

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mustapha STAMBOULI de
Mascara



جامعة مصطفى
اسطبولي
مسكرة

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

كلية العلوم الدقيقة

قسم الكيمياء

THESE de DOCTORAT ès SCIENCES

Spécialité : Chimie

Thème

*EXTRACTION ET IDENTIFICATION STRUCTURALE PAR
GC/MS ET LC/MS DES ANTIOXYDANTS NATURELS DE LA
FRAISE ET EVALUATION DE LEURS ACTIVITES
ANTIOXYDANTES.*

Présenté par : FREHA Mohammed

Le : 05 /12 / 2024

Membres du jury :

Président	GHARRES	Hammou	MCA	Université Mustapha Stambouli Mascara
Examineur	BOUHADDA	Youcef	Pr	Université Mustapha Stambouli Mascara
Examineur	BENREGUIEG	Mokhtar	Pr	Université de Saïda
Examineur	MAROUF	Reda	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	BELLIL	Ali	Pr	Université d'Oran
Co- encadreur	RAHO BACHIR	Ghalem	Pr	Université Mustapha Stambouli Mascara

Année Universitaire : 2024/2025

Table des matières

Remerciements	
Abréviations et symboles	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE FRAISIER ET LES FRAISES

1- Introduction.....	7
2- Généralités sur le fraisier.....	8
2.1- Description du fraisier.....	8
2.2- Classification botanique.....	9
2.3 – Taxonomie.....	9
2.4 – Morphologie.....	9
2.5 – Les différents types des fraisiers.....	10
2.5.1- Fraisier à petits fruits.....	10
2.5.2- Fraisier à gros fruits remontants.....	10
2.5.3- Fraisier à gros fruits non remontants.....	11
2.6 –Plantation des variétés remontantes et non remontantes.....	11
2.6.1- La récolte des variétés non remontantes.....	11
2.6.2- La récolte des variétés remontantes.....	11
2.7- Mise en place des fraisiers.....	12
2.8 –Exigences écologiques du fraisier.....	12
2.8.1- Exigences climatiques.....	12
2.8.2- Exigences édaphiques.....	13
2.9 – Entretien de fraisiers.....	13
2.10 – Choix du site pour la production des fraises.....	13
2.10.1- Qualité du Sol.....	14
2.10.2 – Pente et exposition.....	14
2.10.3 – Proximité du marché et de l’entrepôt.....	15
2.11- Systèmes culturaux des fraisiers.....	15
2.11.1- Système en rangs nattés.....	15
2.11.2 – Système avec paillis de plastique.....	16
2.11.3 – Système de production en serre.....	16
2.12 – Conditions d’entretien des systèmes de cultures des fraisiers.....	17
2.12.1- Irrigation.....	17
2.12.2- Fertilisation.....	17
2.12.3 – Influence du pH.....	17
2.12.4 – Apports en sels minéraux.....	18
3 – Généralités sur la fraise.....	19
3.1- Structure.....	19
3.2- Caractéristiques morphologiques de la fraise.....	20
3.3- Les variétés cultivées des fraises.....	21
3.4- Composition et valeur nutritionnelle de la fraise.....	23
3.5- Caractéristiques physiques et organoleptiques.....	25
3.6 - Répartition géographique et production des fraises.....	26
3.6.1- Production mondiale.....	26
3.6.2- Production nationale et sa répartition géographique.....	28
3.7- Parasites et maladies des fraises.....	29
3.7.1- Moisissure grise.....	29
3.7.2- Stèle rouge.....	29
3.7.3- Taches foliaires.....	29

3.7.4– Oïdium.....	29
5- Conclusion.....	29

CHAPITRE II : LES ANTIOXYDANTS NATURELS DANS LES FRUITS ET

LEGUMES ET STRESS OXYDANT

1-Introduction.....	30
2- présentation générale sur les polyphénols.....	30
2.1-Localisation des polyphénols.....	30
2.2-Classification des composés phénoliques.....	31
2.2.1-les acides phénoliques.....	32
2.2.1.1-les acides benzoïques.....	32
2.2.1.2-les acides cinnamiques.....	33
2.2.1.3-les coumarines.....	34
2.2.1.4– Les alcools phénoliques.....	34
2.2.2-les flavonoïdes.....	35
2.2.2.1-Structure des flavonoïdes.....	35
2.2.2.2-Les différentes classes des flavonoïdes.....	36
2.2.2.2.1-Flavones et flavonols.....	37
2.2.2.2.2– <i>Flavan-3ols</i>	38
2.2.2.2.3– <i>Flavanones et flavanonols</i>	39
2.2.2.2.4-Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols.....	40
2.2.2.2.5- Isoflavonoïdes.....	41
2.2.3– Propriétés des flavonoïdes.....	42
2.2.4– Biosynthèse des flavonoïdes.....	45
2.2.5– Les anthocyanes.....	45
2.2.5.1 Structure des anthocyanes.....	45
2.2.5.2– Localisation des anthocyanes.....	46
2.2.5.3 – Propriétés des anthocyanes.....	48
2.6–Les Tanins.....	48
2.6.1– localisation.....	48
2.6.2–classification des tanins.....	49
2.6.2.2 – Tanins condensées.....	49
2.6.3– Propriétés physico-chimiques des tannins.....	50
3 – Stress oxydant et espèces réactives oxygénés.....	52
3.1– Les radicaux libres.....	52
3.2 – Origine et régulation des espèces réactives de l’oxygène <i>in vivo</i>	56
3.3 – Les antioxydants.....	57
3.3.1– Pouvoir antioxydant des vitamines dans les aliments.....	58
3.3.1.1– Vitamine C.....	58
3.3.1.2. Vitamine E.....	59
3.3.1.3– Les caroténoïdes.....	59
3.3.1.4 – Pouvoir antioxydant des oligo-éléments dans les aliments.....	60
3.3.1.4.1–Le sélénium.....	60
3.3.1.4.2– Le cuivre.....	60
3.3.1.4.3 – Le zinc.....	60
4 - Pouvoir antioxydant des polyphénols dans les aliments.....	61
4.1.2 - Propriétés chimiques des polyphénols.....	62
4.1.2.1 - Nucléophilie et électrophilie.....	63
4.1.2.2 - Propriétés réductrices.....	65
4.1.2.3 - Liaison hydrogène.....	66
4.1.2.4 - Acidité.....	66
4.1.3 - Propriétés tannantes des polyphénols.....	67
4.1.4 - Propriétés de copigmentation.....	67
4.1.5 - Propriétés Complexantes.....	68
4.2 - Relations structures-activités des polyphénols.....	69
4.2.1 Comparaison de l’activité des différents pentahydroxyflavonoïdes.....	70
4.2.2 Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et de la double liaison C2-C3.....	71
4.2.3 Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B.....	71
4.2.4 L’effet de la glycosylation sur l’activité des flavones et flavanonols.....	72
4.2.5 Comparaison de l’activité des flavan-3-ols et des tannins condensés.....	74

4.2.6 Comparaison de l'activité des différents anthocyanidines.....	75
4.3 - Biodisponibilité des polyphénols.....	76
4.4 - Action et intérêt des polyphénols sur la santé.....	77
4.5 - Applications pratiques des polyphénols.....	80
4.5.1 - Applications des polyphénols en agro-alimentaires.....	80
4.5.2 - Applications des polyphénols en pharmacie.....	81
4.5.3 - Applications des polyphénols en industrie Chimique.....	81
4.6 - Bilan et perspectives des recherches effectuées sur les polyphénols.....	83
5 - Conclusion.....	84
CHAPITRE III : PROCEDES D'EXTRACTION DES ANTIOXYDANTS NATURELS	
1- Introduction.....	86
2- Extraction conventionnelle.....	86
2.1- Influence des paramètres opératoires sur l'extraction.....	88
2.1.1 - Nature du solvant d'extraction.....	89
2.1.2- Concentration du solvant.....	91
2.1.3 - L'acidification du solvant d'extraction.....	91
2.1.4 - Température et temps de l'extraction.....	91
2.1.5 - Nombre de cycles d'extraction.....	92
2.1.6 - L'agitation mécanique.....	92
2.2- procédures d'extractions.....	92
2.3 - Méthodes d'extraction.....	93
2.3.1- Extraction liquide-liquide.....	93
2.3.2- Extraction solide-liquide.....	93
3 - Méthodes d'extractions des composés bioactifs à partir des matrices végétales.....	93
3.1- Méthodes conventionnelles dites classiques.....	93
3.1.1- Extractions par hydrodistillation et ses variantes.....	94
3.1.2 - Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	95
3.1.3 - Extraction par expression à froid.....	96
3.1.4 - Macération	96
3.1.5 - Infusion.....	97
3.1.6 - Digestion.....	97
3.1.7- Décoction.....	97
3.1.8- Percolation.....	97
3.1.9- Extraction hydro-alcoolique par fermentation.....	97
3.1.10 - Extraction par solvants organiques.....	97
3.1.11 - Extraction à chaud en continu par Soxhlet.....	99
3.1.12- Extraction par chauffage à reflux.....	100
3.2- Les méthodes alternatives dites nouvelles.....	101
3.2.1 - Extraction assistée par ultra-sons.....	102
3.2.1.1 - Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore.....	102
3.2.2- Ultrasons en technologies d'extraction.....	104
3.2.2.1- Extraction des huiles essentielles et des arômes.....	104
3.2.2.2- Extraction des antioxydants contenus dans les fruits et légumes.....	105
3.2.3 - Extraction assistée par micro-ondes.....	107
3.2.4- Différentes techniques d'extraction par micro-ondes.....	108
3.2.4.1- L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD)	109
3.2.4.2- Solvant Free Extraction Microwave (SFME).....	110
3.2.5 - Extraction assistée par micro-ondes des antioxydants des végétaux.....	112
3.2.6 - L'extraction assistée par liquide pressurisé.....	114
3.2.7 - L'extraction par de l'eau subcritique.....	115
3.2.8 - Extraction au CO ₂ supercritique.....	115
3.2.9 - Extraction par Détente Eclair (Flash-Détente)	117
3.2.10 - Extraction par Détente Instantanée Contrôlée (DIC)	119
3.2.11 - Extraction par technique phytonique.....	121
4 - Procédés d'extraction des composés phénoliques.....	122
4.1 - Pré-traitement mécanique de la matière première.....	123
4.2 - Extraction des composés phénoliques par solvant (cas des flavonoïdes et des acides phénoliques)	124
4.2.1- Extraction et hydrolyse des Flavonoïdes.....	124
4.2.2 - Extraction et hydrolyse des acides phénoliques.....	129
4.3 - Intensification de l'extraction des composés phénoliques par méthode combinées.	130

5 – Conclusion.....	132
CHAPITRE IV : CARACTERISATION DES ANTIOXYDANTS NATURELS PAR LES METHODES SPECTROSCOPIQUES ET CHROMATOGRAPHIQUES ET MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.	
1- Introduction.....	135
2- Méthodes de caractérisations des antioxydants naturels.....	136
2.1- Méthodes spectrométriques.....	136
2.2 - Spectroscopie UV- visible.....	136
2.1.1 - Spectres U.V- Visible avec addition de réactifs.....	138
2.2.1 - Spectre UV- Visible en présence de $AlCl_3$ et $AlCl_3/H^+$	138
2.2.2 - Spectre UV- Visible en présence de MeONa.....	138
2.2.3- Spectre UV- Visible en présence de AcONa	
2.2.4 - Application de La spectroscopie UV-visible à la détection et l'identification des flavonols et des acides phénoliques.....	138
2.3- Spectrométrie infrarouge IR.....	139
2.3.1 - Région d'empreinte digitale.....	140
2.3.2 - Applications de la spectroscopie infrarouge.....	140
2.3.2.1 Détection des groupes fonctionnels.....	140
2.3.2.2 -Confirmation de l'identité des composés.....	140
2.3.2.3 - Suivi des réactions.....	141
2.4- Spectrométrie de résonance magnétique Nucléaire RMN.....	141
2.4.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	141
2.4.1.1 - RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)	141
2.4.1.2 - RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)	142
2.4.1.2.1– Corrélations homonucléaires.....	142
2.4.1.2. 2 - Corrélations hétéronucléaires.....	142
2.5- Spectrométrie de masse.....	143
2.5.1– Méthodes d'ionisation.....	143
2.5.1.1 - Ions moléculaires et fragments par impact électronique.....	143
2.5.1.2– Spectre de masse et pic de base.....	144
2.5.1.3– Reconnaissance de l'ion moléculaire (parent), pic et détection des isotopes.....	144
2.6 - Application de la spectroscopie de masse.....	144
2.7- Identification des métabolites secondaires par les ions parents issus de la fragmentation par spectrométrie de masse.....	145
3 - Techniques chromatographiques.....	147
3.1– Chromatographie sur couche mince (TLC)	148
3.2– Chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC)	148
3.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	157
3.3.1 - Principe de la méthode	157
3.3.2 - Instrumentation de séparation physique (HPLC)	157
3.3.2 -Composition d'un HPLC	157
3.3.2.1 -Réservoirs de phases mobiles.....	157
3.3.2.2 -Systèmes de pompage	157
3.3.2.3 –Injecteurs	158
3.3.2.4 -Vanne à boucle	158
3.3.2.5 –Colonnes.....	159
3.3.2.5.1 - Phase stationnaire normale.....	159
3.3.2.5.2-Phase inverse	159
3.3.2.5.3 -Phase mobile.....	159
3.3.2.6 –DéTECTEURS.....	160
3.3.2.6.1 -DéTECTEURS d'absorption dans UV-visible.....	160
3.3.2.6.2 -DéTECTEURS d'absorption dans l'infrarouge.....	161
3.3.2.6.3 -DéTECTEURS de fluorescence.....	161
3.3.2.6.4 -DéTECTEURS réfractométriques.....	161
3.3.2.6.5 -DéTECTEURS électrochimiques.....	161
3.3.2.6.6 -DéTECTEURS par spectrométrie de masse.....	161
3.3.2.7 -Intégrateur-enregistreur.....	161
3.3.2.8 –Chromatogramme.....	162
3.4 –Informations requises de la chromatographie.....	162
3.4.1 –Temps de rétention (t_R)	163

3.4.2 –Facteurderétention(k)	163
3.4.3 –Efficacitédelacolonne(Nombre de plateaux(N)	164
3.4.4 –La résolution.....	165
3.5 – Application de la technique.....	165
3.6 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	167
3.6.1. Application de la CPG.....	167
3.7 Autres techniques	168
3.7.1. Couplage d’une technique chromatographique avec une technique spectroscopique	168
3.8. Mesure de l’activité antioxydante.....	170
3.8.1. Différentes méthodes de mesure de l’activité antioxydante.....	170
3.8.2. Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d’électron (SET)	172
3.8.2.1. Méthode TEAC (Troloxequivalentantioxydantcapacity)	172
3.8.2.2. Méthode utilisant Le radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	174
3.8.2.3. La méthode FRAP (FerrieReducingAntioxidant Power)	176
3.8.2.4 Folin-Ciocalteu.....	177
3.8.2.5. Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT)	178
3.8.2.5.1 La méthode ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)	178
3.8.2.5.2. TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)	180
3.8.3. Autres méthodes	181
3.8.3.1. Méthodes mettant en jeu la formation de produits au cours de l'oxydation	181
3.8.3.2–Méthode utilisant l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric acid reactive substances TBA-RS)	181
3.8.3.3. Méthodes d'oxydation accélérée.....	182
3.8.3.4. La méthode AOM (Active Oxygen Method)	183
3.8.3.5. La méthode du four de Schaal (Schaal oven test)	184
3.8.3.6. La méthode faisant intervenir l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la calorimétrie différentielle (DSC)	184
3.8.3.7. Méthode utilisant La résonance paramagnétique électronique (RPE)	185
3.9. Outil nécessaire pour l'estimation de l’activité antioxydante globale.....	185
4. Conclusion.....	188

