Intervalle de confiance

Conclusion

Nous avons dans un premier temps étudié la stabilité des composés bioactifs, tels que les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier, présents dans les extraits optimisés à partir des feuilles des deux plantes étudiées, *E. camaldulensis* et *C. citratus*. Les résultats ont montré que le solvant A (eau) induit une plus forte dégradation des TPT et TFT pendant le stockage, ce qui se marque par une forte diminution des propriétés antioxydantes

DPPH et FRAP. D'une manière générale, les extraits secs ont exhibé une meilleure stabilité comparé au solvant B (éthanol 70%) et au solvant A (eau distillée).

Quant aux effets de la température sur le pouvoir antiradicalaire des échantillons, il a été observé une chute significative des activités DPPH et FRAP après 30 jours de stockage pour tous les échantillons *E. camaldulensis* et *C. citratus* conservés à 50°C et à température ambiante. Dans ces mêmes conditions, l'activité DPPH a été observée relativement constante pour les échantillons de *E. camaldulensis*. A l'exception des échantillons conservés dans le solvant A (eau), nous avons constaté une conservation des propriétés antiradicalaires de 60 à 120 jours lorsque les échantillons sont stockés à 4°C.

Dans un second temps, la MSR a permis de déterminer les conditions optimales de formulation d'extrait par combinaison des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et *C. citratus*. La combinaison des deux extraits en proportions équivalentes a mené à la plus forte activité DPPH. Les résultats ont également indiqué que l'espèce *E. camaldulensis* contribue le plus à l'ensemble de l'activité antioxydante (DPPH et FRAP), environ 2,6 fois par rapport à l'espèce *C. citratus*.

Conclusion générale et perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Rappelons que l'objectif initial de la présente étude se situait dans un contexte général de valorisation des plantes locales à effet pesticides au profit du développement du maraîchage agroécologique au Burkina Faso. Il s'agissait dans un premier temps, d'optimiser l'extraction des composés bioactifs des feuilles de deux plantes locales (*E. camaldulensis* et *C. citratus*) et, dans un second temps, d'étudier leurs stabilités en fonction du temps et sous différentes conditions de conservation.

Ainsi, une approche de méthodologie de surface de réponse (MSR) a permis d'analyser spécifiquement l'influence de trois variables indépendantes, à savoir le ratio liquide-solide, la température et le temps d'extraction. L'analyse des résultats expérimentaux a montré que les variables température, temps et ratio liquide-solide affectent significativement les différentes réponses étudiées à savoir le rendement d'extraction, les TPT, les TFM et les propriétés antioxydantes (DPPH et FRAP). Pour chacune des réponses, le coefficient de détermination était proche de 0,9. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de ces deux plantes a été optimale puisque les extraits obtenus ont présenté des activités antioxydantes et des teneurs supérieures en phénoliques totaux comparées à celles trouvées dans des cas d'extraction appliquant une méthodologie d'extraction conventionnelle classique avec des biomasses similaires. De plus, aux conditions optimales d'extraction, toutes les variables d'entrées ont été minimisées, ce qui traduit une faible consommation en solvant, en énergie et une réduction considérable du temps d'extraction. L'extrait optimisé des feuilles de *E. camaldulensis* a présenté des rendements (28%) et des TPT (342 mg EAG/g) supérieurs à ceux obtenus à partir de *C. citratus*. (rendement : 14%; TPT : 238 mg EAG/g). Cependant, les TFT ont été plus importantes dans les extraits de *C. citratus* (51 mg/g) comparativement à celles enregistrées dans les extraits de *E. camaldulensis* (24 mg/g). Les résultats ont également révélé un potentiel antioxydant (DPPH et FRAP) plus intéressant des extraits des feuilles de *E. camaldulensis* par rapport à ceux *C. citratus*.

Les extraits obtenus des feuilles des deux plantes ont été qualitativement et quantitativement caractérisés par les techniques de CCM, ATG, FT-IR, spectrophotométrie UV-vis et LC-MS. L'analyse des extraits par la LC-MS et LC-MS/MS a permis d'identifier respectivement huit et dix flavonoïdes glycosylés majeurs dans les extraits de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*.

La stabilité des composés bioactifs, notamment les composés phénoliques présents dans les extraits optimisés à partir des feuilles des deux plantes étudiées, *E. camaldulensis* et *C. citratus*

ainsi que leurs propriétés antioxydantes, ont été étudiées sous différentes conditions de conservation. Les résultats ont montré que le solvant A (eau) a induit une plus forte dégradation des TPT, des TFT (éventuellement des TFM) ainsi que des propriétés antioxydantes (DPPH et FRAP) durant le processus de conservation. Il ressort aussi de l'étude que les composés phénoliques des extraits ont essentiellement présenté de meilleure stabilité sous $T = 4^{\circ}\text{C}$ pour les extraits secs, suivis de ceux solubilisés dans le solvant B (éthanol 70%). Par contre, à $T =$ ambiante et $T = 50^{\circ}\text{C}$, de fortes dégradations des composés phénoliques sont observées. Enfin, dans un plan composite complet utilisant la combinaison des extraits optimisés des feuilles de *E. camaldulensis* (A) et de *C. citratus* (B), il a été montré qu'un mélange de 0,5 de l'extrait A et 0,5 de l'extrait B, a exhibé la plus forte activité antiradicalaire DPPH. Les résultats ont également indiqué qu'aux conditions optimales, la contribution de l'espèce *E. camaldulensis* était environ 2,5 fois plus importante que celle de l'espèce *C. citratus* à l'activité antioxydante maximale (DPPH et FRAP) due au phénolique totaux car la citronnelle est plus riche en flavonoïdes.

Nous pouvons donc considérer que l'approche utilisée dans cette étude, de par sa simplicité de mise en œuvre, pourrait être appliquée par les producteurs maraîchers pour optimiser le processus d'extraction des TPT à partir des feuilles de *E. camaldulensis* et de *C. citratus*, utilisées pour lutter efficacement contre les parasites des cultures.

Au regard des résultats obtenus dans cette étude, il conviendrait de poursuivre l'étude en évaluant l'activité biologique des extraits optimisés de *E. camaldulensis* et *C. citratus*, ainsi que celle de la combinaison des deux extraits obtenus, sur des souches bactériennes et fongiques des cultures maraîchères. Ces tests en laboratoire puis sur des parcelles standardisées en milieu réel permettront de valider l'efficacité des extraits.

Dans le cadre de la mise en œuvre du projet BIORAF-MA, une micro-raffinerie a été implémentée sur le site de l'association « *La Saisonnière* » en vue d'une production et commercialisation de bio-intrants. Il serait pertinent d'extrapoler à l'échelle de la bioraffinerie l'extraction des extraits qui ont présenté les meilleurs résultats phytosanitaires. A l'instar de l'association « *La Saisonnière* », la plupart des associations de production des produits maraîchers utilise des eaux de forage ou des eaux de surface (marigots ou lacs) comme solvants d'extraction. Ces eaux sont des sources potentielles d'éléments minéraux et autres impuretés solubles ou insolubles. Il sera également nécessaire d'étudier l'influence de la qualité de ces eaux sur l'extraction et les propriétés biologiques des molécules bioactives des plantes biopesticides.

Références

Références :

- [1] Ministère de l'Agriculture et des Aménagements Hydro-agricoles (2021) Evaluation de l'impact de la pandémie de la covid-19 sur l'agriculture et la sécurité alimentaire et nutritionnelle. Rapport définitif.pdf.
- [2] Ministère de l'Agriculture, de l'Hydraulique et des Ressources Halieutiques (2007). Analyse de la filière maraîchage au Burkina Faso.pdf.
- [3] R. A. Ouédraogo, F. C. Kambiré, M.-P. Kestemont, and C. L. Biolders (2019) Caractériser la diversité des exploitations maraîchères de la région de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso pour faciliter leur transition agroécologique. *Cah. Agric.*, vol. 28, p. 20, doi: 10.1051/cagri/2019021.
- [4] D. Son, I. Somda, A. Legreve, and B. Schiffers (2017) Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du Burkina Faso et risques pour la santé et l'environnement. *Cah. Agric.*, vol. 26, no. 2, Art. no. 2, doi: 10.1051/cagri/2017010.
- [5] B. Tarnagda, A. Tankoano, F. Tapsoba, B. P. Sourabié, O. A. Hissein, A. O. Djibrine, K. M. Drabo, Y. Traoré, A. Savadogo (2017) Évaluation des pratiques agricoles des légumes feuilles : le cas des utilisations des pesticides et des intrants chimiques sur les sites maraîchers de Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Appl. Biosci.*, vol. 117, pp. 11658–11668, doi: 10.4314/jab.v117i1.3.
- [6] V. R. Sawadogo (2016) Pratiques paysannes d'utilisation des pesticides en cultures maraîchères et leurs effets induits dans la Vallée du Sourou : Cas du périmètre de Di. Institut du Développement Rural (IDR), Université Nazi BONI
- [7] T. Bakary, F. Guira, P. B. Sourabié, O. Zongo, F. Tapsoba, C. Zongo, K. Maxime Drabo, Y. Traoré S. Aly (2019). Evaluation of heavy metals and pesticides contents in market-gardening products sold in some principal markets of Ouagadougou (Burkina Faso) *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, vol. 8, pp. 1026–1034, doi: 10.15414/jmbfs.2019.8.4.1026-1034.
- [8] K. Coulibaly, E. Vall, P. Autray, and P. M. Sedogo (2012) Technical and economic performance of maize/cowpea and maize/mucuna associations in the real situation of cultivation in Burkina Faso: potentials and constraints. *Tropicultura*, vol. 30, no. 3, pp. 147–154.
- [9] M. Sawadogo, K. Savadogo, and P. Zahonogo (2022) Technologie de cultures associées et efficacité technique des ménages agricoles au Burkina Faso,” *Tropicultura*.

- [10] R. N. Bennett and R. M. Wallsgrove (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.*, vol. 127, no. 4, pp. 617–633.
- [11] A. Crozier, I. B. Jaganath, and M. N. Clifford (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, in *Plant Secondary Metabolites*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–24. doi: 10.1002/9780470988558.ch1.
- [12] M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, and D. Ryan, (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, vol. 125, no. 5, pp. 989–1009.
- [13] L. A. de la Rosa, J. O. Moreno-Escamilla, J. Rodrigo-García, and E. Alvarez-Parrilla, (2019) Phenolic compounds, in *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. Elsevier, pp. 253–271.
- [14] Y. Ozay, S. Ozdemir, S. Gonca, O. Canli, and N. Dizge, (2021) Phenolic compounds recovery from pistachio hull using pressure-driven membrane process and a cleaner production of biopesticide. *Environ. Technol. Innov.*, vol. 24, p. 101993, doi: 10.1016/j.eti.2021.101993.
- [15] L. Schnarr, M. L. Segatto, O. Olsson, V. G. Zuin, and K. Kümmerer (2022) Flavonoids as biopesticides – Systematic assessment of sources, structures, activities and environmental fate. *Sci. Total Environ.*, vol. 824, p. 153781, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153781.
- [16] Ministère de l'Economie, des Finances et de la Prospective (2022) Les comptes nationaux de 2021, premières estimations à partir des CNT.pdf.”
- [17] A. Fromageot (2007) Colonisation maraîchère des rives des petits barrages : une nouvelle géographie, *L'eau En Partage Petits Barrages Cote D'Ivoire IRD Montp.*, pp. 229–243, Accessed: Nov. 16, 2023. [Online]. Available: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/ed-06-08/010040052.pdf
- [18] M. Ouedraogo (1995) Histoire et conséquences de l'introduction du maraichage en zone soudano-sahélienne au Burkina Faso. *Innov. Sociétés Quelles Agric. Quelles Innov. 2 Divers. L'innovation*, pp. 257–263.
- [19] Ministère de l'Agriculture et des Aménagements Hydro-agricoles (2021) Annuaire des statistiques agricoles 2020. Version définitive.pdf.
- [20] D. Son, F. K.B., S. Bonzi, B. Schiffrers, I. Somda, A. Legreve (2018) Assessment of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Producers' Exposure Level to Pesticides, in Kouka and Toussiana (Burkina Faso). *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 15, no. 2, Art. no. 2, doi: 10.3390/ijerph15020204.