PARTIE EXPERIMENTALE

I – MATERIEL ET METHODES

1^{ERE} PARTIE : SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA FRAISE

1. Matériel végétal.....	190
2. Screening phytochimique.....	190
2.1. Les flavonoïdes.....	191
2.2. Les tanins.....	191
2.3. Les saponines.....	191
2.4. Les quinones libres.....	191
2.6. Les alcaloïdes.....	191
2.7. Les oses et holosides.....	192
2.8. Les huiles essentielles.....	192
2.9. Composés réducteurs.....	192
2.10 Les anthocyanes.....	192
3. Analyses physicochimiques.....	192
3.1. Détermination de la teneur en eau (Taux d’humidité)	192
3.2. Potentiel d’Hydrogène (pH)	194
3.3 Acidité titrable.....	194
3.4. Cendres totaux.....	194
3.5. Teneur en sucres totaux.....	194
3.6. Teneur en sucres réducteurs.....	195

**2^{EME} PARTIE : ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE EN ANTIOXYDANTS
NATURELS POLYPHENOLIQUES CHEZ LA FRAISE ET EVALUATIONS DE LEURS
ACTIVITES ANTIOXYDANTES.**

1 - Matériel végétal.....	196
2 - Equipements et matériel utilisé.....	196
3 - Produits chimiques.....	196
4 - Objectif de l'étude.....	197
5 - Description des Méthodes utilisées.....	197
- Extraction par macération.....	197
- Préparation des extraits de fraise par macération.....	199
.1- Préparation de l'extrait méthanol-eau.....	199
5.2.2 - Préparation de l'extrait éthanol-eau.....	199
5.2.3. Préparation de l'extrait acétone-eau.....	200
5.2.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle – eau.....	200
Calcul des rendements des extraits bruts des fraises.....	200
Choix de la méthode d'extraction.....	201
Choix des solvants.....	203
Préparation des extraits.....	203
Extraction par chauffage à reflux.....	203
6.1.1. Préparation de l'extrait méthanol–eau (ME)	203
6.1.2. Préparation de l'extrait éthanol–eau- (EE)	204
6.1.3. Préparation de l'extrait acétone–eau (AE)	204
6.1.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle–eau (ACE)	204
6.2. Extraction par Soxhlet.....	204
6.2.1. Préparation de l'extrait méthanol–eau- (ME)	204
6.2.2. Préparation de l'extrait éthanol–eau- (EE)	205
6.2.3. Préparation de l'extrait acétone–eau- (AE)	205
6.2.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle–eau- (ACE)	206
6.3. Extraction assistée par ultrasons (Sonication)	206
6.3.1. Préparation de l'extrait méthanol–eau- (ME)	207
6.3.2. Préparation de l'extrait éthanol–eau- (EE)	207
6.3.3. Préparation de l'extrait acétone–eau- (AE)	208
6.3.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle –eau- (ACE)	208
Calcul des rendements des extraits bruts des fraises.....	208
Dosage des composés phénoliques.....	209
Dosage des polyphénols totaux.....	209
Dosage des flavonoïdes.....	210
8.3. Dosage des tannins.....	210
8.3.1 Dosage des tannins hydrolysables.....	210
8.3.2. Dosage des tannins condensés.....	211
9 – Evaluation de l'activité antioxydante.....	212
9.1 – Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de la fraise.....	212
9.1.1 – Méthode utilisant le réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	212
9.1.2 – Calcul des pourcentages d'inhibition.....	213
9.1.3 – Calcul des concentrations inhibitrices (IC50)	213
9.1.4 – Les dilutions de l'extrait au cours de l'étude de l'activité antioxydante.....	214
9.1.5 – Evaluation de l'activité antioxydante.....	215
9.1.6 – Dilution de la vitamine C au cours de l'évaluation de l'activité antioxydante.....	216
9.1.7 – Evaluation de l'activité antioxydante de la vitamine C.....	217
9.2 – Evaluation de l'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer (FRAP)	218
9.2.1 – Méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP) dans la chair des fraises.....	218
9.2.2 –Méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP) dans les différents extraits de fraise	218

3^{EME} PARTIE : DOSAGE DE LA CATECHINE ET DE LA VITAMINE C PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE ET IDENTIFICATION DES MINERAUX PAR X-RAY-FLUORESCENCE (XRF) DANS LA FRAISE

1.Objectif.....	219
2.Méthode d'analyse et préparation des solutions.....	219
2.1.Méthode d'analyse par spectrophotométrie d'absorption UV– Vis.....	219
2.2.Préparation de la solution de référence.....	219
3.Dosage des antioxydants naturels (Catéchine et Vitamine C)	220
3.1.Dosage de la Catéchine.....	220
3.2. Dosage de la vitamine C.....	221
3.2.1.Dosage de la vitamine C dans la chair de fraise.....	221
3.2.2. Dosage de la vitamine C dans les différents extraits de fraise.....	222
4.Dosage des minéraux contenus dans la fraise par X-Ray-Fluorescence (XRF)	222
4.1. Les produits chimiques utilisés.....	222
4.2. Préparation de la pastille.....	222

4^{EME} PARTIE : IDENTIFICATION DES ANTIOXYDANTS NATURELS DE LA FRAISE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (C.C.M) ET PAR HPLC/MS

1. Essai d'identification des antioxydants naturels dans les extraits de fraise par chromatographie sur couche mince C.C.M.....	225
2. Essai d'identification des antioxydants naturels dans les extraits de fraise par HPLC-MS.....	226
2.1 – Echantillonnage analysé par LC-MS.....	226

5^{EME} PARTIE : ETUDE DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'EMBALLAGE SUR LES TENEURS EN ANTIOXYDANTS NATURELS DE LA FRAISE (POLYPHENOLS TOTAUX, FLAVONOÏDES, TANNINS, ANTHOCYANES ET VIT C).

1-Objectif de l'étude	229
2-Lieu et période d'étude	229
3- Matériel et méthodes	229
3.1-Conditions expérimentales	229
3.2-Matière végétale	229
3.3- Le stockage	230
3.4- L'emballage	230
3.5-Produits chimiques utilisés	230
3.6-Analyses quantitatives	230
3.6.1-Dosages Dosage des antioxydants naturels de la fraise	230
3.6.1.1-Analyse des polyphénols	231
3.6.1.1.1-Extraction des polyphénols	231
3.6.1.1.2-Dosage des polyphénols par Folin Ciocalteu	232
3.6.1.1.3 Extraction et dosage des flavonoïdes	232
3.6.1.1.3.1 Extraction des flavonoïdes	233
3.6.1.1.3.2 Dosage des flavonoïdes	234
3.6.1.1.4 Extraction et dosage des tannins	235
3.6.1.1.4.1 Extraction des tanins	235
3.6.1.1.4.2 Dosage des tannins.....	235
3.6.1.1.4.2.1 Dosage des tannins hydrolysables	235
3.6.1.1.4.2.2 Dosage des tannins condensés.....	236
3.6.1.4-Dosage des anthocyanes.....	237
3.6.1.4.1-Extraction des anthocyanes.....	237
3.6.1.5 Dosage de la vitamine C	239
3.6.1.5.1 Dosage colorimétrique de la vitamine C par DCPIP	239
3.6.1.5.2 Etalonnage de la solution de 2,6-DCPIP par préparation d'une solution de vitamine C	239
3.6.1.5.3 Dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique par DCPIP.....	241

II – RESULTATS ET DISCUSSIONS

1^{ERE} PARTIE : SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICOCHEMISTIQUES DE LA FRAISE

1. Analyse phytochimique	244
1.1. Résultats du screening phytochimique.....	244
1.2. Paramètres physicochimiques	248
1.2.1. Détermination du taux d'humidité	248
1.2.2 Détermination du pH : Potentiel d'hydrogène	249
1.2.3. Détermination de l'acidité titrable	250
1.2.4. Détermination des teneurs en cendres	251
1.2.5. Teneur en sucres totaux et en sucres réducteurs	251

2^{EME} PARTIE : ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES ET EVALUATIONS DE LEURS ACTIVITES ANTIOXYDANTES.

1. Extraction des composés phénoliques des fraises	253
1.2. Extraction conventionnelle par macération (ECM)	253
1.2.1. Recherche du meilleur solvant d'extraction.....	254
1.2.2. Rendements d'extraction par macération des différents extraits	255
1.2.2.1. Extraction par méthanol/eau.....	256
1.2.2.2. Extraction par éthanol/eau	257
1.2.2.3. Extraction par Acétone/eau.....	257
1.2.2.4. Extraction par Acétate d'éthyle-eau.....	259
1.2.3. Recherche de la meilleure méthode d'extraction	260
1.2.3.1 Extraction par sonication	262
1.2.3.2 Extraction par Soxhlet	263
1.2.3.3 Extraction par reflux.....	263
1.2.3.4 Les rendements des extraits bruts des fraises	263
1.2.4. Choix du meilleur solvant d'extraction sur le rendement et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes	263
2. Dosage des polyphénols totaux	268
3. Dosage des flavonoïdes	270
4. Effet de la méthode d'extraction sur les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes	272
5. Dosage des tannins	275
5.1. Dosage des tannins hydrolysables	275
5.2. Dosage des tannins condensés	276
6 – Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de fraise	277
6.1 – Détermination de l'activité antioxydante par le radical DPPH	277
6.1.1 – Calcul de la concentration inhibitrice IC50.....	277
6.2 – Détermination de l'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer (FRAP)	282
6.2.1 – Détermination de l'activité antioxydante dans la chair de fraise.....	284
6.2.2 – Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits de fraise	285
7 – Conclusion	287

3^{EME} PARTIE : DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE DE LA CATECHINE ET DE LA VITAMINE C ET DE COMPOSES FLAVONOÏQUES ET IDENTIFICATION DES MINERAUX PAR XRF

1 - Analyse et caractérisations de la solution référence (Catéchine-méthanol)	289
1.1 - Analyse spectrale de la solution référence	291
1.2 – Caractérisation à des très faibles concentrations	291
1.3 – Caractérisation à des concentrations élevées	292
1.4 – Analyse spectrale de l'extrait de fraise.....	295
1.5 – Comparaison spectrale entre l'extrait de fraise et la solution catéchine.....	296
2 – Dosage de la vitamine C par spectroscopie UV-Visible	298
2.1 – Dosage de l'acide ascorbique standard	211

2.3–Dosage de Vit C dans les extraits bruts de fraise par différents solvants.....	299
2.4–Identification de quelques composés polyphénoliques dans les extraits bruts de fraise	302
2.4.1–Identification de quelques composés polyphénoliques dans l'extrait AcOEt de fraise	303
2.4.2–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait éthanolique de fraise	307
2.4.3–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait méthanolique de fraise	307
2.4.4–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait acétonique de fraise	309
2.5. Identification des minéraux par XRF	310
3–Conclusion	311

4^{EME} PARTIE : IDENTIFICATION DES ANTIOXYDANTS NATURELS POLYPHENOLIQUES PAR CCM et HPLC/MS DE LA FRAISE.

1–Essai d'identification des antioxydants polyphénoliques par Chromatographie sur couche mince CCM.....	313
2–Identification des composés flavonoïques des fraises	321
2.1–Identification des composés flavonoïques des fraises avant hydrolyse	321
2.2–Identification par C.C.M des composés flavonoïques des fraises après hydrolyse.....	322
3 – Analyse par HPLC/MS des extraits bruts de fraise.	
3.1 – Analyse par couplage instrumentale : LC-MS.....	325
3.2 – Echantillonnage analysé par LC-MS.....	326
4 – Interprétation et comparaison de l'analyse LC-MS	326
4.1 – Exemple d'identification par SM de la catéchine	329
4.1.1 – Détermination de la masse molaire de la molécule.....	331
4.1.2 – Détermination de la formule brute de la molécule.....	331
4.1.2.1 – Existence des atomes spécifiques.....	331
4.1.2.2 – Existence de l'atome d'azote(N)	331
4.1.2.3 – Estimation du nombre d'atomes de carbone(C)	331
4.1.2.4 – Existence des atomes d'oxygène(O)	332
4.1.2.5 – Estimation du nombre d'atome d'hydrogène.....	333
4.1.3 – Détermination de la structure de la molécule.....	334
5 – Conclusion.....	334

5^{EME} PARTIE : EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'EMBALLAGE SUR LES TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX, FLAVONOIDES, TANNINS, ANTHOCYANES ET VIT C DE LA FRAISE.

1-Aspect des fraises au cours du stockage	336
2-Analyses quantitatives	337
2.1–Dosage des Polyphénols totaux	337
2.1.1–Résultats du dosage des polyphénols totaux	337
2.1.2–Discussion des résultats du dosage des polyphénols totaux	338
2.2–Dosage des flavonoïdes	339
2.2.1–Résultats du dosage des flavonoïdes	339
2.2.2–Discussion des résultats du dosage des flavonoïdes	340
2.3–Dosage des tannins	341
2.3.1–Dosage des tannins condensés	341
2.3.1.1–Résultats du dosage des tannins condensés	341
2.3.2–Dosage des tannins hydrolysables	342
2.3.2.1–Résultats du dosage des tannins hydrolysables	342
2.3.3–Discussion des résultats du dosage des tanins	344
2.4–Dosages des anthocyanes	345
2.4.1–Résultats des dosages des anthocyanes	345
2.4.2- Discussion des résultats du dosage des anthocyanes	346
2.5–Dosage de la vitamine C par spectrophotométrie (UV)	347
2.5.1–Résultats du dosage de la vitamine C par spectrophotométrie (UV)	347
2.5.2–Discussion des résultats du dosage de la vitamine C	348
3–Conclusion.....	349
CONCLUSION GENERALE.....	350
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	354
RESUMES.....	382
ANNEXES.....	384

Liste des figures

Figure 1 : Description du fraisier.....	8
Figure 2: Morphologie du fraisier.....	10
Figure 3: Calendrier de culture de fraise.....	11
Figure 4 : La bonne plantation de fraisiers.....	12
Figure 5 : Plantation de fraisiers sur billon.....	13
Figure 6 : Structure externe de la fraise.....	19
Figure 7 : Morphologie de la fraise.....	19
Figure 8 : Détail de la surface de la fraise.....	19
Figure 9: Morphologie interne de la fraise.....	19
Figure 10 : Les producteurs de la fraise les plus connus au monde.....	24
Figure 11: Augmentation de la production de la fraise dans le monde.....	24
Figure 12 : Répartition de la culture de la fraise en Algérie.....	24
Figure 13 : Production nationale de la fraise.....	25
Figure 14 : Acides phénoliques (squelette benzoïque(I) et cinnamique(II))	32
Figure 15 : Structures chimiques de quelques coumarines.....	34
Figure 16 : Structures de l'hydroxytyrosol(a) et du tyrosol (b)	34
Figure 17 : Structures de l'hydroxytyrosol(a) et du tyrosol (b)	35
Figure 18 : Squelette de base des flavonoïdes.....	36
Figure 19 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes.....	37
Figure 20 : Structure des Flavones et flavonols.....	38
Figure 21 : Structures chimiques de flavonols.....	38
Figure 22 : Structures chimiques de certains flavan-3-ols.....	39
Figure 23 : Structure chimique des flavanones et falvonols.....	40
Figure 24 : Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.....	40
Figure 25 : Structure d'un squelette de base des isoflavones.....	41
Figure 26 : Structure de quelques isoflavonoïdes.....	41
Figure 27 : Piégeage des ERO (R ⁻) par les flavonoïdes.....	42
Figure 28 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	43
Figure 29 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	44
Figure 30 : Structure de base commune des anthocyanes.....	46
Figure 31 : Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes.....	46
Figure 32 : Les différentes formes des anthocyanes selon le pH.....	47
Figure 34 : Structure chimique d'un tanin condensé.....	50
Figure 35 : Vue globale du stress oxydant.....	51
Figure 36 : Déséquilibre de la balance entre radicaux libres et antioxydants.....	52
Figure 37 : Sources des différentes espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie.....	53
Figure 38 : Intermédiaires réduits de l'oxygène.....	56
Figure 39 : Stabilisation du radical phénolique.....	62
Figure 40 : Formes mésomères du phénol.....	62
Figure 41 : Sites nucléophiles sur les noyaux résorcinol et phloroglucinol et extrapolation sur la molécule de catéchine.....	63
Figure 42 : Formes mésomères d'une <i>o</i> -quinone.....	64
Figure 43 : Formation d'une structure de type biaryle par couplage oxydatif entre une <i>o</i> -quinone et un noyau phloroglucinol.....	64
Figure 44 : Oxydation mono-électronique d'un phénol et et stabilisation du radical aryloxyl formé par ses formes mésomères.....	65
Figure 45 : Complexation métallique des flavonoïdes.....	68
Figure 46 : Comparaison de l'activité antioxydante des différents pentahydroxyflavonoïdes.....	70
Figure 47 : Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3.....	71
Figure 48 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol sur le cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.....	72
Figure 49 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.....	72
Figure 50: Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones.....	73

Figure 51 : Activité antioxydante de la catéchine et de la catéchine gallate.....	74
Figure 52 : Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidines.....	75
Figure 53 : Les sites essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	76
Figure 54 : Site d'action des nutriment antioxydants et des enzymes anti oxydantes	78
Figure 55 : Schéma des trois étapes élémentaires de la diffusion solide/liquide dans une matrice végétale.....	87
Figure 56 : Schéma du montage de l'hydrodistillation.....	94
Figure 57 : Schéma du montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.....	95
Figure 58 : Schéma des différents types de montage pour l'extraction par solvants volatils	98
Figure 59 : Schéma du montage pour l'extraction par soxhlet.....	100
Figure 60 : Montage d'un système de chauffage à reflux.....	101
Figure 61 : Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence.....	102
Figure 62 : Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique.....	103
Figure 63 : Principe de chauffage par microondes.....	108
Figure64: Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE et MAP.....	109
Figure 65 : Schéma du montage d'extraction selon le principe VMHD.....	110
Figure 66 : Schéma d'extraction selon le principe SFME.....	111
Figure 67 : Principe d'une extraction par CO ₂ supercritique.....	116
Figure 68 : Schéma de l'extraction par Flash-Détente.....	118
Figure 69 : Schéma de l'extraction par DIC.....	120
Figure 70 : Représentation schématique du procédé industriel d'extraction de composés végétaux.....	123
Figure 71 : Les méthodes d'analyses d'un mélange complexe.....	135
Figure 72 : Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	137
Figure 73: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones.....	145
Figure 74: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavanones.....	146
Figure 75: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavonols.....	146
Figure76: Fragmentation d'un flavonol exemple de la quercétine.....	146
Figure 77 : Nomenclature simplifiée des voies de fragmentation des flavonoïdes en mode positif et négatif.....	147
Figure 78 : Transformation de l'ABTS en ABTS ⁺ par oxydo-réduction et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•.....	157
Figure 79 : Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	158
Figure 80 : Diphénylpicrylhydrazyl, radical libre et forme réduite.....	159
Figure 81 : Passage du complexe Fe ³⁺ —TPTZ de la forme ferrique à la forme ferreuxFe ²⁺ —TPTZ au cours de la méthode FRAP.....	161
Figure 82 : Génération de radicaux peroxydes à partir de l'AAPH.....	162
Figure 83 : Exemple de courbes cinétiques de dégradation des protéines R-phycoérythrine et P-phycoérythrine (RP)	163
Figure 84 : Répartition de la culture de la fraise en Algérie.....	175
Figure 85 : photographie des fraises utilisées.....	175
Figure 86 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux en utilisant le glucose.....	180
Figure 87 : Courbe étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs en utilisant le glucose.....	180
Figure 88 : dispositif d'extraction solide – liquide par simple macération.....	184
Figure 89 : Les étapes de l'extraction des composés polyphénoliques contenus dans les fraises.....	187
Figure 90 : Extraction sous reflux des extraits de fraise.....	188
Figure 91 : évaporation à sec au rotavapor des extraits de fraise.....	188
Figure 92 : Extraction par Soxhlet des extraits de la fraise.....	190
Figure 93 : Montage de dispositif de l'extraction par sonication.....	191
Figure 94 : Etapes d'extraction par sonication des antioxydants naturels de la fraise.....	192
Figure 95 : Changement de couleur du radical libre DPPH lors de la réalisation de l'activité anti-radicalaire.....	197
Figure 96 : Diagramme des dilutions de l'extrait lors de la réalisation l'activité antioxydante.....	199
Figure 97 : diagramme de l'activité antioxydante des extraits de fraise.....	200
Figure 98: diagramme de la dilution de vitamine C.....	201
Figure 99: diagramme de l'évaluation de l'activité antioxydante de la vitamine C.....	202
Figure 100 : Spectrophotomètre d'absorption UV-Visible.....	204
Figure 101: La gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	207
Figure 102: Schéma du dispositif de compression.....	208
Figure 103: pastille obtenue après compression.....	208

Figure 104 : Schéma du spectrophotomètre X-Ray-Fluorescence.....	208
Figure 105 : Perle jaune (échantillon d'étalonnage spécial MCA)	209
Figure 106 : Organigramme de l'extraction des polyphénols totaux dans la fraise	231
Figure 107 : Organigramme du dosage des polyphénols totaux dans la fraise.....	232
Figure 108 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	233
Figure 109 : Protocole d'extraction des flavonoïdes dans la fraise.....	233
Figure 110 : Protocole du dosage des flavonoïdes dans la fraise.....	234
Figure 111 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	234
Figure 112: Organigramme du protocole d'extraction des tannins.....	235
Figure 113: Organigramme du protocole de dosage des tanins hydrolysables.....	235
Figure 114 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins hydrolysables.....	236
Figure 115: Organigramme du protocole de dosage des tannins condensés.....	236
Figure 116 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins condensés.....	237
Figure 118: Courbe d'étalonnage de la cyanidine 3-O-glucoside pour le dosage des anthocyanes totaux	238
Figure 119 : Changement de la couleur lors du dosage de la vitamine C par DCPIP.....	240
Figure 120: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.....	241
Figure 121 : Organigramme du dosage de la vitamine C dans la fraise.....	242
Figure 122 : Résultats de screening phytochimique des Anthocyanes, Antraquinones.....	245
Figure 123 : Résultats du screening phytochimique des Coumarines.....	245
Figure 124 : Résultats de screening phytochimique des Alcaloïdes.....	246
Figure 125 : Résultats de screening phytochimique des holosides, quinones et saponines.....	246
Figure 126: Résultats de screening phytochimique des tannins, flavonoïdes et terpénoïdes.....	246
Figure 127 : Taux d'humidité des échantillons de fraise.....	249
Figure 128 : mesure du pH des échantillons de fraise.....	249
Figure 129: l'acidité titrable de l'échantillon de fraise.....	250
Figure 130: Teneurs en cendres des échantillons de fraise.....	251
Figure 131 : Teneurs en sucres totaux et réducteurs de notre échantillon de fraise.....	252
Figure 132 : Optimisation du rapport solvant/eau.....	254
Figure 133: Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Méthanol/Eau	256
Figure 134: Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Ethanol/Eau.....	257
Figure 135 : Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Acétone/Eau.....	258
Figure 136 : Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant AcOEt/Eau.....	259
Figure 137 : Résultats des rendements des extraits à concentration 80% de la fraise.....	260
Figure 138 : Schéma du protocole d'extraction des antioxydants naturels de la fraise par trois techniques d'extractions.....	262
Figure 139 : Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir de fraise par différents modes d'extraction.....	265
Figure 140 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	268
Figure 141 : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.....	269
Figure 142: courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	270
Figure 143: Teneurs en flavonoïdes (µg EQ/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.....	270
Figure 144 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des tannins hydrolysables	275
Figure 145 : Teneurs en tannins hydrolysables (µg EAG/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.....	275
Figure 146 : courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tannins condensés.....	276
Figure 147: Teneurs en tannins condensés (µg EC/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.....	276
Figure 148 : Déroulement de l'activité antioxydante par la méthode DPPH.....	277
Figure 149 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanolique à reflux.....	278
Figure 150 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanolique à reflux.....	278
Figure 151 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétonique à reflux.....	278
Figure 152 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétate d'éthyle reflux.....	278

Figure 153 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanoliquesoxhlet.....	278
Figure 154 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanoliquesoxhlet.....	278
Figure 155 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétoniquesoxhlet.....	279
Figure 156 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydro-acétate d'éthyle soxhlet.....	279
Figure 157: Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanolique sonication.....	279
Figure 158: Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanolique sonication.....	279
Figure 159 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétonique sonication.....	279
Figure 160 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétate d'éthyle sonication.....	280
Figure 161 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'activité anti oxydante DPPH.....	280
Figure 162 : Pourcentage d'inhibition de DPPH dans le cas l'acide ascorbique.....	282
Figure 163 : Histogramme de la concentration inhibitrice IC ₅₀ des extrais de fraises et de Vitamine C.....	282
Figure 164: La capacité de réduction du fer pour la chair de fraise et pour l'acide ascorbique	284
Figure 165: La capacité de réduction du fer par les différents extraits.....	285
Figure 166 : les valeurs de la IC ₅₀ des différents extraits de fraise et acide ascorbique.....	286
Figure 167 : Spectres d'absorption optique du catéchine dissout dans le méthanol.....	289
Figure 168 : Absorbance en fonction de la concentration de la solution catéchine-méthanol à très faibles concentrations.....	292
Figure 169 : Absorbance relative en fonction de la longueur d'onde de la solution catéchine-méthanol à très des concentrations importantes.....	293
Figure 170 : Spectres d'absorption optique de l'extrait de fraise préparé à plusieurs dilutions.....	295
Figure 171 : Présentation linéaire du coefficient d'extinction en fonction de la longueur d'onde du pic le plus sensible de la solution référence et l'extrait de fraise.....	298
Figure 172: Spectre d'absorption UV-visible de l'acide ascorbique standard.....	300
Figure 173 : Spectre d'absorption UV-visible de la vitamine C extraite de la chair de fraise.....	300
Figure 174 : les formes oxydées de l'acide ascorbique.....	301
Figure 175: schéma de la molécule d'acide ascorbique et de sa forme acyclique.....	302
Figure 176 : Spectre de superposition de la vitamine C dans les différents extraits bruts de fraise.....	302
Figure 177: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique avec spectrophotométrie UV.....	303
Figure 178 : spectres UV-vis (220-400 nm) des acides phénoliques standards.....	304
Figure 179 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait ACOEt de fraise.....	305
Figure 180 : Spectres UV de l'acide p-hydroxybenzoïque.....	305
Figure 181 : Spectre UV-vis de l'acide syringique.....	306
Figure 182 : Spectre UV de l'acide shikimique.....	306
Figure 183 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de fraise.....	307
Figure 184 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait méthanolique de fraise.....	308
Figure 185 : Spectres UV de la catéchine.....	308
Figure 186 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait acétonique de fraise.....	309
Figure 187 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 1.....	313
Figure 188 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 2.....	314
Figure 189: Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 3.....	315
Figure 190 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 4.....	316
Figure 191 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 5.....	317
Figure 192 :Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 6.....	318
Figure 193: C.C.M de l'extrait brut des fraises avant l'hydrolyse par le système 7.....	321
Figure 194 : C.C.M de l'extrait brut des fraises avant l'hydrolyse par le système 8.....	321
Figure 195: C.C.M de l'extrait brut des fraises après hydrolyse par le système 7.....	322
Figure 196: C.C.M de l'extrait brut des fraises après hydrolyse par le système 8.....	322
Figure 197 : Chromatogramme de l'extrait de fraise (1) obtenue par LC-MS à balayage d'ondes optiques.....	327
Figure 198 : Chromatogramme de l'extrait de fraise (2) obtenue par LC-MS à balayage d'ondes optiques.....	327
Figure 199 : Spectrogramme de la catéchine séparée par LC-MS.....	330
Figure 200 :Structurechimiquedelamoléculeidentifiée (catéchine)	334
Figure 201 : variation du taux de polyphénols totaux des fraises stockées à température ambiante et à la réfrigération.....	337
Figure 202 : variation du taux de polyphénols totaux des fraises stockées à (-15°C)	337
Figure 203: variation des teneurs en flavonoïdes (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)	339
Figure 204 : Variation des teneurs en flavonoïdes (mg/ml) des fraises stockées à (-20° C).....	340

Figure 205 : variation des teneurs en tanins condensés (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)	341
Figure 206 : Variation des teneurs en tanins condensées (mg/ml) des fraises stockées à (-20°C)	342
Figure 208 : Variation des teneurs en tannins hydrolysables (mg/ml) des fraises stockées à (-20°C).....	342
Figure 209 : variation du taux des anthocyanes des fraises stockées à température ambiante et à la réfrigération.....	345
Figure 210 : variation du taux des anthocyanes des fraises stockées à (-15°C)	345
Figure 211 :Variation des teneurs en vitamine C (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)	347
Figure 212: Variation des teneurs en vitamine C (mg/ml) des fraises stockées à (-20° C)	348