- [21] FAO (2012) La Production et Protection Intégrées appliquée aux cultures maraîchères en Afrique soudano-sahélienne. Plant Production and Protection Division, p.158.
- [22] M. de Kouassi (2001) La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *Vertigo - Rev. Électronique En Sci. Environ.*, no. Volume 2 Numéro 2, Art. no., doi: 10.4000/vertigo.4101.
- [23] FAO (2022) Statistical Yearbook – World Food and Agriculture, no. Rome, Italy, doi: 10.4060/cc2211en.
- [24] F. Ouédraogo and P. K. Tapsoba, (2022) Diversity of market gardening farms in western Burkina Faso. Nexus between production environment, farm size, financial performance and environmental issues. *Heliyon*, vol. 8, no. 12, p. e12.
- [25] N. Stanislas Dimitri Meda, C. Palm, N. Romaric Meda, and E. Kabre (2022) Investigations toxicologiques dans un cas d'intoxication alimentaire collective d'une famille au Burkina Faso. *Toxicol. Anal. Clin.*, vol. 34, no. 3, Supplement, pp. S142–S143, doi: 10.1016/j.toxac.2022.06.237.
- [26] R. W. A. Naré, P. W. Savadogo, Z. Gnankambary, H. B. Nacro, and M. P. Sedogo (2015) Analyzing risks related to the use of pesticides in vegetable gardens in Burkina Faso. *Agric. For. Fish.*, vol. 4, no. 4, pp. 165–172.
- [27] E. Lehmann, C. Oltramare, J.-J. N. Dibié, Y. Konaté, and L. F. de Alencastro (2018) Assessment of human exposure to pesticides by hair analysis: The case of vegetable-producing areas in Burkina Faso. *Environ. Int.*, vol. 111, pp. 317–331.
- [28] E. Lehmann, N. Turrero, M. Kolia, Y. Konaté, and L. F. De Alencastro (2017) Dietary risk assessment of pesticides from vegetables and drinking water in gardening areas in Burkina Faso. *Sci. Total Environ.*, vol. 601, pp. 1208–1216.
- [29] A. Sanou, K. Konate, S. Hemayoro, R. Dakuyo, D. Mamounata, and M. H. Dicko (2020) Cultural practices and pesticides contamination level of tomato in two gardening sites in the region of Boucle du Mouhoun, Burkina Faso. *Afr. J. Agric. Res.*, vol. 16, no. 10, pp. 1334–1341.
- [30] S. S. Rouamba (2021) Assessment of the contamination of *Lactuca sativa* L.(lettuce) and *Lycopersicon esculentum* (tomato) by pesticides: Case of market gardeners in Ouagadougou. *Int J One Health*, vol. 7, pp. 251–256.
- [31] Y. Tembo (2018) Pesticidal Plant Extracts Improve Yield and Reduce Insect Pests on Legume Crops Without Harming Beneficial Arthropods. *Front. Plant Sci.*, vol. 9, Accessed: Mar. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01425>

- [32] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, and C. I. Ukaegbu (2021) Extraction of phenolic compounds: A review,” *Curr. Res. Food Sci.*, vol. 4, pp. 200–214, doi: 10.1016/j.crfs.2021.03.011.
- [33] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, p. e47, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [34] A. Pandey, T. Belwal, K. C. Sekar, I. D. Bhatt, and R. S. Rawal (2018) Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Ind. Crops Prod.*, vol. 119, pp. 218–225, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.04.019.
- [35] S. Chaudhary (2017) Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Front. Plant Sci.*, vol. 8, Accessed: Aug. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00610>
- [36] Y. A. Hajam, S. Rai, R. Kumar, M. Bashir, and J. A. Malik (2020) Phenolic Compounds from Medicinal Herbs: Their Role in Animal Health and Diseases – A New Approach for Sustainable Welfare and Development. in *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture : Volume I*, R. Lone, R. Shuab, and A. N. Kamili, Eds., Singapore: Springer, pp. 221–239. doi: 10.1007/978-981-15-4890-1_10.
- [37] P. C. Stevenson and S. R. Belmain (2016) Pesticidal Plants in African Agriculture: Local Uses and Global Perspectives. *Outlooks Pest Manag.*, vol. 27, no. 5, pp. 226–230, doi: 10.1564/v27_oct_10.
- [38] M. W. McDonald, M. I. H. Brooker, and P. A. Butcher (2009) A taxonomic revision of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae),” *Aust. Syst. Bot.*, vol. 22, no. 4, pp. 257–285, Accessed: Dec. 01, 2023. [Online]. Available: <https://www.publish.csiro.au/SB/SB09005>
- [39] A. Ghasemian, M. Eslami, F. Hasanvand, H. Bozorgi, and H. R. Al-abodi (2019) *Eucalyptus camaldulensis* properties for use in the eradication of infections. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 65, pp. 234–237, doi: 10.1016/j.cimid.2019.04.007.
- [40] D. R. Batish, H. P. Singh, R. K. Kohli, and S. Kaur (2008) Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *For. Ecol. Manag.*, vol. 256, no. 12, pp. 2166–2174, doi: 10.1016/j.foreco.2008.08.008.
- [41] V. A. Sabo and P. Knezevic (2019) Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Ind. Crops Prod.*, vol. 132, pp. 413–429.

- [42] M. A. Ghareeb, M. R. Habib, H. S. Mossalem, and M. S. Abdel-Aziz (2018) Phytochemical analysis of *Eucalyptus camaldulensis* leaves extracts and testing its antimicrobial and schistosomicidal activities. *Bull. Natl. Res. Cent.*, vol. 42, no. 1, p. 16, doi: 10.1186/s42269-018-0017-2.
- [43] M. A. Dkhil, H. M. A. Aljawdah, R. Abdel-Gaber, F. A. Thagfan, D. Delic, and S. Al-Quraishy (2023) The effect of *Eucalyptus camaldulensis* leaf extracts from different environmental harvesting locations on *Plasmodium chabaudi*-induced malaria outcome. *Food Sci. Technol.*, vol. 43, p. e006723.
- [44] U. Bashir and J. J. Tahira (2012) Evaluation of *Eucalyptus camaldulensis* against *Fusarium solani*. *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 14, no. 4.
- [45] O. A. O. Ishag, I.Y. Erwa, M.A. Diriye (2018) Antimicrobial Potential and Phytochemical Screening of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus microtheca* Leaves Extracts. *South Asian Research Journal of Natural Products*, 1(3): 1-6.
- [46] A. Sankara, J. C. W. Ouédraogo, L. Pignolet, M.-F. Thévenon, and Y. L. Bonzi-Coulibaly (2020) Chemical Profiles and Anti-termite Activity of Hydrodistillation Residues From Three Aromatic Plants Acclimated in Burkina Faso. *J. Agric. Sci.*, vol. 12, no. 8, p. 245, doi: 10.5539/jas.v12n8p245.
- [47] M. M. Iwu (2014) Handbook of African medicinal plants. CRC Press, Taylor & Francis Group
- [48] N. M. Kouame, M. Kamagate, C. Koffi, H. M. Die-Kakou, N. A. R. Yao, and A. Kakou (2016) *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. *Phytothérapie*, vol. 14, no. 6, pp. 384–392, doi: 10.1007/s10298-015-1014-3.
- [49] T. G. Dabire, S. Bonzi, I. Somda, and A. Legreve (2016) Activité antifongique d'extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Eclipta alba* (L.) Hassk. et *Portulaca oleracea* (L.) contre les principaux champignons transmis par les semences d'oignon (*Allium cepa* L.) au Burkina Faso. *Int. J. Innov. Appl. Stud.*, vol. 17, no. 3, p. 804.
- [50] E. Kouassi, I. Coulibaly, P. Rodica, A. Pintea, S. Ouattara, and A. Odagiu (2017) HPLC phenolic compounds analysis and antifungal activity of extract's from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf against *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* sp tulipae. *J. Sci. Res. Rep.*, vol. 14, no. 5, pp. 1–11.
- [51] C. Srihom (2021) Potential of herb crude extracts against Thai isolates of *Fusarium wilt* pathogens. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol. J. Fungal Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 570–584

- [52] N. Brihi (2018) Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. vol. 1, doi: 10.63019/ajb.v1i2.467.
- [53] E. Pichersky and R. A. Raguso (2018) Why do plants produce so many terpenoid compounds?," *New Phytol.*, vol. 220, no. 3, pp. 692–702, Accessed: Apr. 09, 2024. [Online]. Available: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.14178>
- [54] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, and H. Gruppen (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, vol. 68, no. 3, pp. 275–297, 2007.
- [55] Z. Chen (2018) Cytotoxicity, Hemolytic Toxicity, and Mechanism of Action of Pulsatilla Saponin D and Its Synthetic Derivatives. *J. Nat. Prod.*, vol. 81, no. 3, pp. 465–474, doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00578.
- [56] P. Savarino, E. Colson, J. André, and P. Gerbaux (2023) Horse Chestnut Saponins-Escins, Isoescins, Transescins, and Desacylescins. *Mol. Basel Switz.*, vol. 28, no. 5, p. 2087, doi: 10.3390/molecules28052087.
- [57] C. Vriet, E. Russinova, and C. Reuzeau (2012) Boosting crop yields with plant steroids," *Plant Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 842–857, doi: 10.1105/tpc.111.094912.
- [58] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, vol. 18, no. 2, Art. no. 2, doi: 10.3390/molecules18022328.
- [59] P. C. Chikezie, C. O. Ibegbulem, and F. N. Mbagwu (2015) Medicinal potentials and toxicity concerns of bioactive principles. *Med Aromat Plants*, vol. 4, no. 3, pp. 1–15.
- [60] N. Medina-Torres, T. Ayora-Talavera, H. Espinosa-Andrews, A. Sánchez-Contreras, and N. Pacheco (2017) Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, vol. 7, no. 3, Art. no. 3, doi: 10.3390/agronomy7030047.
- [61] V. Cheynier (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1, pp. 223S–229S.
- [62] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, vol. 51, pp. 15–25, doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
- [63] M. Oroian and I. Escriche (2015) Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.*, vol. 74, pp. 10–36.

- [64] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584.
- [65] Y. Wang, S. Chen, and O. Yu (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, pp. 949–956.
- [66] G. Forkmann and W. Heller (1999) Biosynthesis of Flavonoids in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, pp. 713–748. doi: 10.1016/B978-0-08-091283-7.00028-X.
- [67] R. Brouillard and O. Dangles (1988) The flavonoids: advances in research since 1986. *JB Harb. Chapman Hall*, p. 525.
- [68] M. Carpena (2021) Flavonoids: a group of potential food additives with beneficial health effects. IntechOpen
- [69] J. Khan (2021) Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic. doi: 10.20944/preprints202106.0305.v1.
- [70] L. Bravo (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333.
- [71] S. Anitha, S. Krishnan, K. Senthilkumar, and V. Sasirekha (2020) Theoretical investigation on the structure and antioxidant activity of (+) catechin and (-) epicatechin—a comparative study. *Mol. Phys.*, vol. 118, no. 17, p. e1745917.
- [72] M. Murkovic (2016) Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, Eds., Oxford: Academic Press, pp. 346–351. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00539-0.
- [73] J. B. Harborne and H. Baxter (1999) *Handbook of Natural Flavonoids*, 2 vols.” Wiley, Chichester, 1800.
- [74] S. Martens and A. Mithöfer (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, vol. 66, no. 20, pp. 2399–2407.
- [75] B. Lowry, D. Lee, and C. Héban (1980) The origin of land plants: a new look at an old problem. *Taxon*, vol. 29, no. 2–3, pp. 183–197.
- [76] A. Basile, S. Giordano, J. A. López-Sáez, and R. C. Cobiánchi (1999) Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, vol. 52, no. 8, pp. 1479–1482.
- [77] C. Kong (2004) Allelochemicals and their transformations in the *Ageratum conyzoides* intercropped citrus orchard soils. *Plant Soil*, vol. 264, pp. 149–157.

- [78] I. R. Soriano, R. E. Asenstorfer, O. Schmidt, and I. T. Riley (2004) Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, vol. 94, no. 11, pp. 1207–1214.
- [79] M. M. Vuolo, V. S. Lima, and M. R. M. Junior (2019) Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. in *Bioactive compounds*, Elsevier, pp. 33–50.
- [80] T. D. Bruyne, L. Pieters, H. Deelstra, and A. Vlietinck (1999) Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 27, no. 4, pp. 445–459, doi: 10.1016/S0305-1978(98)00101-X.
- [81] D. Treutter (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–157, doi: 10.1007/s10311-006-0068-8.
- [82] D. C. Close and C. McArthur (2002) Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? *Oikos*, vol. 99, no. 1, pp. 166–172.
- [83] B. Halliwell and J. M. Gutteridge (2005) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- [84] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, vol. 4, no. 8, pp. 118–12, doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- [85] J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux, and J.-O. Defraigne (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 16, no. 4, pp. 233–239.
- [86] K. Ghedira (2005) Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, vol. 3, no. 4, pp. 162–169.
- [87] S.-M. Jeong (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 3389–3393.
- [88] T. Wang, Q. Li, and K. Bi (2018) Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 12–23.
- [89] F. A. Ragab, T. A. A. Yahya, M. M. El-Naa, and R. K. Arafa (2014) Design, synthesis and structure–activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 82, pp. 506–520.
- [90] M. Hidalgo, C. Sánchez-Moreno, and S. de Pascual-Teresa (2010) Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.*, vol. 121, no. 3, pp. 691–696.