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différentes variétés cultivées des fraises.....	21
Tableau 2 : La composition chimique de la fraise.....	22
Tableau 3: Les différentes maladies et parasites de la fraise.....	27
Tableau 4 : Principales classes des composés phénoliques.....	31
Tableau 5 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.....	33
Tableau 6 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.....	33
Tableau 7 : Les principaux anthocyanidines des végétaux.....	47
Tableau 8 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	54
Tableau 9 : Activités biologiques des polyphénols.....	79
Tableau 10 : Applications potentielles des extraits phénoliques issus du marc de raisin.....	82
Tableau 11 : Processus élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal.....	88
Tableau 12 : Solvants d'extraction appropriés en fonction du type de polyphénols à extraire.....	89
Tableau 13 : Extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes....	90
Tableau 14 : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes.....	105
Tableau 15 : Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants.....	106
Tableau 16 : Traitements alternatifs pour l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques à partir de la biomasse viticole.....	131
Tableau 17 : Les méthodes les plus employées pour mesurer l'activité antioxydante des composés phénoliques in vitro.....	156
Tableau 18 : Quelques études de mesure de l'activité antioxydante d'une variété d'échantillons.....	171
Tableau 19 : Produits chimiques et réactifs utilisés.....	182
Tableau 20 : Les solvants utilisés pour l'extraction par macération à différents rapports.....	183
Tableau 21 : Description de l'appareil de sonication.....	191
Tableau 22 : les différents systèmes d'éluion utilisés pour la CCM.....	211
Tableau 23 : Les résultats de screening phytochimique.....	244
Tableau 24 : solvants utilisés à différents rapports lors de l'extraction par macératio.....	255
Tableau 25 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par le méthanol/eau.....	256
Tableau 26 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'éthanol/eau.....	257
Tableau 27: rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'acétone/eau.....	258
Tableau 28 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'acétate d'éthyle /eau.....	259
Tableau 29 : La masse des extraits bruts (extraction par chauffage à reflux)	263
Tableau 30 : La masse des extraits bruts (extraction par soxhlet)	264
Tableau 31 : La masse des extraits bruts (extraction par sonication)	264
Tableau 32 : Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir de fraise par différents modes d'extraction	265
Tableau 33 : Variation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes de la chair de fraise (<i>fragariavesca</i>)	273
Tableau 34 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction à reflux.....	281
Tableau 35 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction par soxhlet.....	281
Tableau 36 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction par sonication.....	281
Tableau 37 : Variation des IC50 des différents extraits de fraises et de Vit C.....	283
Tableau 38 : Caractérisation du pic le plus sensible du spectre d'absorption de la catéchine dissout dans le méthanol.....	285
Tableau 39 : Paramètres de la méthode développée.....	290
Tableau 40 : détermination des teneurs en éléments majeurs, en oligo-éléments et en métaux lourds dans la fraise.....	299
Tableau 41 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 1.....	310
Tableau 42 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 2	314
Tableau 43 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 3.....	315
Tableau 44 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 4.....	316

Tableau 45 : Résultats des R _f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 5.....	317
Tableau 46 : Résultats des R _f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 6.....	318
Tableau 46 : Résultats des R _f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 7.....	320
Tableau 48 : Caractérisation de certains composés de l'extrait de fraise	320
Tableau 49 : Masses et abondances des fragments détectés par LC-MS de la catéchine	330
Tableau 50 : Masses molaireset abondances dela molécule.....	331
Tableau 51 : Liste des abondances de quelques atomes chimiques	332
Tableau 52 : Variation de l'aspect extérieur des fraises avec le temps selon les différents modes de stockage.....	336

Remerciements

Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail de thèse ; puis je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur BELLIL Ali, pour m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance et permis de réaliser mon travail de doctorat dans son laboratoire "Laboratoire de Génie des Procédés et Chimie des Solutions (LGPCS), Faculté des Sciences et Technologie de Mascara. Je lui exprime particulièrement toute ma gratitude, pour ses qualités pédagogiques, les discussions scientifiques et pertinentes, et surtout pour le précieux soutien moral et les encouragements pendant les périodes difficiles.

C'est dans son laboratoire "Laboratoire de Génie des Procédés et Chimie des Solutions que j'ai eu l'opportunité de réaliser la plus grande partie de ma thèse. Cela fut une expérience très enrichissante qui m'a donné la possibilité de me former en phytochimie avec des appareils modernes, et sophistiqués en m'ouvrant les portes du monde de la phytochimie en réalisant des tests chimiques et biologiques très importants. Aussi, je lui exprime mon immense reconnaissance pour sa confiance en me laissant un grand degré de liberté dans mes recherches tout en étant attentif et généreux en bons conseils.

Je souhaite également remercier mon co-encadreur, Monsieur le Professeur RAHOU BACHIR Ghalem d'avoir accepté de participer à cet encadrement.

Je remercie Monsieur GHARRES Hammou maître de conférences de La faculté des sciences exactes de Mascara, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence de ce jury. C'est à la fois un privilège et un honneur qu'il me fait de siéger dans ce jury

Je remercie Monsieur le Professeur BOUHADDA Youcef de La faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV) de Mascara, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail de thèse et de participer à ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements aux Professeurs MAROUF Réda et BEREGUIEG Mokhtar qui m'ont fait l'honneur en prenant part au jury de thèse, et de consacrer le temps de lire et d'évaluer mon travail.

Mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude à ma grande famille et à la mémoire de mes parents, comme j'aurai aimé que vous soyez présents aux premiers rangs lors de ma soutenance. Que leurs âmes reposent en paix. Un grand amour va à ma petite famille ma femme et mon fils, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, pour l'affection, le soutien moral et les encouragements tout au long de mes études et durant la réalisation de cette thèse.

Enfin, une pensée pour tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de ces années, je les remercie et je remercie toute l'équipe du laboratoire de LGPCS ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Liste des abréviations et symboles

(CH₃)₂CO : Acétone
AcOEt : Acétate d'éthyle
AcOH : Acide acétique
C-18 : Diméthyl octadécyl silane (phase inverse)
CC : Chromatographie liquide sur colonne ouverte
CCM : Chromatographie sur couche mince
CD₃OD : Méthanol deutéré
CDCl₃ : Chloroforme deutéré
(CD₃)₂CO : Acétone deutérée
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CHCl₃ : Chloroforme
CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%
COSY : *Correlation Spectroscopy*
CPC : Chromatographie de partage centrifuge
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
d : Doublet
DAD : *Diode Array Detector*
DEPT : *Distortionless Enhanced Polarization Transfer*
dH : Déplacement chimique du proton
dC : Déplacement chimique du carbone
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
EI : *Electronic impact*
ESI : *Electrospray Ionization*
EtOH : *Ethanol*
FID : Détecteur à ionisation de flamme
GC : *Gaz Chromatography*
HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HPLC : *High performance liquid chromatography*
HRMS : *High resolution mass spectrometry*
HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
Hz : Hertz
²J : Constante de couplage entre atomes séparés par 2 liaisons
³J : Constante de couplage entre atomes séparés par 3 liaisons
⁴J : Constante de couplage entre atomes séparés par 4 liaisons
m : Multiplet
[M-H]⁺ : Molécule déprotonée
MeOH : Méthanol
MPLC : Chromatographie liquide à moyenne pression
MS_n : Spectrométrie de masse en n étapes

m/z : Masse/charge électrique
NH₄OH : Ammoniaque
NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
 λ : Longueur d'onde
ppm : Partie par million
q : Quadruplet
RDA : Retro-Diels-Alder
RI : *Retention index*
RMN : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
RPMI : *Roswell Park Memorial Institut*
s : Singulet
sh. : Epaulement
sp. : Espèce
ssp. : Sous-espèce
t : Triplet
TOCSY : *TOTAL Correlation Spectroscopy*
TOF : *Time of Flight*
tr : temps de rétention
UPLC : *Ultra Performance Liquid Chromatography*
UV : Ultraviolet

Résumés

ملخص :

الفراولة هي مصادر جيدة لمضادات الأكسدة، وخاصة المركبات الفينولية التي تتمتع بقوة كبيرة مضادة للأكسدة. وهذا هو الشيء الذي يقودنا إلى القول أن الفراولة يمكن أن تساعد في الوقاية من أمراض القلب والأوعية الدموية والسرطانات والمشاكل المرتبطة بالشيخوخة الناجمة عن الإجهاد التأكسدي.

بالإضافة إلى ذلك، وجد أن الفراولة غنية بالمركبات الفينولية بشكل رئيسي إجمالي البوليفينول. في الواقع، أظهرت التحليلات الكمية لمستخلصاتنا نتائج مهمة بالنسبة لجرعة الفلافونويد والعفص. أظهرت قوة مضادات الأكسدة في مستخلصاتنا أن قيم IC_{50} مرتفعة مقارنة بتلك الموجودة في فيتامين C.

كانت التقنية الكروماتوغرافية المقترنة بمطياف الكتلة كافية للتعرف على بعض المواد مثل مضادات الأكسدة والأجسام الكيميائية الأخرى المذكورة في الجزء التجريبي.

خلال هذه الأطروحة، تمت ملاحظة تأثير المذيب وطريقة الاستخلاص على محتويات مضادات الأكسدة الطبيعية وكذلك على المركبات الفينولية وتقييم نشاطها المضاد للأكسدة في الفراولة، وهي فاكهة تزرع على نطاق واسع في الجزائر. كنا مهتمين أيضاً بالاستخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية، والذي يشكل مثلاً على الكيمياء الخضراء. تتيح هذه التقنية، المستخدمة حالياً حصرياً في المختبر، الحصول بطريقة بسيطة وسريعة على مستخلص بتركيبية كيميائية تفوق تلك التي يتم الحصول عليها بالطرق التقليدية.

كما تم تقييم دراسة أنشطة مضادات الأكسدة (DPPH) و (FRAP) خلال هذا العمل.

الكلمات المفتاحية : الفراولة، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة

Abstract :

Strawberries are good sources of antioxidants, mainly phenolic compounds with significant antioxidant power. This is the thing that leads us to say that strawberries can help prevent cardiovascular diseases, cancers and aging-related problems caused by oxidative stress. Additionally, strawberry was found to be rich in phenolic compounds mainly total polyphenols. Indeed, the quantitative analyzes of our extracts showed significant results for the dosage of flavonoids and tannins. The antioxidant power of our extracts showed that the IC_{50} values are high compared to those found for vitamin C.

The chromatographic technique coupled with mass spectrometry was satisfactory for the identification of certain substances such as antioxidants and other chemical bodies mentioned in the experimental part.

During this thesis, the influence of the solvent and the extraction method was observed on the contents of natural antioxidants as well as on phenolic compounds and the evaluation of their antioxidant activity in strawberries, a fruit widely cultivated in Algeria. We were also interested in ultrasound-assisted extraction, which constitutes an example of green chemistry.

This technique, nowadays exclusively used in the laboratory, makes it possible to obtain in a simple and rapid manner an extract with a chemical composition superior to that obtained by conventional methods. The study of antioxidant activities (DPPH and FRAP) were also evaluated during this work.

Key words: Strawberries, phenolic compounds, antioxidant capacity, UV-Visible spectroscopy, LC-MS

Résumé :

Les fraises sont de bonnes sources d'antioxydants principalement les composés phénoliques possédant un pouvoir antioxydant important. C'est la chose qui nous amène à dire que les fraises peuvent contribuer à prévenir les maladies cardiovasculaires, les cancers et les problèmes liés au vieillissement causés par le stress oxydant.

De plus, la fraise s'est avérée riche en composés phénoliques principalement les polyphénols totaux. En effet les analyses quantitatives de nos extraits ont montré des résultats importants pour le dosage des flavonoïdes et les tannins. Le pouvoir antioxydant de nos extraits a montré que les valeurs des IC50 sont élevées par rapport à celles trouvées pour la vitamine C.

La technique chromatographique couplée à la spectrométrie de masse était satisfaisante pour l'identification de certaines substances comme les antioxydants et d'autres composés chimiques cités dans la partie expérimentale.

Durant cette thèse, l'influence du solvant et de la méthode d'extraction a été observée sur les teneurs en antioxydants naturels ainsi que sur les composés phénoliques et l'évaluation de leur activité antioxydante dans la fraise, un fruit largement cultivé en Algérie.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'extraction assistée par ultrasons qui constitue un exemple de chimie verte. Cette technique, de nos jours exclusivement utilisée en laboratoire permet d'obtenir de manière simple et rapide un extrait présentant une composition chimique supérieure à celle obtenue par les méthodes conventionnelles.

L'étude des activités antioxydantes (test DPPH et FRAP) ont été aussi évaluées au cours de ce travail.

Mots clés : Fraises, composés polyphénoliques, activité antioxydante, spectroscopie UV-Visible, LC-MS.

Introduction

générale

Introduction générale

La fraise est l'un des fruits les plus consommés à travers le monde car c'est une excellente source d'antioxydants naturels. De plus, ses qualités organoleptiques reconnues vont de pair avec sa fragilité qui en fait également l'un des fruits les plus difficiles à manipuler **(Vicente et al, 2002)**. Les changements biochimiques qui se produisent pendant le murissement des fruits concernent l'accumulation des pigments de flavonoïdes, la production des composés volatils et l'accumulation du sucre, etc..., résultent en des changements importants affectant sa qualité **(Manning et al, 1998 ; Aharoni et al, 2000)**. De ce fait la cueillette, le transport, et aussi le stockage des fruits engendrent des pertes importantes de la qualité des fraises après récolte.

Des recherches dans le domaine de la nutrition se concentrent désormais sur l'étude des aliments pour leur potentiel protecteur, préventif et retardateur de maladies chroniques **(Nicoli et al, 1999)**. En effet les fraises sont une bonne source d'antioxydants naturels tels que vitamine C, polyphénols, et sont parmi les fruits, qui ont une bonne capacité antioxydante et se révèlent être avantageux pour les consommateurs, car ils ont des valeurs alimentaires importantes **(Beatriz R et al, 2004)**.

Les dommages oxydatifs provoqués par le stress oxydant sont impliqués dans le cancer, les maladies cardiovasculaires et d'autres maladies dégénératives. La peroxydation lipidique induite par les radicaux libres a été proposée pour être impliquée de manière critique dans plusieurs états pathologiques dont le cancer **(Kesic et al, 2009)**.

Au cours de ces dernières années, un nombre croissants de rapports confirment que beaucoup de fruits et légumes peuvent offrir une protection contre certaines maladies chroniques causées par le stress oxydatif **(Sun et al, 2009)**, et une attention considérable a été portée aux propriétés antioxydantes des végétaux qui peuvent être utilisés pour la consommation humaine.

Les antioxydants naturels en particulier les composés phénoliques présents dans les fruits et légumes suscitent un intérêt considérable dans le domaine de l'alimentaire, de la chimie et de la médecine en raison de leur potentiel antioxydant promoteur **(Kalia et al, 2008)**. Les éventuels avantages de la consommation des polyphénols pour la santé ont été suggérés de dériver de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires **(Queen et Tollefsbol, 2010)**, anti-cancérigènes **(Liu et Castonguay, 1991)**. La raison de ces activités est le fort caractère antioxydant des polyphénols, qui est basée sur leur capacité à inhiber les radicaux libres **(Nawaz et al, 2006)**.

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes comme les polyphénols les vitamines et les caroténoïdes. Ce sont des substances très répandues dans le règne végétal, faisant partie intégrante de notre nourriture journalière. Elles ont été décrites comme ayant un grand nombre de propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancérigènes. En 2002 **Netzel et ses collaborateurs** ont montré que l'ingestion de jus a entraîné une augmentation significative (30%) de la capacité antioxydante plasmatique après 2 heures.

Récemment, la santé occupe comme jamais au paravent une place privilégiée et un rang important. Dans un monde où les effets préjudiciables de la préparation industrielle des aliments, de l'emploi excessif des conservateurs et des additifs alimentaires sont de plus en plus manifestes, les fruits et les légumes apparaissent désormais comme les symboles d'un mode de vie plus naturel et plus sain.

Dans cette étude, on s'intéresse aux antioxydants naturels polyphénoliques contenus dans les fraises car ils sont considérés comme substances phytochimiques ayant des effets prébiotiques, antioxydants, et anti-inflammatoires. Leur toxicité est faible et sont considérés comme non toxiques. De plus, ils sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux.

La fraise devrait être récoltée à pleine maturité pour une qualité maximum par rapport à la saveur et à la couleur. Les principaux changements de la composition de ce fruit qui sont habituellement associés à la maturation, ont lieu quand le fruit est encore attaché à la plante mère. Ceci signifie qu'il y a une période très courte où le fruit est à sa meilleure qualité. Par conséquent les fraises devraient être récoltées prêtes pour la consommation (**Bretch et al, 2003**).

A part les dégâts mécaniques, une cause de la détérioration de la fraise après la récolte est la croissance et le développement des moisissures. Puisque, il est interdit l'utilisation des fongicides après récolte, les basses température et les atmosphères modifiées sont les méthodes les plus utilisées pour éviter au moins, particulièrement, la croissance des moisissures et la sénescence rapide du fruit et prolonge de ce fait leur durée de conservation (**Manning et al, 1996**).

Dans le passé récent, la saveur, la forme et l'aspect étaient les attributs les plus importants des fruits et des légumes frais mais de nos jours les consommateurs se préoccupent davantage par la sûreté et la valeur nutritive de la nourriture. Les qualités principales liées à la qualité du fruit sont la texture, la saveur et la couleur. Les changements de la texture sont une

conséquence du processus normal de sénescence et également de l'atmosphère dans la quelle les fruits sont stockés. (Ife Fitz. J, 2003)

Néanmoins, le retard entre la récolte et le stockage à des températures appropriées est très critique pour le succès du traitement. Des auteurs ont observé que les fruits stockées à des bases températures, 6 heurs après la récolte, montraient des changements indésirables de la couleur et de la texture et également une réduction d'environ 50% de la teneur en eau par rapport à ceux qui ont été immédiatement refroidies après récolte. (Nunes et al, 1995).

A notre connaissance et selon une étude bibliographique exhaustive que nous avons entreprise, peu de travaux ont été effectués sur les fraises. Dans la littérature, on trouve quelques études portant sur la comparaison des méthodes d'extraction mais celles-ci restent partielles et souvent limitées. De nombreuses études ont été menées pour l'optimisation des techniques d'extraction dans le but de chercher une augmentation du rendement d'extraction des composés polyphénoliques mais sans tenir compte de l'évolution de leurs activités antioxydantes. Une étude tenant en compte l'efficacité de l'extraction et la préservation des activités des composés polyphénoliques devrait permettre une valorisation optimale du contenu phénolique des fraises.

Dans cette étude, nous avons essayé dans un premier temps, d'étudier l'effet des solvants sur la teneur en antioxydants naturels d'un fruit très répandu en Algérie «la fraise : *Fragaria vesca* » en adoptant des méthodes d'extraction conventionnelles dites classiques telles que la macération, le reflux, et le soxhlet et non conventionnelles telle que la sonication et d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques contenus dans les fraises en utilisant différentes méthodes. Dans un deuxième temps nous avons essayé de faire une identification des antioxydants naturels contenus dans la fraise en utilisant des méthodes spectroscopiques (UV-visible) et chromatographiques (GC/MS et LC/MS) en effet, La mise au point de méthodes de criblages chimiques et biologiques contribue a l'obtention de composes actifs a partir d'extraits. Les techniques combinées HPLC/MS permettent une approche directe afin de déterminer la nature des antioxydants naturels sans les isoler des extraits. Par la suite, nous avons essayé de doser certains minéraux et oligoéléments tels que (Na , K, P , Cu , Fe, Se etc) en adoptant une méthode quantitative facile à mettre en œuvre, économique et peu onéreuse telle que la X-R-fluorescence.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'appliquer les techniques chromatographiques et spectroscopiques dans l'identification des antioxydants naturels contenus dans les fraises. Il se subdivise en quatre objectifs spécifiques qui sont :

- L'optimisation de la méthode extractive des antioxydants naturels contenus dans les fraises soumises à l'étude dans le but de maximiser leurs rendements d'extraction ;
- Evaluation des activités antioxydante des extraits des fraises par différentes méthodes (DPPH et FRAP).
- L'influence des conditions de stockage (température et emballage) sur les taux des antioxydants naturels des fraises.
- L'identification des antioxydants naturels contenus dans nos échantillons de fraise à l'aide des techniques spectroscopiques (UV-vis) et chromatographiques (HPLC-MS), et dosage des minéraux et oligoéléments par XRF.

La première partie de notre étude est consacrée à la bibliographie, elle se subdivise en quatre chapitres détaillés comme suit :

Le premier chapitre commence par donner un aperçu général sur les fraises et le fraisier.

Dans le deuxième chapitre, nous rappelons les propriétés biologiques et chimiques des antioxydants naturels dans les fruits et les légumes, leurs applications et aussi leurs intérêts dans différents domaines et leur incidence sur la santé. Nous évoquerons aussi dans ce chapitre le phénomène du stress oxydatif, et l'implication pathologique des radicaux libres et leurs effets néfastes sur la santé.

Le troisième chapitre portera sur la présentation de quelques procédés d'extraction des antioxydants naturels et les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.

Enfin un dernier chapitre est consacré à l'étude des différentes méthodes d'identification des antioxydants naturels poly phénoliques dans les fruits et les légumes.

La partie expérimentale est traitée dans la seconde partie de notre travail, et qui se scinde en deux axes : dans le premier axe, nous présentons le matériel et les méthodologies utilisées pour réaliser les screening phytochimique, les différentes méthodes d'extraction et de quantification des antioxydants naturels (polyphénols totaux, flavonoïdes, anthocyanes, tannins et vit C). Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressées à détailler les méthodes d'évaluation des activités antioxydantes et la détermination de quelques minéraux contenus dans nos extraits des fraise par X-Ray-fluorescence.

La troisième partie expose les résultats obtenus concernant les rendements, les teneurs des composés phénoliques, le potentiel antioxydant des différents extraits de nos échantillons de

fraises, l'identification des antioxydants naturels contenus dans nos échantillons de fraise à l'aide des techniques spectroscopiques et chromatographiques, suivis de leur discussion.

Enfin et pour clôturer cette étude, une conclusion générale suivi de recommandations et de perspectives résumant l'ensemble de nos résultats expérimentaux seront exprimées pour achever cette étude.

Chapitre I

Généralités sur le fraisier et les fraises

1– Introduction

Plusieurs espèces du genre *Fragaria* existent dans le monde entier. Toutes donnent des faux-fruit charnus appelés "fraises". Presque toutes les espèces ont fait l'objet de cueillette par les populations locales, mais toutes ne sont pas alimentaires au même degré. Répandus dans tout l'hémisphère nord, les fruits de l'espèce *Fragaria vesca*, le Fraisier des bois, sont de petite taille, mais particulièrement parfumés. L'espèce commence à être cultivée en France vers le XIV^e siècle puis sa culture se répand en Europe. **(Darrow, G.M., 1966).**

Une espèce américaine *Fragaria chiloensis*, le Fraisier du Chili est particulièrement remarquable par la grosseur de ses fruits. Une forme à fruits blancs, subsp. *chiloensis* f. *chiloensis* était déjà cultivée par les Amérindiens précolombiens **(Mackee, H. S. 1994).**

En termes de production des fruits et selon la base des données statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, la fraise est parmi les cultures les plus importantes au monde, avec une production globale de 4,1 millions de tonnes. Sur la base de ce chiffre, les fraises apparaîtraient clairement comme l'une des baies les plus consommées en Algérie, avec une production continue estimée jusqu'à 100.000 quintaux en 2015 (FAO, 2013). En outre, les fraises sont économiquement et commercialement importantes et largement consommées à l'état frais ou sous d'autres formes (jus, concentré de confiture, gelée et séché réhydraté avec du yogourt) **(Allane et Benamara, 2010).**

Les fraises font partie des baies les plus étudiées en agronomie, en génomique et en nutrition, c'est pour cela des recherches dans le domaine de la nutrition se sont concentrées sur l'étude des aliments pour leur potentiel protecteur, préventif et retardateur de maladies qui peuvent être graves pour l'organisme humain et parmi ces aliments qui englobent toutes ces particularités très intéressantes est la fraise **(Hannum, S.M., 2004 et Tulipani, S., 2009).** Donc quelle est l'origine de sa culture ? Comment on peut la planter et quelles sont ces compositions chimiques et ces caractéristiques organoleptiques qui la rendent trop demandée par les consommateurs et très bénéfique pour la santé? Par le biais de ce premier chapitre on essaiera de répondre à ces questions.

2– Généralités sur le fraisier

Les fraises poussaient dès la plus haute antiquité à l'état sauvage en Amérique et en Asie ainsi que dans les zones Sub-alpines d'Europe occidentale. Nos ancêtres connaissaient et utilisaient les fraises des bois, mais ne les cultivaient pas.

La culture de la fraise n'a véritablement commencé qu'autour de l'an 1300 où les Européens transplantaient des fraisiers des bois dans leurs jardins, L'histoire n'est pas unanime sur le sujet, car certains disent que ce serait Jacques Cartier qui aurait été le premier à rapporter *Fragaria virginiana* en Europe, Cependant, d'autres témoignent que ce serait Francis Drake qui aurait rapporté des fraisiers des colonies de Virginie jusqu'en Angleterre en premier. Les fraisiers sauvages ou cultivés appartiennent tous au genre *Fragaria* de la famille des Rosacées (**Darrow, 1966**). Depuis l'obtention des fraisiers à gros fruits, *Fragaria X ananassa*, les améliorateurs génétiques travaillent à faire des croisements entre les différentes variétés afin d'en obtenir les critères désirés.

Ils existent actuellement environ 600 variétés différentes de fraisiers et ils varient entre eux selon plusieurs critères dont la taille, la texture, la saveur, la couleur, la résistance aux maladies, la période de production, le niveau en éléments nutritifs... etc. (**Albin. M., 1999**).

2.1– Description du fraisier

Le fraisier (*Fragaria x ananassa*) appartient à la famille des Rosaceae. Il est cultivé dans presque tous les pays du monde (**Mishra, 2014**). C'est un des fruits nutritifs les plus populaires parmi les baies et non-climactérique de la consommation humaine fréquente (**Brilouet.J.M, et al., 2013**).

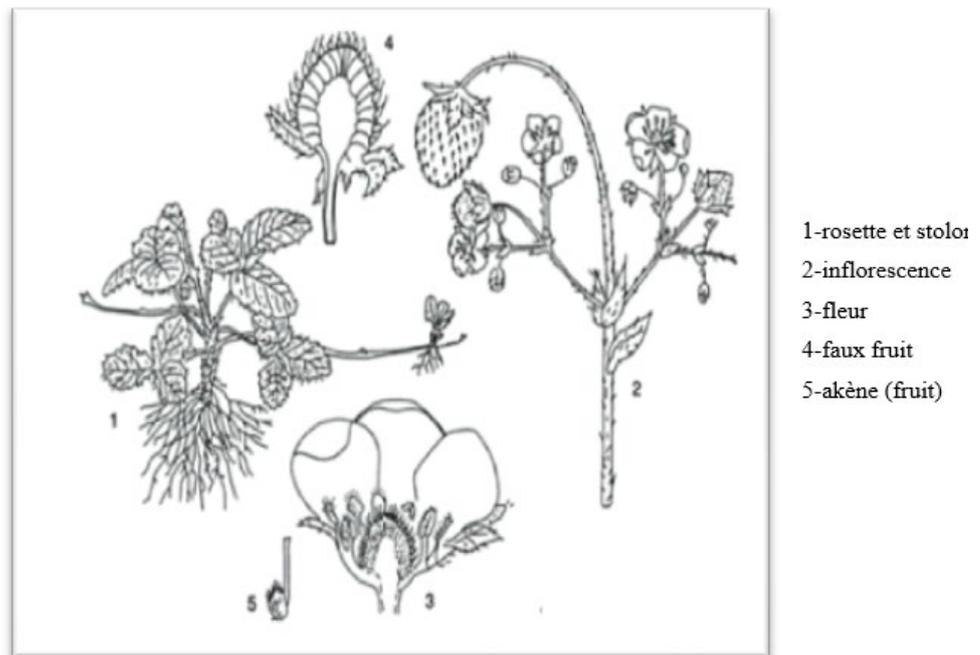


Figure 1 : Description du fraisier (Hequet, V et al ; 2009)

2.2– Classification botanique

Fragaria x ananassa Duch regroupe l'ensemble des espèces cultivées de fraisier. Cette plante herbacée de la famille des Rosacées produit des stolons qui permettent la formation de nouveaux plants par multiplication végétative. La multiplication par graine est en effet presque exclusivement réservée à la création variétale (Albin. M., 1999).

Les fraises, issues de la reproduction sexuée et considérées comme des fruits, sont en fait des polyakènes. En effet, la fraise correspond au réceptacle charnu sur lequel sont disposés. Les akènes, véritables fruits au sens botanique du terme (Crete.P., 1969).

2.3 – Taxonomie : Selon (Fournet, J. 2002)

Règne : Plantae

Sous- règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous- classe : Rosidae

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Genre : *Fragaria*

Type : vivace stolonifère

Origine : Europe essentiellement

Germination : 2 mois

2.4 – Morphologie

Les fraisiers sont des plantes pérennes herbacées avec une courte tige légèrement lignifiée porte une rosette de feuilles trifoliées (Les fleurs : pétales blanche et cœur jaune) et formant une touffe plus ou moins volumineuses.

La tige ou « rhisome » émet dans la plus part des cas ou sous certaines conditions saisonnières, des bourgeons axillaires s'allonge en stolons appelés aussi les filets ou coulants terminés, chacun une par une petite rosette pour donner naissance à des nouvelles plantes.(Lavergne, C. 2011)



Figure 2: Morphologie du fraisier (Hequet, V. ; Le Corre, M. 2010)

2.5 – Les différents types des fraisiers

Cette espèce a donné naissance à un nombre considérable de variétés qui peuvent être rattachées à trois groupes distincts :

2.5.1– Fraisier à petits fruits dits « des quatre saisons »

Race vigoureuse produisant en abondance des petits fruits très parfumés qui rappellent la fraise des bois. Les fraisiers de quatre saisons fructifient sans discontinuer de mai – juin jusqu’ au mois d’octobre. Ils se plaisent à exposition modérément ombragés

2.5.2– Fraisier à gros fruits remontants « fructification échelonnée »

Leur fruit sont de taille variable mais ils sont toujours nettement plus volumineux que ceux des « quatre saisons ». Ils fructifient une première fois en mai- juin puis après une période de repos en juillet- août, ils « remontent » c’est-à-dire qu’ils recommencent à produire jusqu’aux gelées comme les fraisiers de quatre saisons et ils réclament une exposition ensoleillée.