- [91] A. Kumaran and R. Joel Karunakaran (2005) In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 40, no. 2, pp. 344–352, doi: 10.1016/j.lwt.2005.09.011.
- [92] A. Nasr, T. Saleem Khan, and G.-P. Zhu (2019) Phenolic compounds and antioxidants from *Eucalyptus camaldulensis* as affected by some extraction conditions, a preparative optimization for GC-MS analysis. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 49, no. 5, pp. 464–476, doi: 10.1080/10826068.2019.1575860.
- [93] W. C. B. Muala, Z. S. C. Desobgo, and N. E. Jong (2021) Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. *Heliyon*, vol. 7, no. 4, p. e06744.
- [94] J. Deravel, F. Krier, and P. Jacques (2014) Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Soc Env.*, p. 13.
- [95] J.-Y. Bae, Y.-H. Seo, and S.-W. Oh (2022) Antibacterial activities of polyphenols against foodborne pathogens and their application as antibacterial agents. *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 31, no. 8, pp. 985–997.
- [96] H. Kumar (2021) Applications of fruit polyphenols and their functionalized nanoparticles against foodborne bacteria: a mini review. *Molecules*, vol. 26, no. 11, p. 3447.
- [97] M. Oblak, M. Kotnik, and T. Solmajer (2007) Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 19, pp. 2033–2047.
- [98] M. Takó (2020) Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, vol. 9, no. 2, p. 165.
- [99] Y. Xie, J. Chen, A. Xiao, and L. Liu (2017) Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules*, vol. 22, no. 11, p. 1913.
- [100] R. Anil Kumar and H. G. Raj Kumar, “In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*,” *Asian J. Plant Sci. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 22–27, 2015.
- [101] A. Abdelkhalek, M. Z. Salem, A. M. Kordy, A. Z. Salem, and S. I. Behiry (2020) Antiviral, antifungal, and insecticidal activities of *Eucalyptus* bark extract: HPLC analysis of polyphenolic compounds. *Microb. Pathog.*, vol. 147, p. 104383.

- [102] K. Karunamoorthi, K. Ilango, and K. Murugan (2010) Laboratory evaluation of traditionally used plant-based insect repellent against the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, vol. 106, pp. 1217–1223.
- [103] E. L. Rice (1977) Some roles of allelopathic compounds in plant communities. *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 5, no. 3, pp. 201–206, doi: 10.1016/0305-1978(77)90005-9.
- [104] H. P. Bais, R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway, and J. M. Vivanco (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science*, vol. 301, no. 5638, pp. 1377–1380, doi: 10.1126/science.1083245.
- [105] F. Deng, M. Aoki, and Y. Yogo (2004) Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramineous plants. *Weed Biol. Manag.*, vol. 4, no. 1, pp. 49–55.
- [106] R. Amorati, M. C. Foti, and L. Valgimigli (2013) Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 46, pp. 10835–10847.
- [107] M. Vigan (2010) Essential oils: renewal of interest and toxicity. *Eur. J. Dermatol.*, vol. 20, no. 6, pp. 685–692.
- [108] M. Piochon (2008) Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Université du Québec à Chicoutimi.
- [109] L. Valgimigli (2012) Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. *Essent. Oils Nat. Food Addit.*, vol. 24, pp. 1–5.
- [110] E. M. Abdelfattah (2022) Insecticidal and Antifungal Activities of Chemically-Characterized Essential Oils from the Leaves of *Withania frutescens* L. *Life*, vol. 12, no. 1, p. 88.
- [111] I. Boulogne, P. Petit, H. Ozier-Lafontaine, L. Desfontaines, and G. Loranger-Merciris (2012) Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 4, pp. 325–347.
- [112] S. Russo, N. Cabrera, H. Chludil, M. Yaber-Grass, and S. Leicach (2015) Insecticidal activity of young and mature leaves essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chil. J. Agric. Res.*, vol. 75, no. 3, pp. 375–379.
- [113] T. Üstüner, Ş. Kordali, A. Usanmaz Bozhüyük, and M. Kesdek (2018) Investigation of Pesticidal Activities of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh (2018) *Rec. Nat. Prod.*, vol. 12, no. 6, pp. 557–568, doi: 10.25135/rnp.64.18.02.088.
- [114] C. Dima and S. Dima (2015) Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 5, pp. 29–35,.

- [115] F. J. Sutili, D. M. Gatlin III, B. M. Heinzmann, and B. Baldisserotto, (2018) Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Rev. Aquac.*, vol. 10, no. 3, pp. 716–726.
- [116] C. Turek and F. C. Stintzing (2013) Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 12, no. 1, pp. 40–53.
- [117] S. Velavan (2015) Phytochemical techniques-a review. *World J. Sci. Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 80–91.
- [118] L. A. Cabanillas-Bojórquez, E. P. Gutiérrez-Grijalva, L. A. Contreras-Angulo, S. Aviles-Gaxiola, and J. B. Heredia (2020) Biotechnology for extraction of plant phenolics. *Plant Phenolics Sustain. Agric. Vol. 1*, pp. 39–67.
- [119] A. A. Jovanović (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.*, vol. 179, pp. 369–380, doi: 10.1016/j.seppur.2017.01.055.
- [120] S. A. Moreira, E. M. Alexandre, M. Pintado, and J. A. Saraiva (2019) Effect of emergent non-thermal extraction technologies on bioactive individual compounds profile from different plant materials. *Food Res. Int.*, vol. 115, pp. 177–190.
- [121] J. E. Wong Paz, D. B. Muñoz Márquez, G. C. G. Martínez Ávila, R. E. Belmares Cerda, and C. N. Aguilar (2015) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrason. Sonochem.*, vol. 22, pp. 474–481, doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.06.001.
- [122] T. L. C. T. Barroso (2023) Optimization of a Microwave-Assisted Extraction Method for the Recovery of the Anthocyanins from Jabuticaba By-Products. *Agronomy*, vol. 13, no. 2, Art. no. 2, doi: 10.3390/agronomy13020556.
- [123] A. Alberti, A. A. F. Zielinski, D. M. Zardo, I. M. Demiate, A. Nogueira, and L. I. Mafra (2014) Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chem.*, vol. 149, pp. 151–158, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.086.
- [124] Y. Ez zoubi, M. Fadil, D. Bousta, A. El Ouali Lalami, M. Lachkar, and A. Farah (2021) Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: Optimization Using Response Surface Methodology. *J. Chem.*, vol. 2021, pp. 1–11, doi: 10.1155/2021/8830902.
- [125] S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins, and J. A. Teixeira (2011) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.*, vol. 83, pp. 173–179, doi: 10.1016/j.seppur.2011.09.036.

- [126] Y. Wang (2017) Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.*, vol. 218, pp. 152–158, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.058.
- [127] A.-N. Singab, N. Ayoub, E. Al-Sayed, O. Martiskainen, J. Sinkkonen, and K. Pihlaja (2011) Phenolic Constituents of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, with Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities. p. 10.
- [128] G. Costa, H. Grangeia, A. Figueirinha, I. V. Figueiredo, and M. T. Batista (2016) Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. *Ind. Crops Prod.*, vol. 83, pp. 738–745, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.008.
- [129] Z. Naseem, J. Iqbal, M. Zahid, A. Shaheen, S. Hussain, and W. Yaseen (2021) Use of hydrogen-bonded supramolecular eutectic solvents for eco-friendly extraction of bioactive molecules from *Cymbopogon citratus* using Box–Behnken design. *J. Food Meas. Charact.*, vol. 15, no. 2, pp. 1487–1498.
- [130] J. Goupy (2005) Pratiquer les plans d'expériences. DUNOD. *L'usine Nouv. Fr.*
- [131] V. L. Singleton and J. A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158.
- [132] P. Ribereau–gavon (1968) les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris.
- [133] F. Cuyckens, Y. L. Ma, G. Pocsfalvi, and M. Claeysi (2000) Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analisis*, vol. 28, no. 10, pp. 888–895.
- [134] F. Cuyckens and M. Claeys (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–15, doi: 10.1002/jms.585.
- [135] U. Justesen (2001) Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, vol. 36, no. 2, pp. 169–178.
- [136] P. Kachlicki, A. Piasecka, M. Stobiecki, and \Lukasz Marczak (2016) Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules*, vol. 21, no. 11, p. 1494.
- [137] A. de Villiers, P. Venter, and H. Pasch (2016) Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A*, vol. 1430, pp. 16–78.

- [138] Z. Lei (2015) Construction of an ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectral library of plant natural products and comparative spectral analyses. *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 14, pp. 7373–7381.
- [139] E. De Hoffmann and V. Stroobant (2007) *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons.
- [140] Q. M. Li and M. Claeys (1994) Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 7, pp. 406–416.
- [141] M.-J. Motilva, A. Serra, and A. Macià (2013) Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A*, vol. 1292, pp. 66–82.
- [142] C. Ho (2003) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 3–12, Accessed: Jul. 10, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>
- [143] L. Sleno and D. A. Volmer (2004) Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 10, pp. 1091–1112.
- [144] J. M. Wells and S. A. McLuckey (2005) Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods Enzymol.*, vol. 402, pp. 148–185.
- [145] Y. Ji (2020) Advances on the in vivo and in vitro glycosylations of flavonoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 104, pp. 6587–6600.
- [146] B. Yang, H. Liu, J. Yang, V. K. Gupta, and Y. Jiang (2018) New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 79, pp. 116–124.
- [147] T. J. Mabry and K. R. Markham (1975) *The Flavonoids*; Harborne, JB; Mabry, TJ, eds. Academic Press: New York.
- [148] B. Domon and C. E. Costello (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj. J.*, vol. 5, pp. 397–409.
- [149] J.-L. Wolfender, M. Maillard, A. Marston, and K. Hostettmann (1992) Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. *Phytochem. Anal.*, vol. 3, no. 5, pp. 193–214.
- [150] A. Petsalo, J. Jalonen, and A. Tolonen (2006) Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 224–231.

- [151] Q. M. Li, H. Van den Heuvel, L. Dillen, and M. Claeys (1992) Differentiation of 6-C- and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 4, pp. 213–221.
- [152] A. Palma, M. J. Díaz, M. Ruiz-Montoya, E. Morales, and I. Giráldez (2021) Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from *Eucalyptus globulus* leaves through antioxidant activity. *Ultrason. Sonochem.*, vol. 76, p. 105654, doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105654.
- [153] N. Trabelsi (2010) Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 4, pp. 632–639, doi: 10.1016/j.lwt.2009.11.003.
- [154] I. Ziani (2022) The effect of ethanol/water concentration on phenolic composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Rosmarinus tournefortii* de Noé hydrodistillation solid residues. *J. Food Meas. Character.*, doi: 10.1007/s11694-022-01722-6.
- [155] B. Gullón, P. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes (2017) Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Ind. Crops Prod.*, vol. 108, pp. 649–659, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.014.
- [156] N. Thiex, L. Novotny, and A. Crawford (2012) Determination of Ash in Animal Feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited. *J. AOAC Int.*, vol. 95, no. 5, pp. 1392–1397, doi: 10.5740/jaoacint.12-129.
- [157] R. G. Woisky and A. Salatino (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 99–105, doi: 10.1080/00218839.1998.11100961.
- [158] M. S. Blois (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200.
- [159] Z. Cheng, J. Moore, and L. Yu (2006) High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 20, pp. 7429–7436, doi: 10.1021/jf0611668.
- [160] I. F. F. Benzie and J. J. Strain (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- [161] B. Ouedraogo, J. Yoda, F. Kini, J. Claude Ouedraogo, M. Lompo, and S. Ouedraogo (2020) Research of Bioactive Chemical Markers in Trunk Bark Extracts of

- <i>Anogeissus leiocarpa</i>, a Traditional Herbal Remedy for Hypertension. *Am. J. Appl. Chem.*, vol. 8, no. 1, p. 6, doi: 10.11648/j.ajac.20200801.12.
- [162] O. A. Ojo (2017) Proximate study, mineral and anti-nutrient composition of *Cymbopogon citranus* leaves harvested from Ilorin, Nigeria: potential benefits in animal nutrition and health. *Wayamba J. Anim. Sci.*, vol. 9, 2017, Accessed: Oct. 23, 2023.
- [163] A. Pękal and K. Pyrzynska (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.
- [164] G. Marslin (2018) Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Materials*, vol. 11, no. 6, p. 940, doi: 10.3390/ma11060940.
- [165] H. Zieliński and H. Kozłowska (2000) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fractions. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 6, pp. 2008–2016, doi: 10.1021/jf990619o.
- [166] Q. D. Do (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 3, pp. 296–302, doi: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.
- [167] J. S. Boeing, É. O. Barizão, B. C. e Silva, P. F. Montanher, V. de Cinque Almeida, and J. V. Visentainer (2014) Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem. Cent. J.*, vol. 8, pp. 1–9.
- [168] N. Turkmen, F. Sari, and Y. S. Velioglu (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chem.*, vol. 99, no. 4, pp. 835–841.
- [169] K. K. Chew, M. Z. Khoo, S. Y. Ng, Y. Y. Thoo, W. W. Aida, and C. W. Ho (2011) Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Int. Food Res. J.*, vol. 18, no. 4, p. 1427.
- [170] J. E. Cacace and G. Mazza (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.*, vol. 59, no. 4, pp. 379–389, doi: 10.1016/S0260-8774(02)00497-1.
- [171] Z. Y. Ju and L. R. Howard (2003) Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 18, pp. 5207–5213, doi: 10.1021/jf0302106.