2.5.3– Fraisier à gros fruits non remontants « fructification groupée »

Leurs fruits sont de même genre et souvent plus gros que ceux des précédents mais contrairement à eux, la totalité de leur récolte ne s’échelonne que sur une durée de 3 à 4 semaines. Elle est souvent précoce suivante les variétés : en climat moyen, les plus hâtives sont généralement bonnes à récolter du 15 mai au 15 juin, celle de moyenne saison du 1^{er} au 30 juin et les plus tardives du 15 juin au 15 juillet. (Clause. J, 1992)

2.6 –Plantation des variétés remontantes et non remontantes

La plantation des variétés remontantes et non remontantes se fait aux mêmes époques mais les périodes de récolte sont différentes. L'époque de plantation, pour toutes les variétés, à l'exception « des quatre saisons » la période la plus propice à la mise en place des fraisiers se situe du 15 aout au 15 octobre, à cette époque, les plantes ont le temps de s'enraciner avant l'hiver et fructifient normalement dès l'année suivante.

Une autre période favorable à la reprise se présente au printemps, en mars-avril, mais elle ne convient bien qu'aux fraisiers des quatre saisons (pour lesquels c'est le meilleur moment) et aux variétés remontantes qui produisent à partir de fin aout-septembre. Les variétés remontantes ne donnent une vraie récolte que l'année suivante. (Mackee, H. S. 1994)

2.6.1– La récolte des variétés non remontantes

Pour les variétés de saison, la récolte s'étale sur 25 à 45 jours dont la cueillette est prévue pour les 2 ou 3 jours.

2.6.2– La récolte des variétés remontantes

Pour les variétés remontantes la production est étalée depuis le printemps jusqu'au premières gelées (Tison, J.-M. & de Foucault, B. 2014).

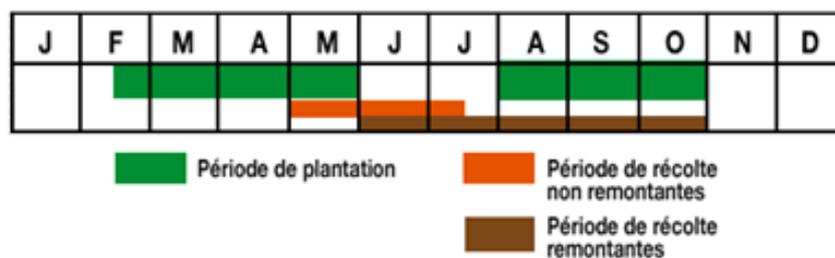


Figure 3: Calendrier de culture de fraise (Tison, J.-M. de Foucault, B. 2014)

2.7– Mise en place des fraisiers

Afin de faciliter les cueillettes et l'entretien ultérieur, la meilleure disposition consiste à planter les fraisiers par séries de deux rangs selon le schéma ci-joint, chacune de ces « planches » étant séparée de la suivante par un sentier de 60cm de largeur.

Les fraisiers craignent beaucoup l'humidité stagnante, il est recommandable en terrain imperméable de les planter sur « billon » (butte) comme figuré sur le dessin. En plus sachant que le paillage du sol est très utile au fraisier. (Clause. J, 1992)



Figure 4 : La bonne plantation de fraisiers. (Clause. J, 1992) et Luttge U., 1997)

2.8 –Exigences écologiques du fraisier

2.8.1– Exigences climatiques

- **La température** : La résistance du fraisier au froid dépend du stade végétatif : en hiver, pendant la période de repos, il peut résister à $- 25^{\circ}\text{C}$ par contre, sa floraison survenant en Avril-mai est très sensible aux gelées tardives de printemps (une petite gelée détruit la fleur). Pour éviter tout dommage, prévoyez un tunnel de forçage et la température moyenne pour une bonne floraison est de l'ordre de 10 à 15°C .
Une bonne fécondation exige une température de 20°C , la maturation normale du fruit nécessite une température au dessus de 15°C et la température optimale de croissance se situe autour de 25°C avec un arrêt de croissance à des températures inférieures à 5°C . (Risser. G et al, 1998)
- **La lumière** : La fraise a besoin de beaucoup de soleil pour le développement de toutes ses saveurs.
- **L'humidité** : Une bonne fécondation nécessite aussi une humidité relative inférieure à 60% .
- **L'humidité de l'air** : Les fraisiers apprécient les climats doux. Par contre ils détestent le soleil brulant en été.

2.8.2– Exigences édaphiques

En ce qui concerne les exigences de la culture en sol, quoique le fraisier s'adapte à une large gamme de sols, il préfère des terres chaudes à texture légère. Les sols limoneux sont les meilleurs, suivis par les sablo-limoneux. Il demande un sol perméable, suffisamment humide, mais bien drainé. Il craint l'humidité stagnante et les sols compacts ou non drainants et redoute les chlorures même à des doses faibles de l'ordre de $0,5\%$ et la teneur en calcaire doit

être inférieure à 2%. Il préfère les sols humifères, profonds et légèrement acides ou neutres (pH = 6.5 à 7). (Duval.J, 1995)

2.9 – Entretien des fraisiers

Il faut toujours garder la terre bien aérée et démunie de mauvaises herbes. En effet la lutte contre les mauvaises herbes est le principal défi de la production de fraises. C'est souvent le niveau d'infestation de mauvaises herbes qui détermine si le producteur gardera la fraisière en production une, deux ou trois années. En effet, lorsque la pression des mauvaises herbes est devenue trop grande, les fraisiers sont moins productifs et il devient peu profitable de récolter. La lutte contre les mauvaises herbes se divise en trois étapes : avant l'implantation, pendant l'année d'implantation et durant la production (Bernier, D. et al. 2002).

2.10 – Choix du site pour la production des fraises

Le choix d'un site approprié pour la production de fraises est très important. Ce choix doit être fait en fonction des critères suivants :

- qualité du sol,
- pentes,
- proximité de l'eau et d'exposition.

2.10.1– Qualité du Sol

Le fraisier est une plante très adaptable. Cependant, pour sa culture, un sol de texture moyenne (loam sableux à loam), bien drainé, un peu acide (pHeau visé de 6,2 à 6,8) est reconnu comme idéal. Un sol plus lourd (loam argileux à argile) peut convenir pourvu qu'il soit riche en matière organique, bien drainé et que la culture se fasse sur billons avec des cultivars appropriés. Un sol où le trèfle pousse bien produit généralement de belles cultures de fraises. Le sol doit être libre de contaminants (Lodgson, G. 1974).

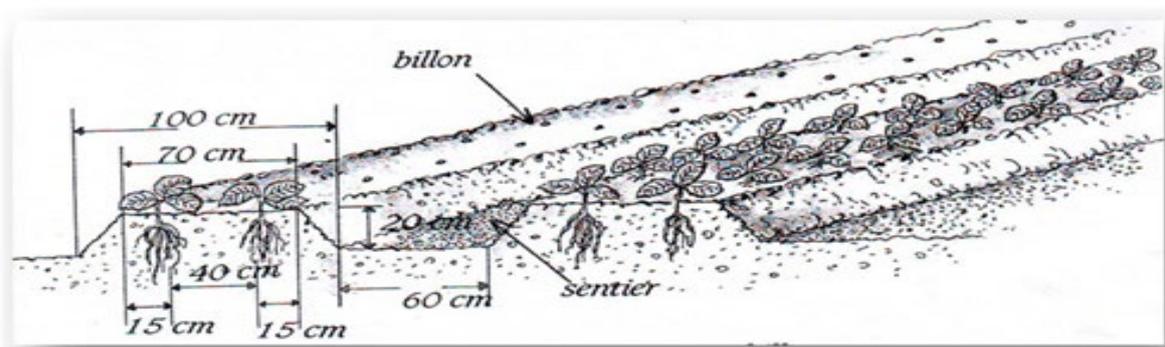


Figure 5 : Plantation de fraisiers sur billon (Clause. J, 1992)

Comme bien d'autres plantes, le fraisier peut, jusqu'à un certain point, tolérer la sécheresse. Toutefois, son système racinaire étant très superficiel, il requiert habituellement un apport régulier en eau. En production commerciale, il est donc essentiel de choisir un site avec un sol bien drainé et, au besoin, de lui procurer l'eau nécessaire par irrigation.

2.10.2 – Pente et exposition

Les fleurs de fraisiers sont sensibles aux gels printaniers. Un site bénéficiant d'une bonne circulation d'air ou encore, localisé près d'une vaste étendue d'eau constitue un atout. Les sites comportant une pente au sud se réchauffent souvent trop vite, ce qui accélère la floraison et augmente les risques de pertes dues au gel printanier. Ils permettent, par contre, la production de primeurs.

Quant aux pentes faisant face à l'ouest, elles sont parfois trop exposées aux grands vents asséchants de l'hiver et peuvent provoquer le gel des plants. Les sites trop en pente sont à éviter à cause des risques d'érosion et des complications qu'ils entraînent pour l'irrigation. Un site moins favorable peut souvent être amélioré par l'installation ou l'enlèvement de brise-vent qui vont influencer judicieusement les mouvements d'air. (Pritts, M. 2003)

2.10.3 – Proximité du marché et de l'entrepôt

La fraise est un petit fruit très périssable. Même en disposant d'un véhicule réfrigéré, la ferme doit être idéalement située près des marchés. De plus, le site de production lui-même ne doit pas être trop éloigné du site d'entreposage temporaire de la récolte. La demande en fraises est difficile à estimer. Il faudrait adapter les surfaces à cultiver selon le marché visé (Pritts M., 2003).

2.11– Systèmes cultureaux des fraisiers

Il existe plusieurs systèmes de culture des fraisiers. La méthode la plus utilisée, est la culture en rangs nattés. C'est cette méthode qui sera détaillée dans les pages qui suivent, avec les particularités qu'elle implique en production conventionnelle.

D'autres systèmes cultureaux sont possibles pour les fraisiers (paillis de plastique, fraisiers à jour neutre, fraises sous serre, par exemple) (Richard, Jean. 1987).

2.11.1– Système en rangs nattés

Le système en rangs nattés implique une année consacrée à l'implantation et quelques années de récolte faite en début d'été. Voici la description des étapes de ce système :

- **Plantation** : Le plus tôt possible en mai, mettre en terre des plants de fraisiers en rangs simples et à faible densité.
- **Entretien** : Au cours de l'année d'implantation, enlever toutes les fleurs qui sont produites après la plantation. Ainsi, l'apparition de stolons est favorisée. Laisser les stolons se développer la première saison, de façon à obtenir une haute densité de plants. Les placer de façon à obtenir une couverture uniforme. Les bourgeons fruitiers qui produiront l'année suivante se développent à la fin de l'été.
- **Protection** : Protéger la culture avec de la paille pendant l'hiver. Le printemps suivant, avant le développement de nouvelles pousses, dépailler les rangs dans les allées. Le dépaillage devrait s'effectuer lorsque la température du sol à 10 cm de profondeur atteint entre 4 et 6 °C.
- **Récolte** : Récolter lors de la deuxième année.
- **Rénovation** : Rénover la plantation après la récolte en détruisant une partie des stolons pour éviter une trop grande densité de plant (Schmid, Andi et Gilles Weidmann, 1998).

2.11.2 – Système avec paillis de plastique

Cette méthode comporte de nombreux avantages. D'abord, elle permet une récolte plus hâtive l'année suivante, ce qui peut générer un revenu de primeur intéressant. Ensuite, comme il y a moins de fruits produits mais qu'ils sont de plus gros calibre, la récolte est plus efficace. Par ailleurs, moins de problèmes de maladies sont généralement rencontrés en raison des conditions de protection assurées par le plastique et la bâche. Enfin, puisque l'implantation des fraisiers se fait en août plutôt qu'en mai, la méthode permet de libérer le champ pour une récolte hâtive de plantes maraîchères en début de saison.

En Europe, la majorité de la production de fraises en champ est faite avec un paillis de plastique. Toutefois, la lutte contre les mauvaises herbes s'en trouve de beaucoup facilitée, les coûts associés au désherbage sont moindres et la récolte, potentiellement plus intéressante. La minéralisation de l'azote se fait différemment et plus rapidement sous un plastique. Selon la texture du sol, il faudra donc ajuster à la baisse la fertilisation pour éviter une trop grande croissance végétative (Richard J., 1987).

2.11.3 – Système de production en serre

En Amérique du Nord, la production de fraises en serre est très limitée. En Europe, où le marché accepte des fraises à l'année, il se fait de la production de fraises en serre, soit avec des serres fixes ou des serres mobiles, le tout en plein sol ou en bacs de culture.

2.12 – Conditions d'entretien des systèmes de cultures des fraisiers

2.12.1– Irrigation

L'irrigation est essentielle pour la production commerciale de fraises. En effet, l'approvisionnement en eau est requis à plusieurs étapes de la production :

- à l'implantation pour assurer une reprise rapide des plants et une diminution de la mortalité;
- à la floraison (en aspersion) pour contrer les risques de gel; pendant le grossissement des fruits;
- à la rénovation et jusqu'à la dormance pour assurer un développement optimal. Il ne faut pas oublier que le rendement d'une fraisière se détermine à la fin de l'été précédant la récolte alors que la plante prépare ses bourgeons floraux (initiation florale) (Ames, G.K. et Born .H ., 2000).

2.12.2– Fertilisation

Le fraisier est une plante peu exigeante sur le plan des éléments nutritifs exportés par la culture. Une tonne de fraises à 92 % d'humidité représente environ 1 kg d'azote (N), 0,5 kg de phosphore (P_2O_5), 2 kg de potassium (K_2O) et 0,2 kg de calcium (CaO). En production biologique, le producteur peut s'attendre à un rendement d'environ 5 tonnes à l'hectare (t/ha) en première année de production. L'exportation serait donc d'environ 5 kg d'azote, 2,5 kg de phosphore et 10 kg de potassium. Pour deux années de production, cette estimation peut être doublée, ce qui demeure bien peu comparé à la plupart des plantes maraîchères.

Malgré ces faibles exportations d'éléments nutritifs, le producteur a avantage à cultiver le fraisier dans un sol assez riche, car le système racinaire du fraisier est plutôt restreint et peu efficace pour le prélèvement des éléments nutritifs. De plus, la période de production est très courte, le poids du plant et de ses fruits augmentant en quelques semaines de 125 % entre la floraison et la récolte (Duval, J. 1995).

2.12.3 – Influence du pH

Le pH eau, qui fluctue beaucoup dans une même saison, devrait se situer plus ou moins entre 6,0 et 6,5. En Europe, le calcul des quantités de chaux à apporter pour atteindre un certain pH eau se fait à partir de la valeur du pH tampon. Le producteur doit consulter le tableau de recommandations de chaux du Guide de référence en fertilisation du CRAAQ ou demander l'aide d'un agronome pour établir, d'après l'analyse de sol, les besoins en chaux d'une parcelle.

Les chaux calciques et magnésiennes (dolomitiques) sont acceptées en agriculture biologique. Certains organismes de certification peuvent ne pas accepter l'utilisation de chaux potassique (poussières de cimenterie, aussi appelées Tubrex). Le type de chaux à utiliser dépendra des teneurs en calcium, magnésium et potassium révélées à l'analyse.

Les chaux calciques agissent, en général, plus rapidement que les autres types de chaux. Le fraisier est sensible à l'excès de salinité que pourrait causer l'apport de cendres. Les cendres de bois doivent donc être employées prudemment pour chauler (Duval, J. 1995).

2.12.4 – Apports en sels minéraux

- **Calcium**

Il est très rare qu'un sol manque de calcium. Une carence en calcium peut cependant apparaître dans le fraisier en raison d'un approvisionnement irrégulier en eau ou lors d'une croissance rapide du plant. Le bout des feuilles du fraisier devient alors noir. Trop de calcium n'est guère plus souhaitable : empêchant l'absorption du potassium, il peut être néfaste pour le goût des fruits.

Pour corriger une carence en calcium, l'apport de chaux est le premier choix, car il permet une augmentation du niveau de calcium à moindre coût, tout en stimulant la vie du sol. Cependant, si le pH du sol est élevé mais que les niveaux de calcium sont jugés trop bas, le producteur peut employer du gypse, aussi autorisé en agriculture. Un niveau très bas de calcium pourrait se traduire, par exemple, par un pourcentage de saturation en calcium inférieur à 30 % en sol léger (Meda.L.N, 2001).

- **Potassium**

Un sol naturellement riche en potassium est idéal pour le fraisier. Une haute concentration en potassium assure du goût et du rendement. Les taux de sucre et de vitamine C augmentent aussi avec la richesse du sol en potassium. Une carence en potassium chez le fraisier s'exprime d'abord au niveau des feuilles : les dents situées à leur bout deviennent couleur rouge-marron, puis brunes et finalement elles se dessèchent.

Pour une parcelle à implanter en fraisiers, le producteur aura intérêt à viser un niveau de potassium considéré comme bon, soit de plus de 400 kg/ha à l'analyse. À des niveaux inférieurs, des apports de potassium sous forme de sulfate de potassium et de magnésium, de sulfate de potassium ou de cendres de bois peuvent être réalisés en premier lieu. D'autres sources de potassium autorisées, celles-là moins rapidement disponibles, sont le basalte et le mica. Le purin de fumier de vaches laitières représente une autre source de potassium intéressante. Il peut être appliqué au courant de l'été précédant l'implantation sur un engrais vert ou une prairie à détruire (Duval, J.1995).

- **Magnésium**

Le magnésium, un constituant essentiel de la chlorophylle, est moins important pour le fraisier. Toutefois, si le niveau de magnésium à l'analyse est très faible, c'est-à-dire inférieur à 100 kg/ha, le producteur peut effectuer des apports de chaux dolomitique, de sulfate de potassium et de magnésium ou plus rarement de sulfate de magnésium (Özcan. M., 2007).

- **Phosphore**

Il faut prendre garde de ne pas surfertiliser le fraisier en phosphore, car cet élément est très peu requis par cette plante. L'utilisation de phosphate de roche est permise, cependant, il est rarement profitable d'en apporter directement au sol, car il sera très peu disponible pour le fraisier, sauf si le sol est acide (pH eau inférieur à 6,0).

Si les niveaux de phosphore sont bas à l'analyse, par exemple de moins de 100 kg/ha, le producteur peut enrichir le fumier à composter avec du phosphate de roche. L'action des microorganismes rendra le phosphore du phosphate de roche plus disponible que s'il était apporté directement au sol. Le compost et le fumier demeurent toutefois les premiers choix et les moins coûteux quand il s'agit d'enrichir le sol en phosphore (Meda.L.N., 2001).

3 – Généralités sur la fraise

3.1– Structure

La fraise est un faux fruit issu du grossissement du réceptacle après fécondation des ovules de la fleur du fraisier. Elle est formée par l'ensemble du réceptacle charnu de la fleur. Elle a une couleur rouge ou jaune blanchâtre selon les variétés et une forme ovoïde oblongue plus ou moins arrondie. Son réceptacle s'accroît jusqu'à devenir à la maturité une masse pulpeuse, juteuse, délicieuse au goût. (Mishra, 2014).



Figure 6 : Structure externe de la fraise (Botineau. M. , 2009)

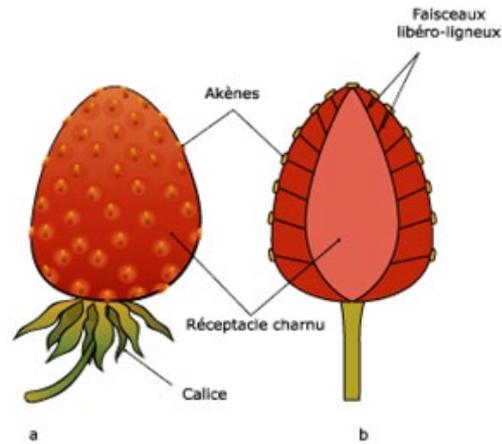


Figure 7 : Morphologie de la fraise.

3.2– Caractéristiques morphologiques de la fraise

Au sens botanique du terme, les « vrais » fruits sont en fait les akènes, ces petits grains secs (communément appelés à tort pépins alors que ce dernier terme ne devrait désigner que leur minuscule graine centrale) disposés régulièrement dans des alvéoles plus ou moins profondes sur la fraise, de couleur verte à brune, et renfermant chacun soit un ovule (non fécondé) soit une graine (qui porte alors un germe lorsque la fraise arrive à maturité).



Figure 8 : Détail de la surface de la fraise. Trois grossissements successifs montrent les akènes à la surface du réceptacle floral charnu. (Botineau. M. , 2009)



Figure 9 : Morphologie interne de la fraise (Favier, J.-C. et al. (1993)

Le corps charnu de la fraise étant formé par le réceptacle floral (induvie hypertrophié sous l'effet des auxines). Ce sont les akènes qui produisent une hormone permettant au faux-fruit de grossir. ((Hebbache et *al.*, 2013).)

3.3– Les variétés cultivées des fraises

Parmi les nombreuses variétés existantes (plus de 600), on peut citer les principales variétés de fraisiers remontants ou non remontants, à production précoce ou tardive. A l'intérieur de chacune de ces catégories, il existe des différences concernant l'aspect des fruits et les caractéristiques de la chair (tableau 1).

Tableau 1: Les différentes variétés cultivées des fraises (Botineau. M., 2009)

Nom des variétés	Aspects des fruits	Caractères de la chair	Observations diverse
Fraisiers non remontant à gros fruits			
Darstar	moyen, gros, conique, rouge claire brillant	Ferme, rouge à rosée	Variété vigoureuse, précoce et de bon rendement
Gariguette	Moyen à gros biconique, allongé, rouge vif brillant	Ferme, juteuse, agréablement parfumée	Productivité moyenne, très bonne qualité gustative
Surprise des Halles	fruit assez gros (20 à 30g) conique, courts	Assez ferme, juteuse, acidulée, très parfumée	La plus précoce, forte productivité
Variétés à production de moyenne saison			
Belburi	Très gros (20-40g), allongé, biconique, rouge groseille très brillant.	Très ferme, rouge orangé, sucrée, saveur agréable	Productive
Cambridge favourite	gros (15 à 30g) conique, court, arrondi, rouge orangé	Ferme, juteuse, de bonne saveur	Rd élevé, s'adapte à tous terrains
Gorella	gros (15-30g), conique, allongé, rouge cardinal	Très ferme, assez colorée, juteuse et douce, de qualité variable selon les terrains.	très productive (évitez les climats chauds et les sols calcaires)
Hummi grande	Très gros conique. Régulier, rouge vif luisant	Mbelleuse, juteuse, sucrée, assez coloré, d'arome agréable.	Fruit énorme (jusqu'à 75g et plus), grand productivité surtout en 2 ^{em} année
Fraisiers remontants à gros fruits			

Bordurella	Moyen, rond, rouge clair brillant.	Assez ferme, délicieusement parfumée, arôme rappelant celui de la fraise de bois	Feuillage abondant. Ne produit pas de stolons, multiplication par division de la souche.
Hummi gento	Très gros, conique, très allongée, très brique.	Ferme, juteuse, très sucrée, au goût de fraise des bois	La plus grands fraise remontante (40à 50g) de forte productivité : les filets de l'année portent déjà des fruits
Ostara	Gros, conique, rouge vif brillant	Ferme et juteuse, de gout agréable	Forte productivité, étalée de mai à novembre
Rabunda	Moyen, très court conique, globuleux, rouge orangé brillant	Ferme, juteuse et parfumée, bonne saveur	Production de mi-juillet à novembre, très bon Rd
Revada	Moyen , de forme arrondie, rouge vif	Ferme, sucrée et parfumée, bonne qualité gustative.	Très remontante et productive.
Sans rivale	Moyen. Conique, allongé, rouge claire	Chair ferme rosée, sucrée et parfumée	Particulièrement productive de mai à octobre, craint la sécheresse

3.4– Composition et valeur nutritionnelle de la fraise

La fraise est un fruit très riche en eau 90% et relativement peu chargé en glucide (Garcia et al., 2002). De plus, elle est peu calorique, riche en vitamine , la plus intéressante est la vitamine C qui intervient dans les grandes fonctions de l'organisme, ainsi que la vitamine A sous forme de précurseur, le β -carotène, mais pas de rétinol qui doit être synthétisé , pour stimuler les défenses immunitaires , et la vitamine B8 biotine qui joue un rôle contre la chute des cheveux et la vitamine B9 acide folique qui agit sur la croissance et la division cellulaire de plus un apport en oligo-éléments et macronutriments. Elle figure parmi les fruits les plus riches en fibres ses petits grains étant composés de pectine et de cellulose ces fibres bénéfiques pour le transit et le fonctionnement du système digestif, ce fruit contient aussi une quantité importante de l'acide éllagique (Souci et al., 1981).

Elle est riche en oligo-éléments, sous forme de sels de potassium pour le système nerveux et contre la fixation excessive du sodium, de calcium pour les os et du magnésium contre le stress. Elle contient également du furanéol (l'alcool aromatique qui lui donne son parfum et son goût).

D'une manière générale, les acides phénoliques (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques) sont majoritaires dans la fraise, suivis des anthocyanes, des flavonols et des flavan-3-ols (Seeram et al., 2006 ; Kosińska, 2013 ; Nowicka, 2019).

Parmi les acides phénoliques, l'acide ellagique et les dérivés de l'acide coumarique sont généralement prépondérants. Si la pelargonidine-3-glucoside est l'anthocyane majeur dans la fraise, la présence de cyanidine-3-glucoside et de pelargonidine-3-acetylglucoside a également été rapportée (Bakker, 1994 ; Lopes-da-Silva, 2002).

Parmi les autres composés, figurent généralement des dérivés de la quercétine et du kampférol (flavonols), ainsi que de la catéchine et des procyanidines (flavan-3-ols). Ces derniers composés peuvent également être présents en grande quantité mais sous forme condensée (proanthocyanidines) (Enomoto, 2019) (voir Tableau 2).

Tableau 2 : La composition chimique de la fraise

Fraise crue (valeur nutritive pour 100 g)									
Eau	Glucides	DSS	FA	Protéines	Lipides	CT	VE		
88,95 g	7,68 g	4,66 g	2,0 g	0,67 g	0,30 g	0,40 g	32 kcal		
Acides gras									
Poly insaturés		Mono insaturés		AG Saturés		Dont cholestérol			
155 mg		43 mg		15 mg		0 mg			
Les oligo-éléments									
(K)	(P)	(Na)	(Zn)	(Ca)	(Mg)	(Fe)	(Cu)		
153 mg	24 mg	1 mg	140 µg	16 -40 mg	13-15mg	420 µg	48 µg		
Les vitamines									
(C)	(B3)	(B5)	(B9)	(B6)	(B1)	(B2)	(K)	(E)	(A)
64 mg	386µg	125µg	60µg	47µg	24µg	22µg	2,2µg	0,29µg	12 UI
Les composés phénoliques									
Les flavonoïdes			Les tannins			Polyphénol totaux			
85 mg			140.8 mg			263.8 mg			

3.5– Caractéristiques physiques et organoleptiques

La fraise est un fruit de couleur rouge vif très attrayant, due à la présence d'anthocyanes, dont le principal est la pelargonidine-3-glucoside (Mishra, 2014). C'est un fruit non climactérique, dont la couleur évolue au cours de la maturation passant du vert blanc au rouge sombre en une quarantaine de jours après anthèse (Pech, 2018).

La fraise se caractérise également par sa faible fermeté (Schwieterman, 2014). Au cours de la maturation, le pH augmente alors que l'acidité et la fermeté du fruit diminuent (Ornelas-Paz, 2013).

Selon Giampieri et al., (2012), la fraise est considérée comme un fruit mou périssable, présentant une durée de conservation post-récolte extrêmement courte, en raison de la faible résistance mécanique et de la sensibilité élevée à l'attaque des pathogènes.

Son arôme est constitué principalement d'un mélange complexe d'esters, d'aldéhydes, d'alcools et de composés soufrés. A ce jour, plus de 350 composés volatils ont été identifiés dans la fraise, mais seule une douzaine contribuent significativement à l'arôme de ce fruit, en particulier le furanéol (4-hydroxy-2,5-diméthyl-3-(2H)-furanone) (Song, 2016 ; Yan, 2018). Les esters, tels les butanoates et les hexanoates de méthyle et d'éthyle, seraient également d'importants contributeurs à l'arôme de ce fruit (Cruz-Rus, 2017). Le linalol (monoterpénol) a été associé à un arôme fleuri et sucré tandis que le furaneol et son dérivé méthoxylé le mésifurane (2,5-diméthyl-4-méthoxy-3 (2 H) -furanone) (furanones) seraient responsables des arômes fruités et caramel. D'autres composés clés comme la γ -décàlactone et la γ -dodécàlactone, contribuant à l'arôme frais de pêche, ont été associés à la perception de douceur accrue dans la fraise (Ulrich, 2016 ; Yan et al., 2018).

La maturation de la fraise entraîne une accumulation de plusieurs sucres et d'acides organiques en plus des composés volatils qui constituent son arôme (Ménager, 2004 ; Nunes., 2006 ; Kafkas,2007 ; Schwieterman, 2014).