- [172] M. Pinelo, M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, and M. J. Núñez (2005) Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 2111–2117, doi: 10.1021/jf0488110.
- [173] H. Chaaban (2017) Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Preserv.*, vol. 41, no. 5, p. e13203, doi: 10.1111/jfpp.13203.
- [174] Q. Lu, Y. Peng, C. Zhu, and S. Pan (2018) Effect of thermal treatment on carotenoids, flavonoids and ascorbic acid in juice of orange cv. Cara Cara. *Food Chem.*, vol. 265, pp. 39–48, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.072.
- [175] J. K. Monrad, M. Suárez, M. J. Motilva, J. W. King, K. Srinivas, and L. R. Howard (2014) Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Res. Int.*, vol. 65, pp. 77–87, doi: 10.1016/j.foodres.2014.04.020.
- [176] C. Drosou, K. Kyriakopoulou, A. Bimpilas, D. Tsimogiannis, and M. Krokida (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind. Crops Prod.*, vol. 75, pp. 141–149, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.063.
- [177] C. Liyanapathirana and F. Shahidi (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, vol. 93, no. 1, pp. 47–56, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.050.
- [178] J. da C. Francisco and B. Sivik (2002) Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, vol. 23, no. 1, pp. 11–19, doi: 10.1016/S0896-8446(01)00131-0.
- [179] Q. Lu, Y. Peng, C. Zhu, and S. Pan (2018) Effect of thermal treatment on carotenoids, flavonoids and ascorbic acid in juice of orange cv. Cara Cara,” *Food Chem.*, vol. 265, pp. 39–48, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.072.
- [180] J. P. Maran, S. Manikandan, B. Priya, and P. Gurumoorthi (2015) Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 1, pp. 92–104, doi: 10.1007/s13197-013-0985-z.
- [181] H. Cao (2021) Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. *Food Front.*, vol. 2, no. 2, pp. 109–139, doi: 10.1002/fft2.65.

- [182] Y. Amakura (2002) Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *Food Chem.*, vol. 77, no. 1, pp. 47–56, doi: 10.1016/S0308-8146(01)00321-1.
- [183] L. Skrypnik and A. Novikova (2020) Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple Pomace Based on Nonionic Emulsifiers. *Agronomy*, vol. 10, no. 1, p. 92, doi: 10.3390/agronomy10010092.
- [184] O. F. Nwabor, S. Singh, D. M. Syukri, and S. P. Voravuthikunchai (2021) Bioactive fractions of *Eucalyptus camaldulensis* inhibit important foodborne pathogens, reduce listeriolysin O-induced haemolysis, and ameliorate hydrogen peroxide-induced oxidative stress on human embryonic colon cells. *Food Chem.*, vol. 344, p. 128571, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128571.
- [185] N. Meksem, O. Bordjiba, G. Nedjoud, M. Farfar, L. Meksem Amara, and M. R. Djebbar (2016) Study of the antimicrobial activity of the extracts of the *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* stemming from the Algerian Northeast. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 1–5.
- [186] S. Sourabié, J. Yoda, and A. Zoungrana (2020) Phytochemical investigation of five plants extracts used as antibacterial drugs in Burkina Faso. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, p. 15.
- [187] A. Ashraf, R. A. Sarfraz, A. Mahmood, and M. ud Din (2015) Chemical composition and in vitro antioxidant and antitumor activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaves,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 74, pp. 241–248, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.059.
- [188] E. Rosendal, J. C. W. OuÃ©draogo, C. Dicko, E. S. Dey, and Y. L. Bonzi-Coulibaly (2020) Geographical variation in total phenolics, flavonoids and antioxidant activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaves in Burkina Faso. *Afr. J. Pure Appl. Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 51–59, doi: 10.5897/AJPAC2020.0837.
- [189] I. Alghoraibi, Ch. Soukkarieh, R. Zein, A. Alahmad, J.-G. Walter, and M. Daghestani (2020) Aqueous extract of *Eucalyptus camaldulensis* leaves as reducing and capping agent in biosynthesis of silver nanoparticles. *Inorg. Nano-Met. Chem.*, vol. 50, no. 10, pp. 895–902, doi: 10.1080/24701556.2020.1728315.
- [190] K. Tahara, M. Nishiguchi, A. Frolov, J. Mittasch, and C. Milkowski (2018) Identification of UDP glucosyltransferases from the aluminum-resistant tree *Eucalyptus camaldulensis* forming β -glucogallin, the precursor of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry*, vol. 152, pp. 154–161, doi: 10.1016/j.phytochem.2018.05.005.

- [191] S. Y. Sah, C. M. Sia, S. K. Chang, Y. K. Ang, and H. S. Yim (2012) Antioxidant capacity and total phenolic content of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) leave. *Ann. Food Sci. Technol.*, vol. 13, no. 2, pp. 150–155.
- [192] C. P. Boeira (2018) Extraction of bioactive compounds of lemongrass, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity in fresh chicken sausage. *Ciênc. Rural*, vol. 48.
- [193] R. Sousa, A. Figueirinha, M. T. Batista, and M. E. Pina (2021) Formulation effects in the antioxidant activity of extract from the leaves of *Cymbopogon citratus* (Dc) stapf. *Molecules*, vol. 26, no. 15, p. 4518.
- [194] M. Ranitha, A. H. Nour, A. S. Ziad, H. N. Azhari, and S. ThanaRaj (2014) Optimization of microwave assisted hydrodistillation of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) using response surface methodology. *Int J Res Eng Technol*, vol. 3, no. 4, pp. 5–14.
- [195] I. Semay (2023) Plant specialized metabolites as a resource for bee conservation: chemical profiling of medicinal and melliferous plant species. Thesis, University of Mons, Belgium.
- [196] S. Pardeshi, R. Dhodapkar, and A. Kumar (2013) Quantum chemical density functional theory studies on the molecular structure and vibrational spectra of Gallic acid imprinted polymers. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 116, pp. 562–573, doi: 10.1016/j.saa.2013.07.067.
- [197] L. Ping, A. Pizzi, Z. D. Guo, and N. Brosse (2012) Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. *Ind. Crops Prod.*, vol. 40, pp. 13–20, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.039.
- [198] B. Gullón, P. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes (2017) Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Ind. Crops Prod.*, vol. 108, pp. 649–659, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.014.
- [199] A. M. Engida, S. Faika, B. T. Nguyen-Thi, and Y.-H. Ju (2015) Analysis of major antioxidants from extracts of *Myrmecodia pendans* by UV/visible spectrophotometer, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography/UV techniques. *J. Food Drug Anal.*, vol. 23, no. 2, pp. 303–309, doi: 10.1016/j.jfda.2014.07.005.

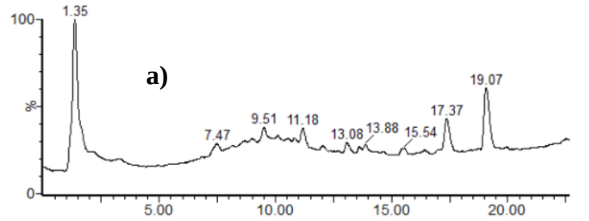
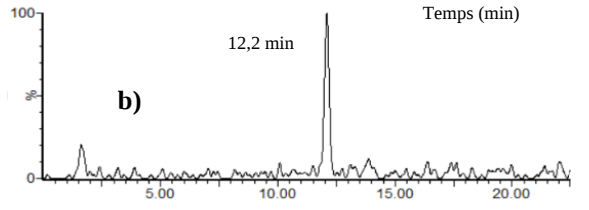
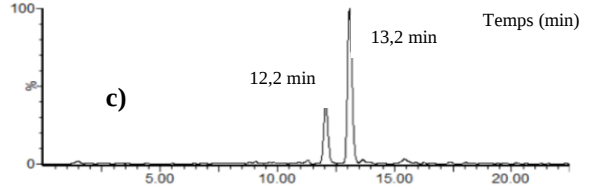
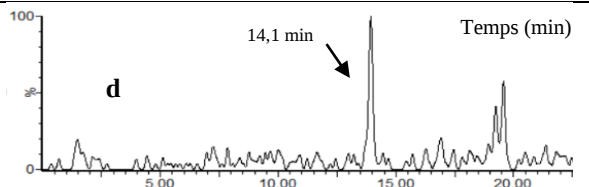
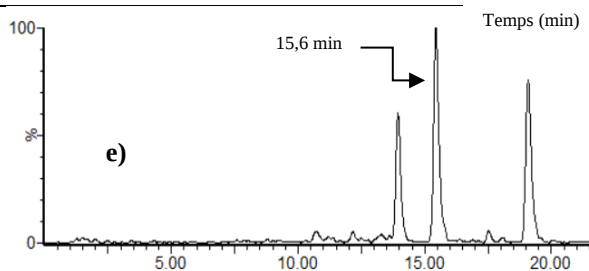
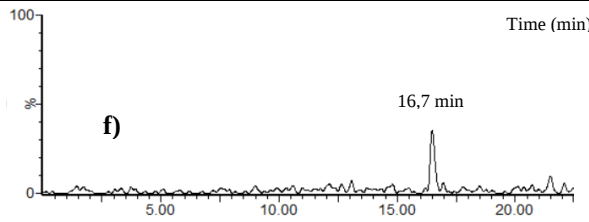
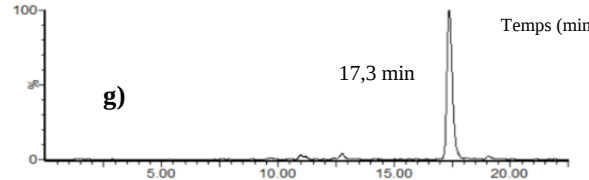
- [200] T. M. Böer, J. V. V. Procópio, T. G. do Nascimento, and R. O. Macêdo (2013) Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 73, pp. 18–23.
- [201] L. C. Malucelli (2018) Thermal and chemical characterization of *Dicksonia sellowiana* extract by means of thermal analysis. *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 28, no. 5, pp. 626–630, doi: 10.1016/j.bjp.2018.07.001.
- [202] A. M. T. M. Cordeiro (2013) Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 113, no. 2, pp. 889–895, doi: 10.1007/s10973-012-2778-4.
- [203] B. Gullón, A. Muñiz-Mouro, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes (2019) Green approaches for the extraction of antioxidants from eucalyptus leaves. *Ind. Crops Prod.*, vol. 138, p. 111473, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111473.
- [204] M. C. P. Santos and É. C. B. A. Gonçalves (2016) Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Sci. Agropecu.*, vol. 7, no. 1, pp. 7–14, doi: 10.17268/sci.agropecu.2016.01.01.
- [205] S. A. O. Santos, J. J. Villaverde, C. S. R. Freire, M. R. M. Domingues, C. P. Neto, and A. J. D. Silvestre (2012) Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis*×*E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. *Ind. Crops Prod.*, vol. 39, pp. 120–127, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.003.
- [206] P. Kachlicki, J. Einhorn, D. Muth, L. Kerhoas, and M. Stobiecki (2008) Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC-MS/MS metabolite profiling. *J. Mass Spectrom.*, vol. 43, no. 5, pp. 572–586.
- [207] Y. Chen (2015) Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules*, vol. 20, no. 10, pp. 18352–18366, doi: 10.3390/molecules201018352.
- [208] A. Figueirinha, A. Paranhos, J. J. Pérez-Alonso, C. Santos-Buelga, and M. T. Batista (2008) *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem.*, vol. 110, no. 3, pp. 718–728, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.045.
- [209] W. H. B. Hassan, S. Abdelaziz, and H. M. Al Yousef (2019) Chemical Composition and Biological Activities of the Aqueous Fraction of *Parkinsonia aculeata* L. Growing in Saudi Arabia. *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 3, pp. 377–387, doi: 10.1016/j.arabjc.2018.08.003.

- [210] L. Barros (2013) Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind. Crops Prod.*, vol. 41, pp. 41–45, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.03.038.
- [211] M. M. Giusti, L. E. Rodríguez-Saona, D. Griffin, and R. E. Wrolstad (1999) Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 11, pp. 4657–4664, doi: 10.1021/jf981242+.
- [212] A. Fernández-Agulló, M. S. Freire, and J. González-Álvarez (2015) Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Ind. Crops Prod.*, vol. 64, pp. 105–113, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.11.031.
- [213] F. Ferreres, B. M. Silva, P. B. Andrade, R. M. Seabra, and M. A. Ferreira (2003) Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.*, vol. 14, no. 6, pp. 352–359, doi: 10.1002/pca.727.
- [214] M. M. Marzouk, A. Elkhateeb, R. R. A. Latif, E.-S. S. Abdel-Hameed, S. A. Kawashty, and S. R. Hussein (2019) C-glycosyl flavonoids-rich extract of *Dipcadi erythraeum* Webb & Berthel. bulbs: Phytochemical and anticancer evaluations. *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 094–098.
- [215] L. Mäkilä, O. Laaksonen, H. Kallio, and B. Yang (2017) Effect of processing technologies and storage conditions on stability of black currant juices with special focus on phenolic compounds and sensory properties. *Food Chem.*, vol. 221, pp. 422–430.
- [216] G. J. Smith, S. J. Thomsen, K. R. Markham, C. Andary, and D. Cardon (2000) The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, vol. 136, no. 1–2, pp. 87–91, Accessed: Oct. 17, 2023. [Online].
- [217] S. Tommasini, D. Raneri, R. Ficarra, M. L. Calabrò, R. Stancanelli, and P. Ficarra (2004) Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 35, no. 2, pp. 379–387, Accessed: Oct. 17, 2023. [Online].
- [218] Y. Ungar, O. F. Osundahunsi, and E. Shimoni (2003) Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 15, pp. 4394–4399, doi: 10.1021/jf034021z.

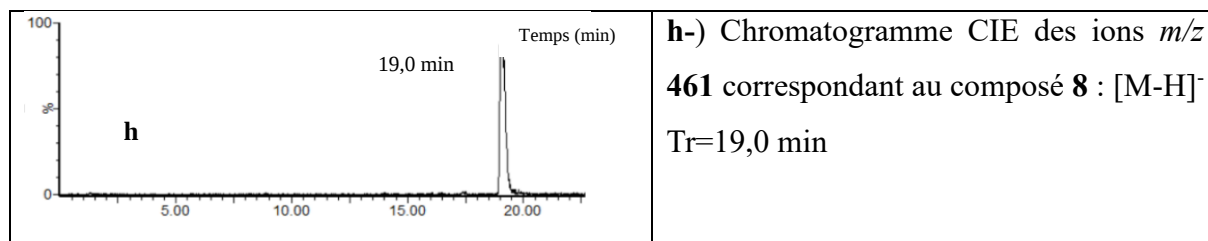
- [219] A. Ali, C. H. Chong, S. H. Mah, L. C. Abdullah, T. S. Y. Choong, and B. L. Chua (2018) Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried *Piper betle* extracts. *Molecules*, vol. 23, no. 2, p. 484.
- [220] S. Ferreyra, R. Bottini, and A. Fontana (2023) Background and Perspectives on the Utilization of Canes' and Bunch Stems' Residues from Wine Industry as Sources of Bioactive Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*
- [221] J. M. Koponen (2008) Characterization and Fate of Black Currant and Bilberry Flavonols in Enzyme-Aided Processing. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 9, pp. 3136–3144, doi: 10.1021/jf703676m.
- [222] M. Mochizuki, S. Yamazaki, K. Kano, and T. Ikeda (2023) Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.*, vol. 1569, no. 1–3, pp. 35–44, Accessed: Oct. 17, 2023.
- [223] M. Biesaga (2011) Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 18, pp. 2505–2512.

Annexes

Annexe.1. Extrait optimisé de *E. camaldulensis* (EC)

 a)	Figure.1. Analyse de l'extrait optimisé de EC a-) Chromatogramme de Courant Ionique Total (TIC)
 b)	b-) Chromatogramme du courant ionique extrait (CIE) des ions m/z 595 correspondant au composé 1 : $[M-H]^-$ Tr=12,2 min
 c)	c-) Chromatogramme CIE des ions m/z 431 correspondant aux composés 2 et 3 : $[M-H]^-$ Tr=12,2 min et Tr=13,2 min
 d)	d-) Chromatogramme CIE des ions m/z 609 correspondant au composé 4 : $[M-H]^-$ Tr=14,1 min
 e)	e-) Chromatogramme CIE des ions m/z 463 correspondant au composé 5 : $[M-H]^-$ Tr=15,6 min. Les signaux à 14,1 min et 19,0 min correspondent aux ions fragments de m/z 609 et 461, respectivement
 f)	f-) Chromatogramme CIE des ions m/z 593 correspondant au composé 6 : $[M-H]^-$ Tr=16,7 min
 g)	g-) Chromatogramme CIE des ions m/z 477 correspondant au composé 7 : $[M-H]^-$ Tr=17,3 min

Temps (min)



Spectres de masse CID et structures des composés identifiés

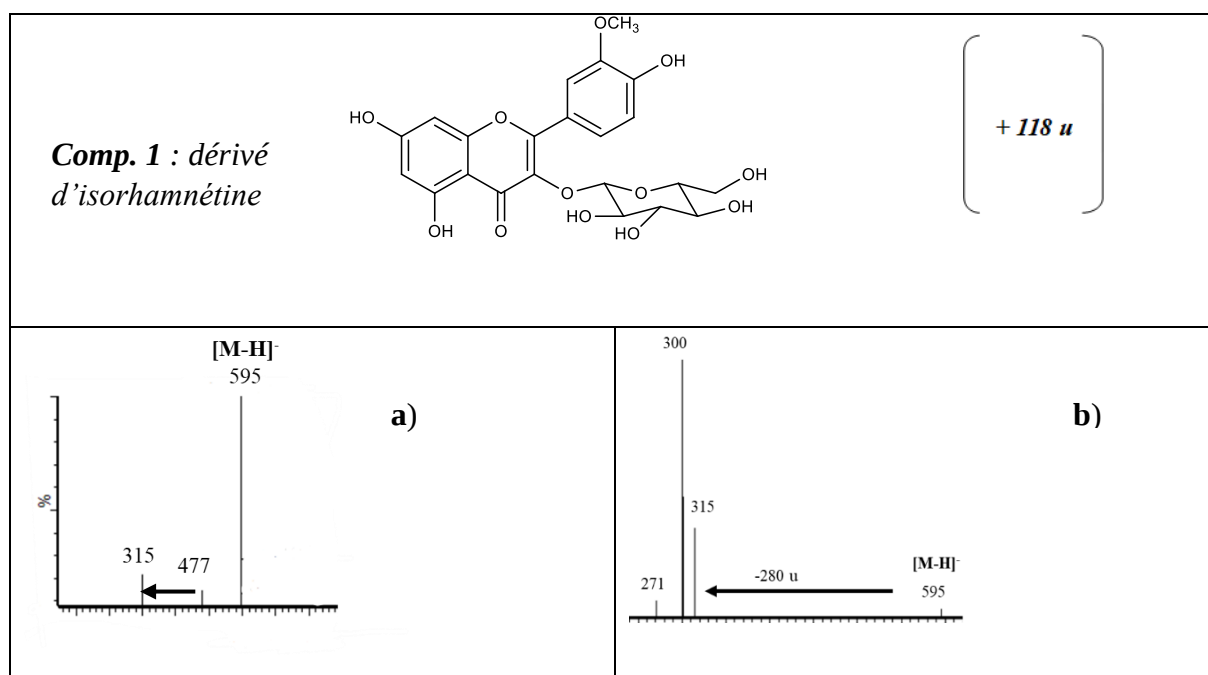
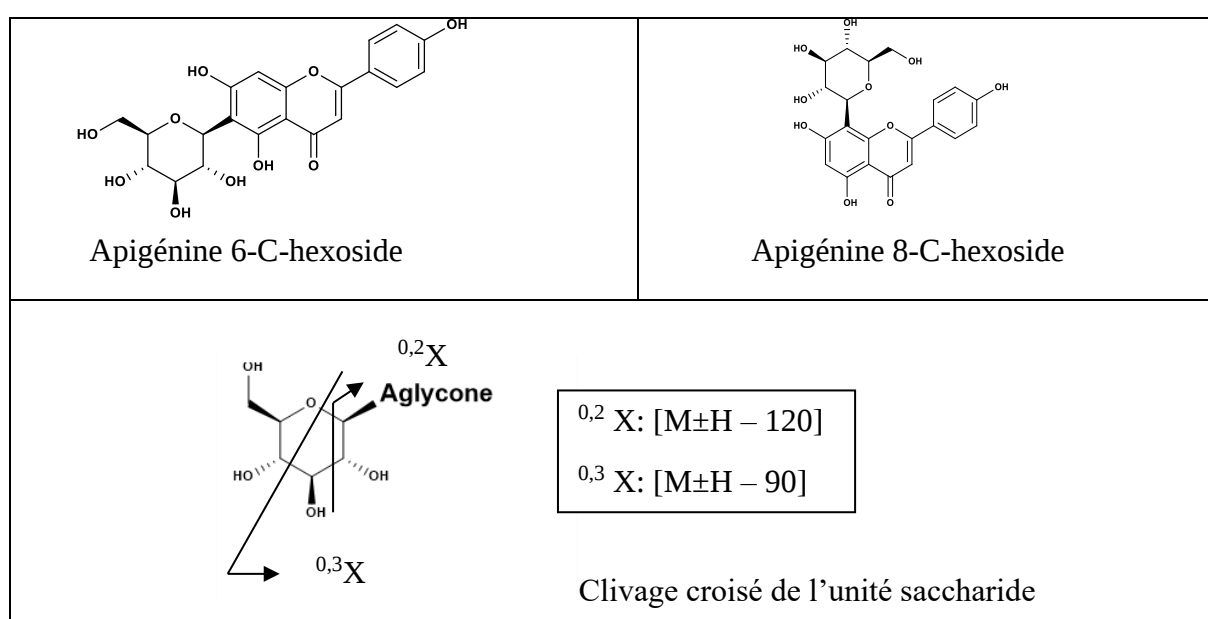


Figure 2. Spectre de masse en CID de m/z 595 $[M-H]^-$ ion correspondant à un dérivé d'isorhamnétine (composé 1). Waters QToF API-US, ESI(-); **a-** CE = 15 eV; **b-** CE = 45 eV.



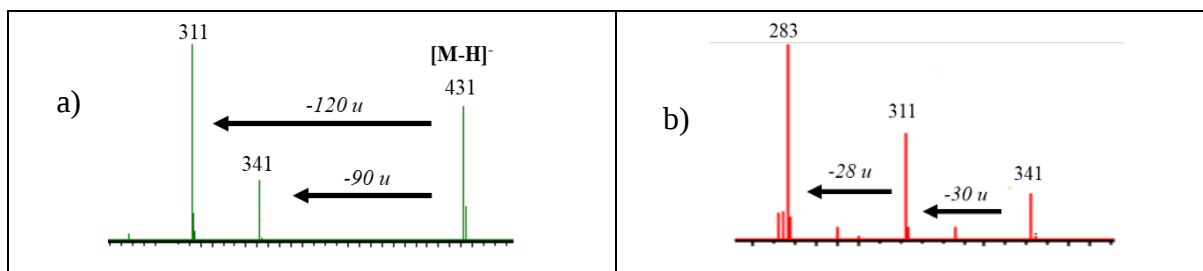


Figure 3. CID de flavonoïde déprotoné: spectre de masse en CID de m/z 431 $[M-H]^-$ ion correspondant à apigénine C-hexoside (composé isomères 2 et 3). Waters QToF API-US, ESI(-); a)-CE = 15 eV; b)-CE = 45 eV.

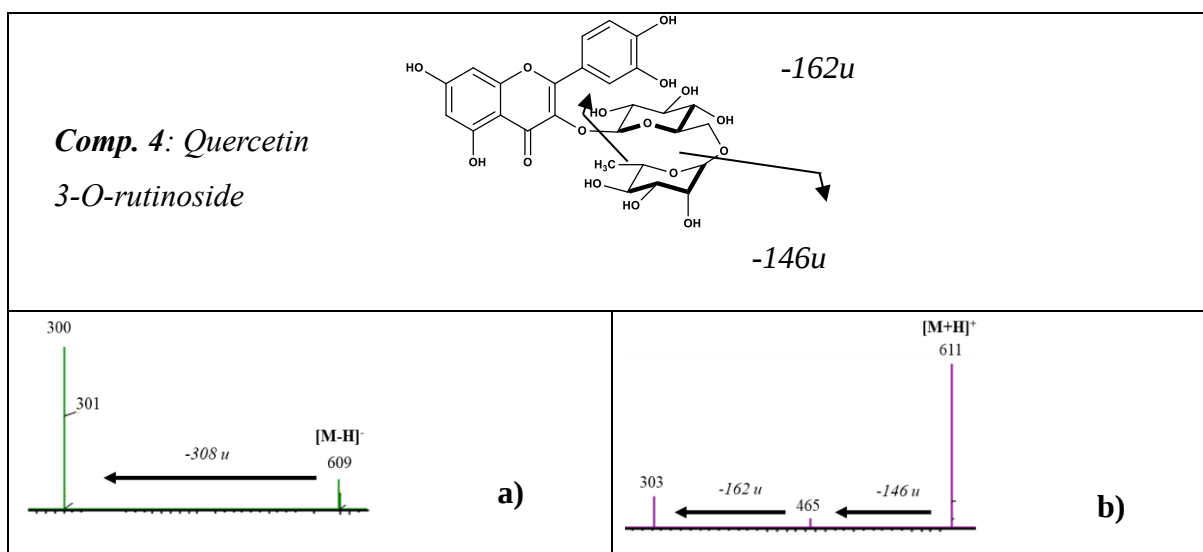


Figure 4. CID de flavonoïde déprotoné : spectre de masse en CID de m/z 609 $[M-H]^-$ ion correspondant à quercétine 3-O-rutinoside (composé 4). Waters Q-ToF API-US, a)-ESI(-), CE = 15 eV; b)-ESI(+), CE = 30 eV).

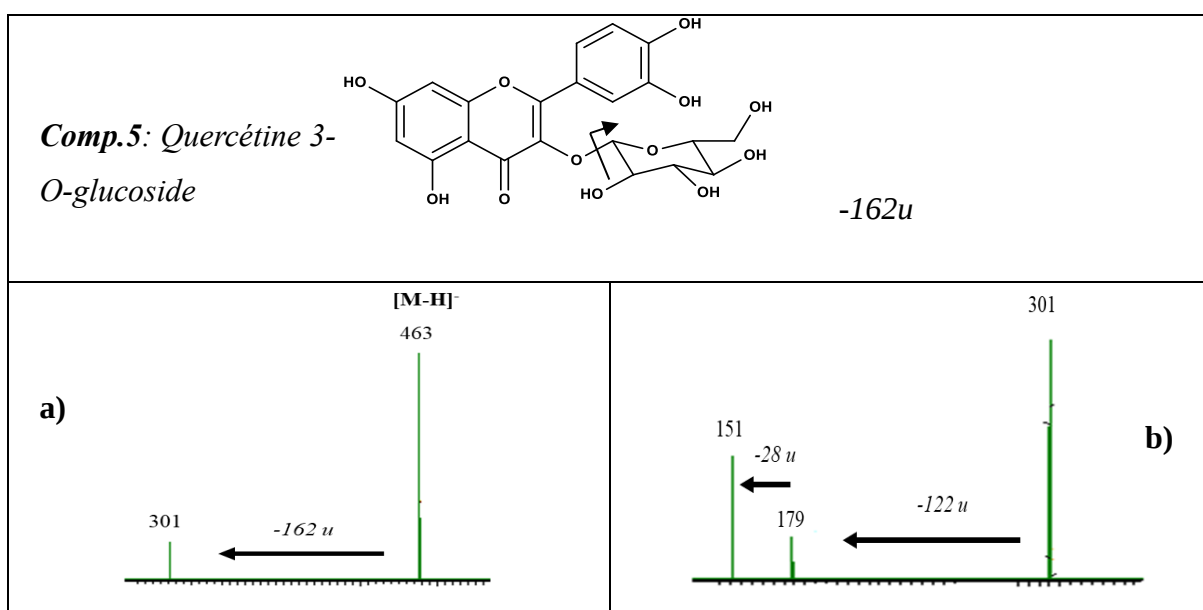


Figure 5. CID de flavonoïde déprotoné : spectre de masse en CID de m/z 463 $[M-H]^-$ ion correspondant quercétine 3-O-glucoside (composé 5). Waters Q-ToF API-US, ESI(-); **a**)-CE = 15 eV, **b**)-CE = 30 eV.

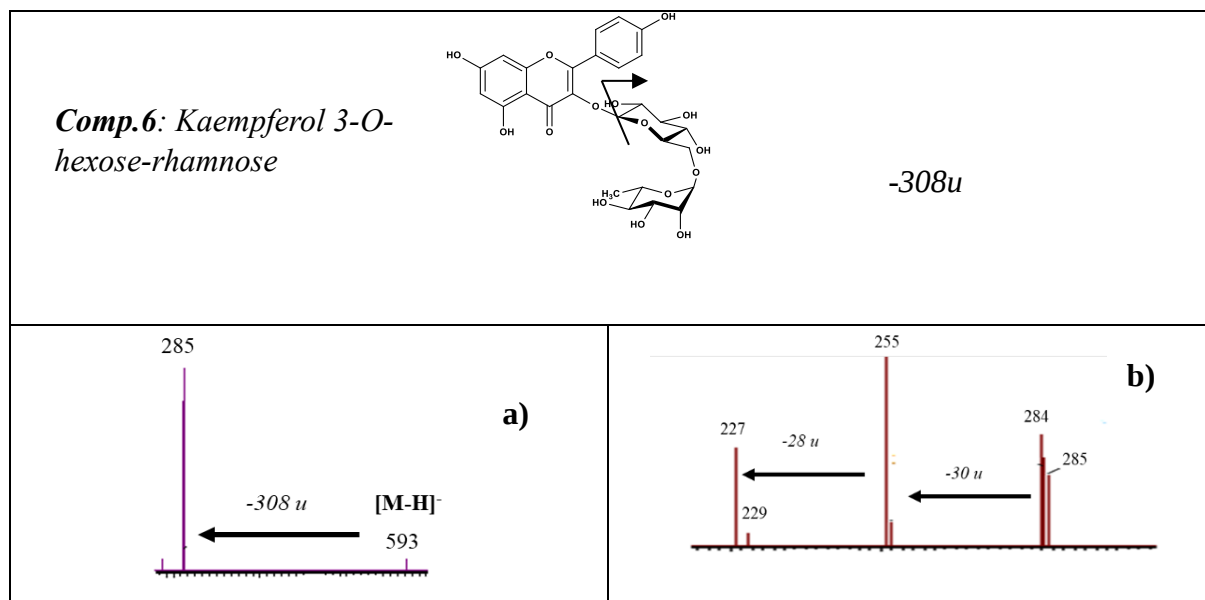


Figure 6. CID de flavonoïde deprotoné : spectre de masse en CID de m/z 593 $[M-H]^-$ ion correspondant à kaempférol O-hexose-rhamnose (composé 6). Waters Q-ToF API-US, ESI(-) ; **a**)-CE = 15 eV; **b**)-CE = 45 eV.

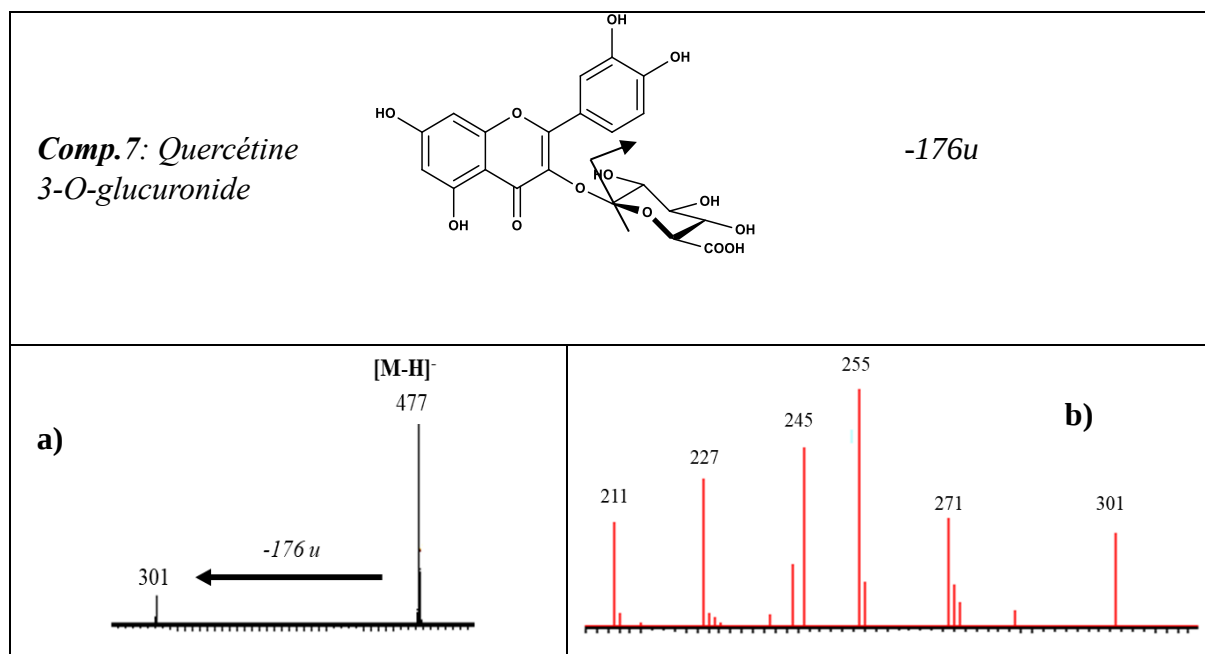


Figure 7. CID flavonoïde déprotoné: spectre de masse en CID de m/z 477 $[M-H]^-$ ion correspondant quercétine 3-O-glucuronide (composé 7). Waters Q-ToF API-US, ESI(-); **a**)-CE=15 eV; **b**)-CE = 30 eV.

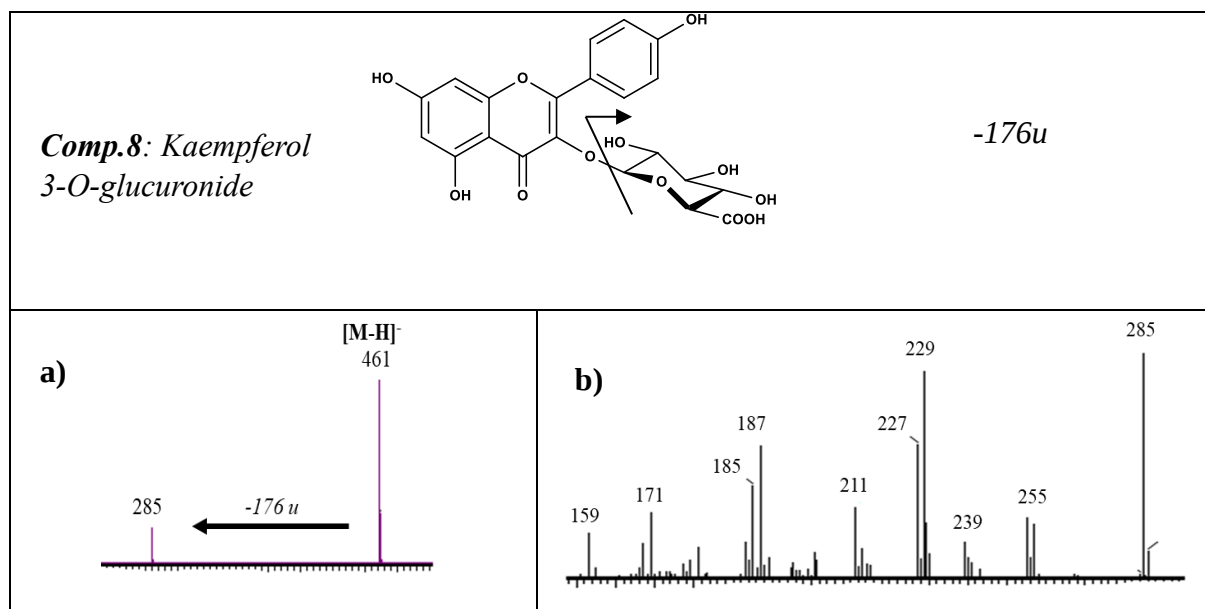


Figure 8. CID de flavonoïde deprotoné : spectres de masse en CID de m/z 461 $[M-H]^-$ ions correspondant kaempférol 3-O-glucuronide (composé **8**). Waters Q-ToF API-US, ESI(-); **a**)-CE=5 eV, **b**)-CE = 45 eV.

Annexe.2. Extrait optimisé de *C. citratus* (CC)

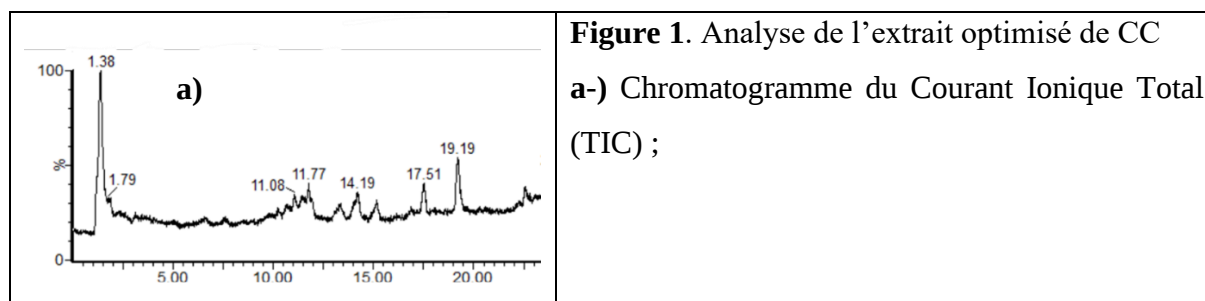
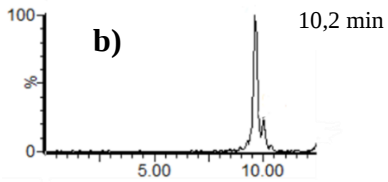
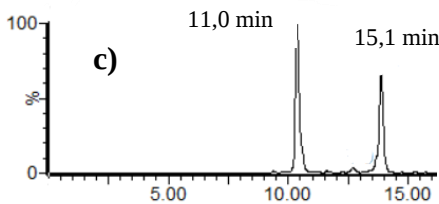
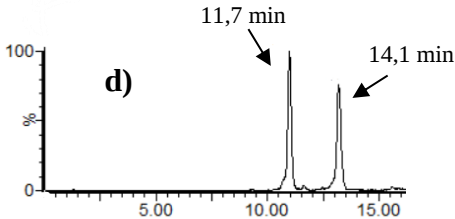
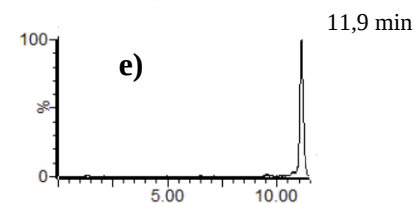
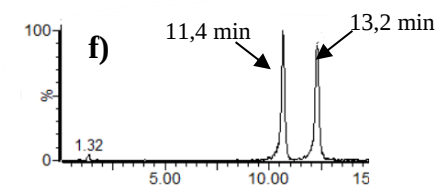
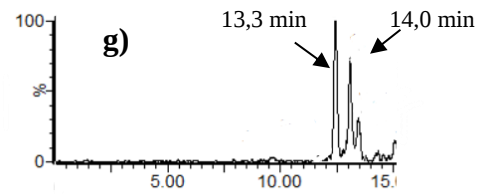
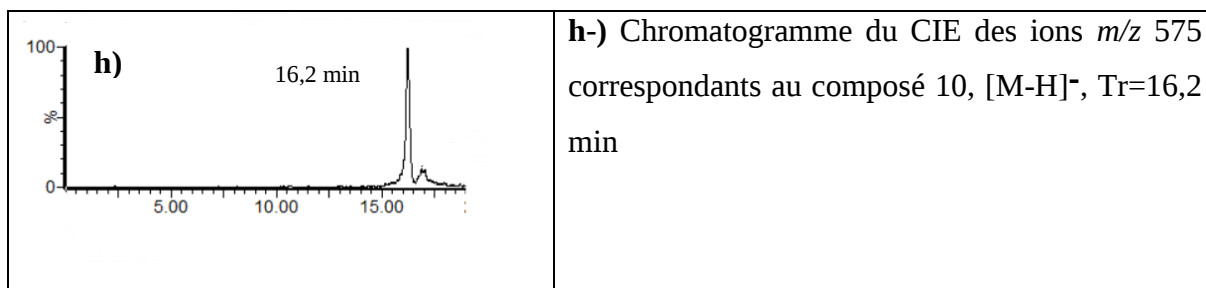


Figure 1. Analyse de l'extrait optimisé de CC
a)- Chromatogramme du Courant Ionique Total (TIC) ;

 b) 10,2 min	b-) Chromatogramme du Courant Ionique Extrait (CIE) des ions m/z 579 ; correspondants au composé 1, $[M-H]^-$; Tr=10,2 min
 c) 11,0 min 15,1 min	c-) Chromatogramme du CIE des ions m/z 563 correspondants aux composés isomères 2 et 9, $[M-H]^-$; Tr=11,0 et 15,1 min
 d) 11,7 min 14,1 min	d-) Chromatogramme du CIE des ions m/z 593 correspondants aux composés isomères 3 et 8, $[M-H]^-$, Tr=11,7 et 14,1 min
 e) 11,9 min	e-) Chromatogramme du CIE des ions m/z 549 correspondants au composé 4 , $[M-H]^-$, Tr=11,9 min
 f) 11,4 min 13,2 min 1,32	f-) Chromatogramme du CIE des ions m/z 447 correspondants au composé 5, $[M-H]^-$, Tr=13,2 min. Le signal observé à 11,4 min correspond aux ions fragments de m/z 593
 g) 13,3 min 14,0 min	g-) Chromatogramme du CIE des ions m/z 577 correspondants aux composés isomères 6 et 7, $[M-H]^-$, Tr=13,3 et 14,0 min



Spectres de masse CID et structures des composés identifiés

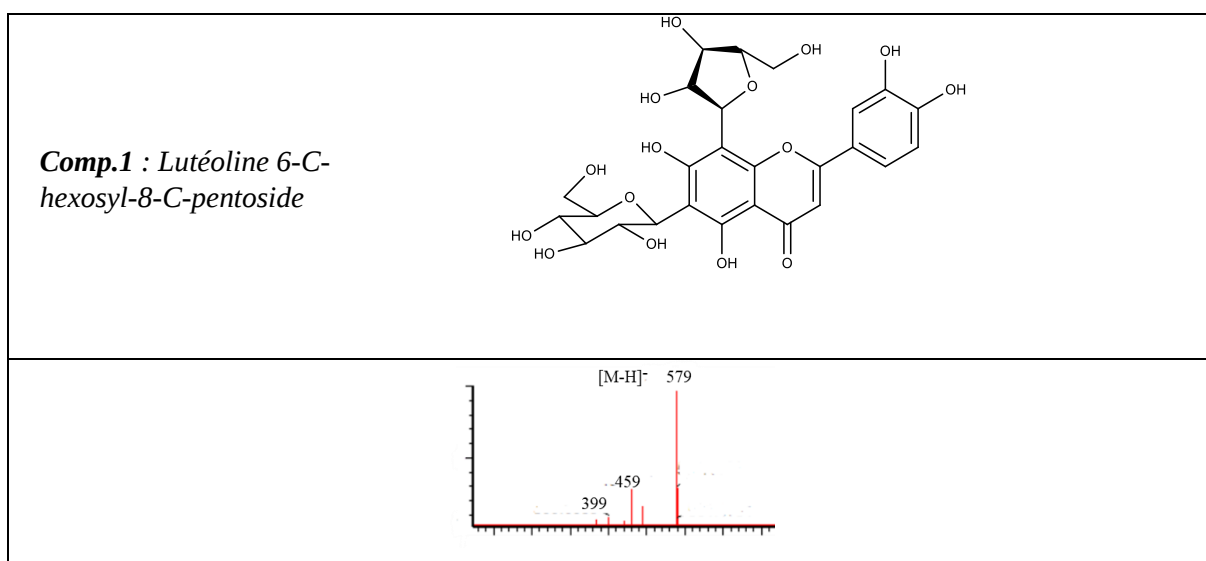


Figure 2. Structure et spectres CID du composé 1 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

Comp.2 . Apigénine 6-C-pentosyl-8-C-hexoside

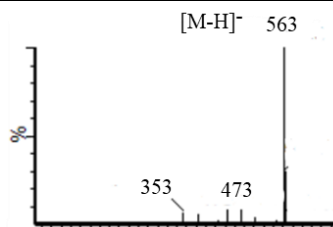
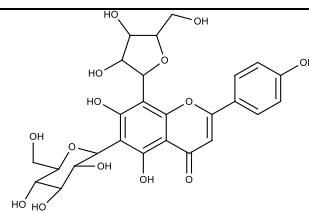


Figure 3. Structure et spectres CID du composé 2 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

Comp.3. Isoorientine
2''-O-rhamnoside

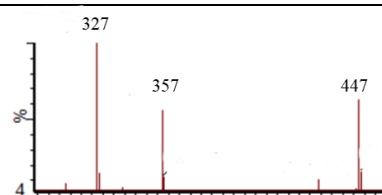
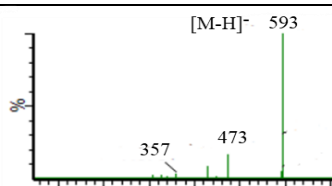
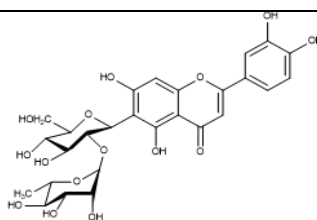
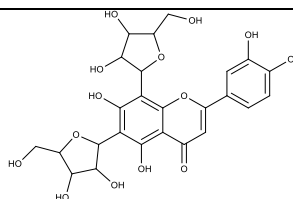


Figure 4. Structure et spectres CID du composé 3 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV et CE=45 eV)

Comp. 4. Lutéoline 6-C-pentosyl-8-C-pentoside



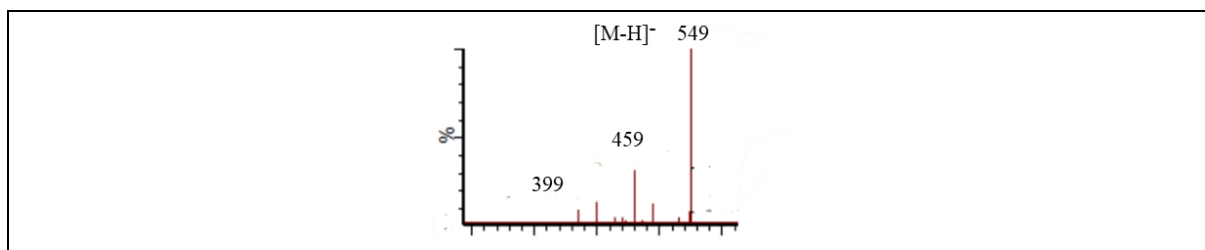


Figure 5. Structure et spectres CID du composé 4 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

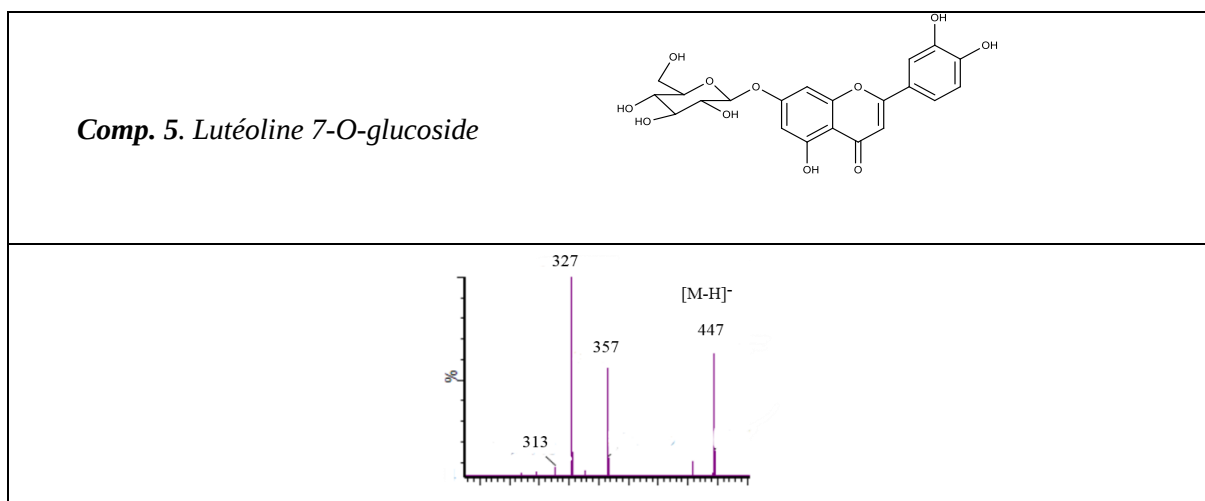


Figure 6. Structure et spectre CID du composé 5 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

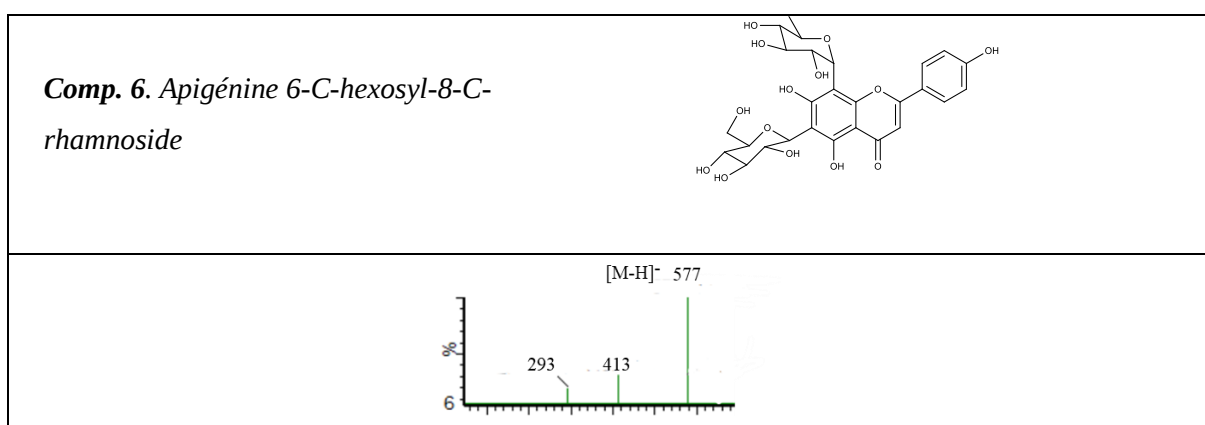
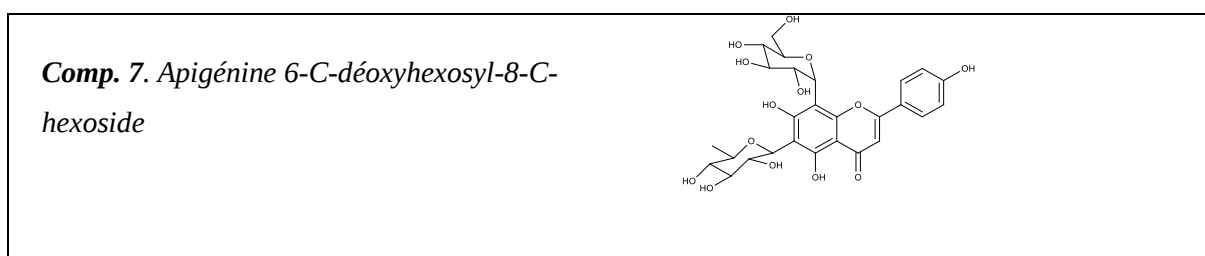


Figure 7. Structure et spectres CID du composé 6 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)



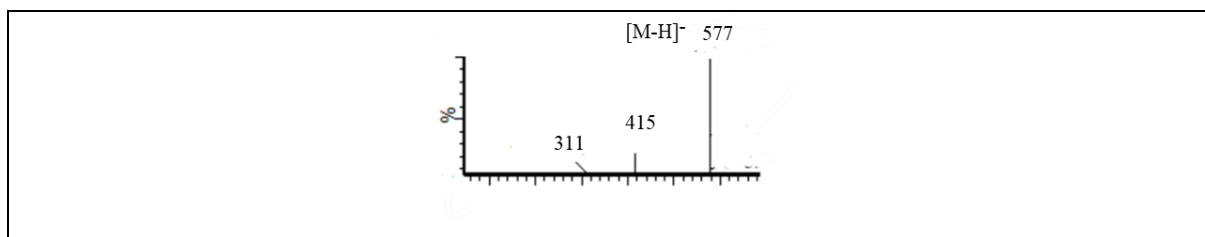


Figure 8. Structure et spectres CID du composé 7 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

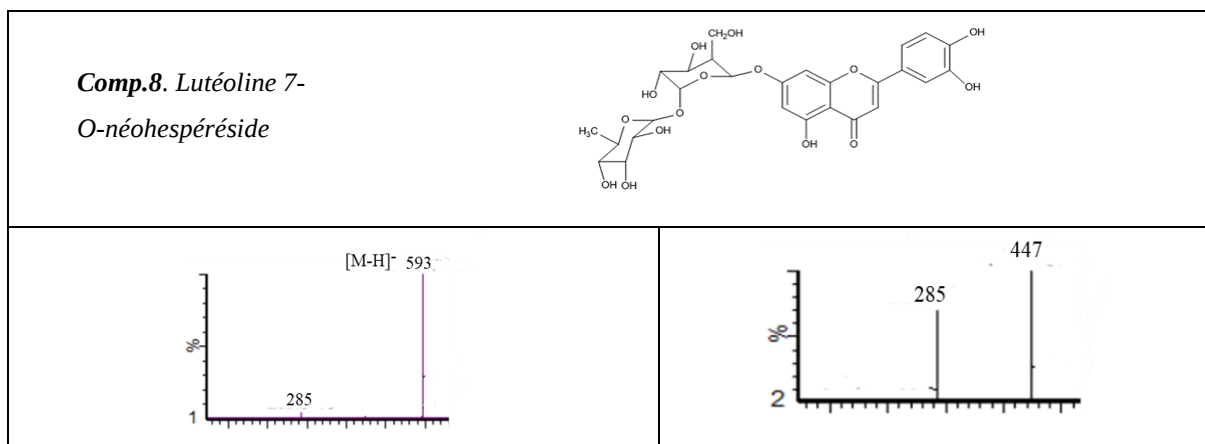


Figure 9. Structure et spectres CID du composé 8 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV et CE=45 eV)

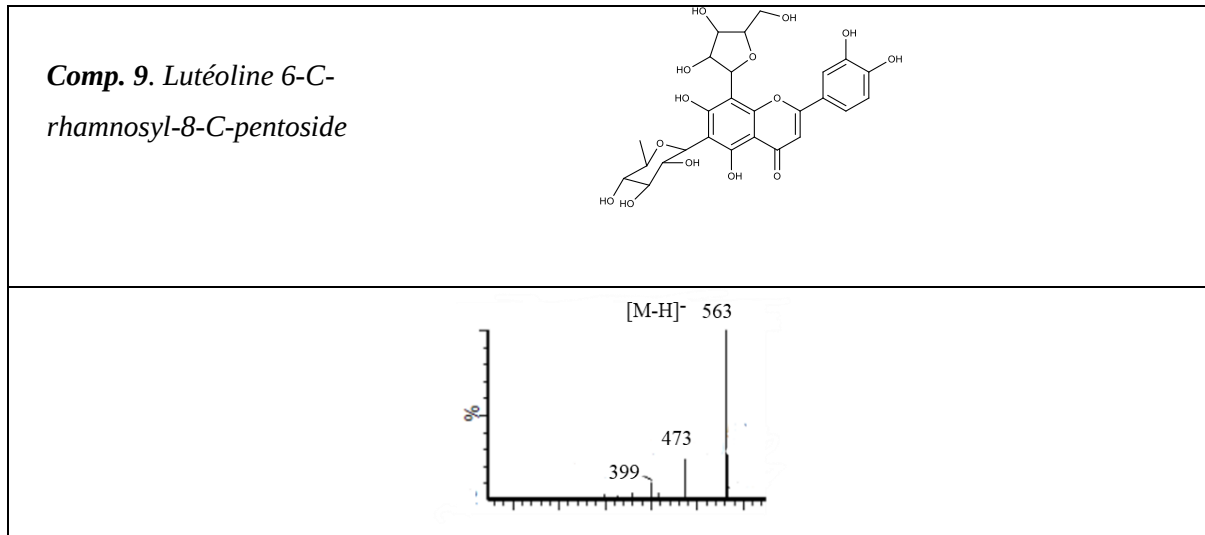


Figure 10. Structure du composé 9 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

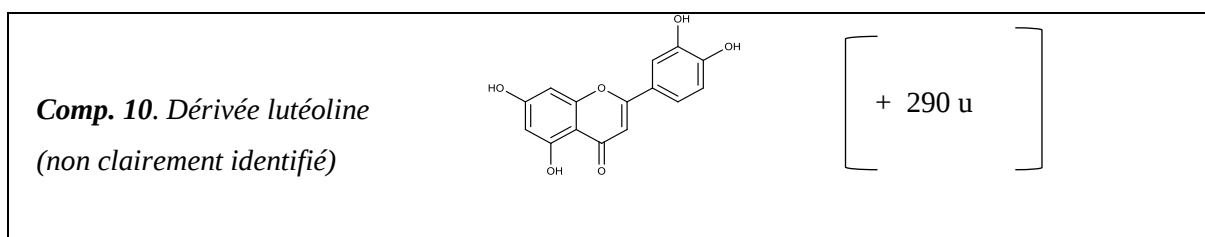


Figure 11. Structure du composé 10 (Waters Q-ToF API-US, ESI(-); CE=15 eV)

Annexe.3. Productions scientifiques

Communications orales :

[1] Bassalia Ouattara, Igor W. K. Ouédraogo et Pascal Gerbaux. Bio-intrants à base de plantes locales, développement pour le maraîchage (objectifs de la thèse, méthodologies et résultats préliminaires). 8^{ième} édition des doctoriales de l'Institut 2iE, décembre 2020, Ouagadougou, Burkina Faso.

[2] Bassalia Ouattara, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux, Yvonne Bonzi/Coulibaly. Extraction et analyse des composés phénoliques des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. 21^{ième} Journées Scientifiques de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM), août 2021 Niamey, Niger.

[3] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux, Yvonne Bonzi/Coulibaly. Optimisation de l'extraction des flavonoïdes des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. par méthodologie de surface de réponse (MSR), analyse LC-MSMS. 22^{ième} Journées Scientifiques de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM), août 2022, Ouagadougou, Burkina Faso

[4] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean C. W. Ouédraogo, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux et Yvonne Bonzi/Coulibaly. Composés phénoliques des feuilles de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. : optimisation de l'extraction, dosage spectrophotométrique et pouvoir réducteur du fer (FRAP) des extraits hydroéthanoliques. 2^{ième} édition du Colloque Internationale en Sciences et Technologies, novembre 2022, Koudougou, Burkina Faso.

[5] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux, Yvonne Bonzi/Coulibaly. Composés phénoliques des feuilles de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. : optimisation de l'extraction, dosage spectrophotométrique et pouvoir réducteur des ions ferrique (FRAP) des extraits hydro-éthanoliques. 10^{ième} édition des doctoriales de l'Institut 2iE, décembre 2022, Ouagadougou, Burkina Faso

[6]. Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean C. W. Ouédraogo, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux. Optimization of phenolic compounds extraction and flavonoids identification from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf leaf extracts by LC-MS analysis. Young Chemists Day University of Mons, May 2023, Mons , Belgium

[7] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean C. W. Ouédraogo, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux. Etude de la stabilité des flavonoïdes par analyse LC-MS des extraits des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. : perspectives de développement d'un biopesticide au profit du maraîchage. Doctoriales de l'Université Joseph KI-ZERBO, juillet 2023, Ouagadougou, Burkina Faso.

[8] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean C. W. Ouédraogo, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux. Analyse des composés phénoliques des extraits de feuilles de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : optimisation, identification et stabilité. 23^{ième} Journées Scientifiques Annuelles de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM), août 2023, Conakry, Guinée.

Poster :

[1] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean C. W. Ouédraogo, Igor W. K. Ouédraogo, Pascal Gerbaux et Yvonne Bonzi/Coulibaly. Analyse des composés phénoliques des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. au Burkina Faso. 3rd International Conference on Pesticidal Plants (ICPP3), July 2022, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Publication :

[1] Bassalia Ouattara, Irène Semay, Jean Claude W. Ouédraogo, Pascal Gerbaux and Igor W. K. Ouédraogo. Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Leaves Using Response Surface Methodology. <https://doi.org/10.1007/s42250-023-00821-1>

(Journal : Chemistry Africa, IF : 2,6)