La petite note acidulée est due à la présence plus ou moins importante d'acides organiques, principalement les acides citrique et malique (Mikulic-Petkovsek, 2012). Les principaux acides organiques ont tendance à augmenter de façon irrégulière au cours de la maturation de la fraise (Ornelas-Paz, 2013)

3.6 –Répartition géographique et production des fraises

3.6.1– Production mondiale

A l'échelle mondiale, la production de fraises connaît une hausse depuis 2010. Cette production atteignait plus de 8 millions de tonnes en 2014 (Plénet et al., 2016). Les 10 plus

gros pays producteurs au monde représentent plus de 80% de la production mondiale, les trois principaux pays producteurs en 2014 sont, respectivement, la Chine, les Etats-Unis et le Mexique avec une production de 7 643 730 tonnes, 1 420 570 tonnes et 468 248 tonnes de fraises. Après viendra la Mexique avec une production de 468 248 tonnes suivie de l’Egypte, la Turquie, l’Espagne, l’Allemagne et la Pologne. La France arrive en dernière avec 58737 tonnes de fraises produites malgré que ce soit la grande consommatrice de ce fruit (FAO, 2017) (Figure 10).

Les 15 plus gros pays producteurs au monde représentent plus de 80% de la production mondiale, les deux principaux pays producteurs en 2008 sont la Chine et les Etats-Unis avec respectivement une production de 7 643 730 tonnes et 1 420 570 tonnes de fraises.

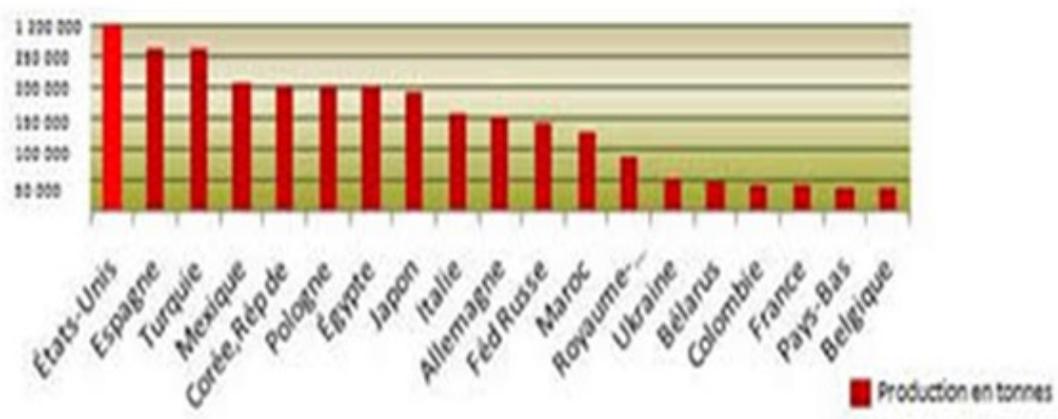


Figure 10 : Les producteurs de la fraise les plus connus au monde (Bostanian, N.J. 1994 et FAO 2017)

La production mondiale de fraises a presque doublé en plus de 15 ans. En 1990 cette production atteignait 2 251 000 tonnes et a atteint 4 068 000 tonnes en 2008.

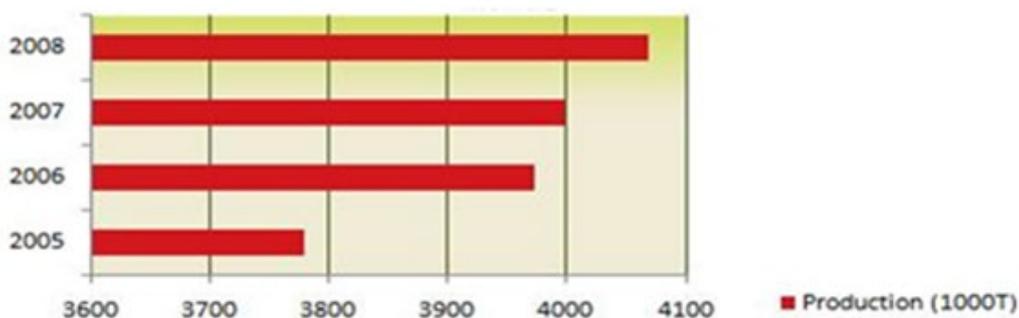


Figure 11 : Augmentation de la production de la fraise dans le monde (Bostanian, N.J. 1994) et FAO 2017)

3.6.2– Production nationale et sa répartition géographique

En Algérie, on la trouve généralement au nord du pays. Parmi les régions célèbres de ce fruit sont Skikda – Tipaza et Jijel, Quant à sa provenance, il ressort que c'est la région Centre, notamment Boufarik, qui est devenue la référence de la culture de ce fruit.

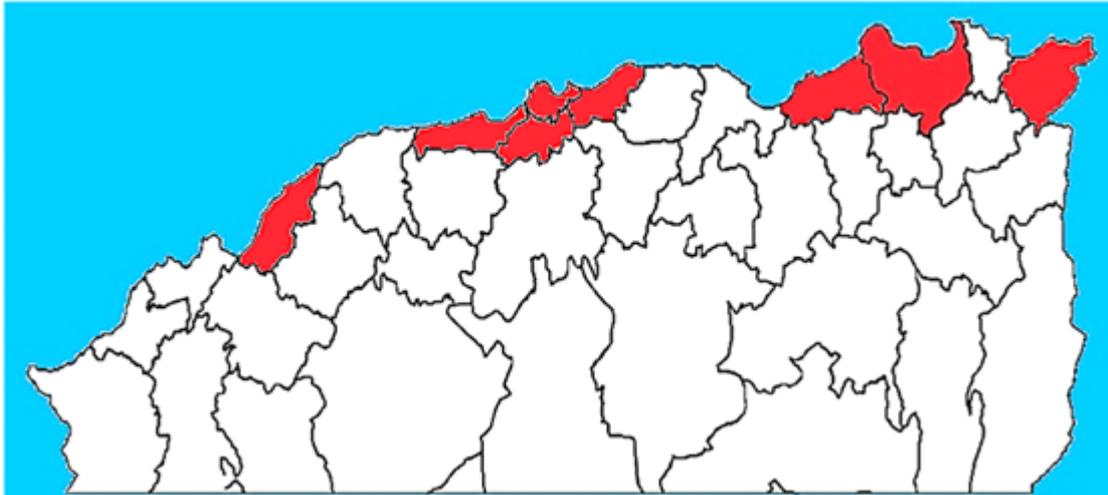


Figure 12 : Répartition de la culture de la fraise en Algérie (MADRP, 2017).

Selon la direction des services agricoles La production nationale de la fraise est en augmentation continue, dont les wilayas de Jijel, Skikda, Beskra, Tipaza sont les plus grandes producteurs en Algérie. La région de Jijel (communes : Sidi Abdelaziz, Oued adjoul, Ziama mansouria D'El Ancer à l'est, à El Aouana, plus à l'ouest, en passant par les localités de Beni Belaïd, El Kennar et Chekfa) occupe la première place de cette production d'où la culture de la fraise a été lancée à titre expérimental à Jijel en 2001-2002, sur quatre (4) hectares.

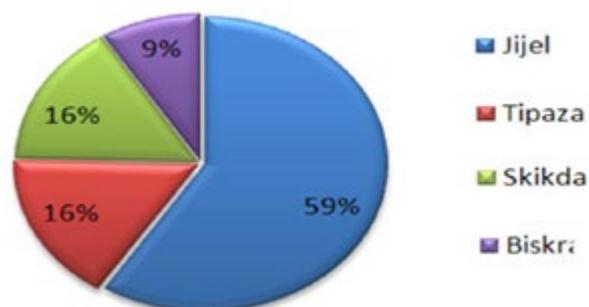


Figure 13 : Production nationale de la fraise (DSA, 2018)

L'expérience a donné lieu à une production de l'ordre de 1.200 quintaux de fraise. En 2010, la superficie de la culture de la fraise a atteint 120 hectares et une production de 36.000 qts, alors qu'en 2015, les 323 hectares, superficie de culture de fraise a donné production de 100.000 qts suite la région de Tipaza (communes : Bou Ismaïl) sur 300 ha avec une production de 27500 en 2015, après vient de Skikda (montagnes : Tamalous, Bouchtata, Ain zouit) en troisième place sur 275 ha avec un rendement de 23000qtx en 2011 et 26500qtx en 2015, en dernier vient la région de Biskra communes : (Daïras de Fouka , Koléa) avec une production de 15000 qts sur une superficie de 97 ha en 2015.

3.7– Parasites et maladies des fraises

La fraise peut être affectée par plusieurs maladies, dont la moisissure grise, les taches foliaires la stèle rouge et l'Oïdium (voir tableau 3).

3.7.1– Moisissure grise

La moisissure grise (*Botrytis cinerea*) est causée par un champignon qui infecte les feuilles et les fruits du fraisier. En général, c'est une maladie moins prépondérante en production biologique qu'en production conventionnelle. La maladie est plus présente lors d'un printemps humide et à partir de la deuxième année de production. La période critique d'infection se situe entre le début et les deux tiers de la floraison (Duval, J. 1995).

3.7.2– Stèle rouge

La stèle rouge (photo 19) est une maladie causée par un champignon (*Phytophthora fragariae*) qui peut vivre jusqu'à 20 ans dans le sol. Elle est surtout un problème dans les sols mal drainés. Des billons d'au moins 20 cm de hauteur sont recommandés en prévention. Il existe plusieurs races de stèle rouge et des cultivars de fraisier résistants à certaines races.

Pour prévenir le développement de cette maladie, il ne faut pas transplanter un plant ayant une racine sans racelles (queue de rat). C'est un signe de la présence de la stèle rouge. Si on ouvre une racine et que le cœur est rouge, la maladie est présente. Les apports de compost et les engrais verts sont souvent défavorables aux pathogènes responsables de maladies comme la stèle rouge (Maas, J.L. 1998).

3.7.3– Taches foliaires

En plus de créer des taches sur les feuilles, la tache commune, qui est causée par le champignon *Mycosphærella fragariae*, tue les sépales et fait noircir les graines. Elle affecte

aussi les feuilles, en particulier les jeunes.

Comme son nom l'indique, la tache pourpre laisse, pour sa part, des taches pourpres sur les feuilles, surtout sur les vieilles. Ces taches, provoquées par la présence du champignon *Diplocarpon earlianum*, brunissent et se fusionnent, amenant les feuilles à se tordre. Les plants affectés hivernent moins bien. Leur rendement s'en trouve affecté. Ces maladies ont un cycle similaire à celui de la moisissure grise. L'élimination des feuilles, lors de la rénovation, permet donc de couper leur cycle. (Maas, J.L. 1998).

3.7.4– Oïdium

L'oïdium, auparavant appelé « blanc », peut se développer lors des périodes chaudes et sèches de l'été. Un mince film blanchâtre recouvre alors le feuillage du fraisier. Le soufre est très efficace contre l'oïdium, de même que le bicarbonate de sodium, mais les applications doivent être répétées. Les cultivars Chambly et Cavendish sont sensibles à cette maladie (Rébeaud, 2017).

Tableau 3 : Les différentes maladies et parasites de la fraise

Organes attaqués et symptômes	Parasites ou maladies	Traitement et observation « produits conseillés »
Dépérissement de la plante Dû à des insectes du sol : larves grisâtres qui coupent les racines ; présence de vers blanches, de taupins	Tipules Vers blanches Taupins	Traitements préventifs du sol avant plantation, avec des granulés insecticides.
Dû à un charençon qui rouge le collet et s'attaque aux racines (larve)	Noctuelles Otiorrhynque	<i>Insecticides de sol</i>
Feuillages couvert de petites taches rondes, brun pourpre	Maladies de taches pourpres	Traitements: <i>par herbicides et fongicides</i> Traitez avec : <i>Araignées rouges et jaunes</i> , dès l'apparition des symptômes
Feuilles centrales déformées, recroquevillées et jaunes	Tarsonème	
Feuilles et pétioles poisseux, couverts de pucerons.	Pucerons (Certains pucerons jaunes de fraisiers) transmettent des maladies à virus.	Traitez dès l'apparition des colonies avec : <i>traitement insecticide poudrage</i> ou <i>traitement insecticides pulvérisation</i>
Feuilles gaufrées, couvertes d'une poussière blanche	Oïdium	Favorisé par le temps frais : <i>pulvérisation d'insecticides ou poudrage</i> qui agira également contre les pucerons
Pourritures grises des fleurs, des pédoncules et des fruits.	Botrytis (pourriture grise)	Pulvériser avec <i>Sanix</i> jusqu'à la formation des fruits

Conclusion

La fraise est en effet particulièrement intéressante pour son apport vitaminique, ses oligo-éléments et son contenu phénolique qui stimulent nos défenses immunitaires et contribuerait à prévenir les maladies cancérogènes et cardiovasculaires et plusieurs autres maladies. Sa culture a des valeurs alimentaires très importantes, c'est pourquoi la fraise est l'un des fruits les plus consommés à travers le monde et qui se révèlent être avantageux pour les consommateurs.

Chapitre II

Les antioxydants naturels dans les fruits et légumes

&

Stress oxydant

1-Introduction

Les plantes produisent divers composés organiques, dont la grande majorité ne semble pas participer directement à leurs croissance et développement. Ces substances, traditionnellement appelées antioxydants naturels, sont souvent distribuées différemment parmi des groupes taxonomiques limités dans le règne végétal (**Hanson, 2003**). Ils sont responsable des activités biologiques des plantes médicinales (**Croteau et al., 2000**).

Sur la base de leurs origines biosynthétiques, les antioxydants naturels des plantes peuvent être divisés en quatre grands groupes : les composés polyphénoliques, les vitamines, les oligo-éléments et les alcaloïdes (**Crozier et al., 2008**). Ces molécules étaient considérées pendant longtemps, comme inintéressantes pour l'organisme, tant au niveau nutritionnel que pour la santé, de plus les progrès des techniques d'analyse, ont permis de mieux comprendre le rôle de ces composés (**Sagols. E et Priymenko. N, 2010**).

2- présentation générale sur les polyphénols

Les polyphénols constituent un des groupe le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Strack et al., 1992**). Les composés polyphénoliques sont des métabolites secondaires présents dans tous les organes de la plante, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide, lipide ou protéine (**Lugazi. A et al, 2003 et Crozier et al., 2008**).

2.1-Localisation des polyphénols

Une des caractéristiques des composés phénoliques, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce. Selon la variété et le stade d'évolution physiologique. Les variations sont également considérables selon la nature des tissus et des cellules composant le végétal (**pascale. S, 2006**).

A l'échelle cellulaire, la partition des composés phénoliques est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites :

- la paroi cellulaire où sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes et des molécules associés aux lignines comme l'acide férulique) ;
- la vacuole où sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tanins...)

Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique, mais toujours à très faible concentration (**Macheïx.JJ. et al . 2005**). A l'échelle tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique.

Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (**Tomas- Barberan. F, 2001 et Cheynier. Y, 2006**).

2.2-Classification des composés phénoliques

Selon **Harborne (2000)**, les polyphénols peuvent être divisés au moins en 10 classes différentes selon leur structure chimique de base. Peuvent s'étendre de molécules simples, tels que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tanins (**Lugazi. A, 2003**).

Tableau 4 : principales classes des composés phénoliques (Harborne (2013)).

Squelette carboné	Classe	exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchole	Nombreuse espèce
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy	Acide caféique	Pomme de terre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinone	juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	resveratrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Quercétine, cyanidine.	Fruits, légumes.
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) ₃	Lignines		Bois, fruits à noyau
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₃	Tanins condensés		Raisin, kaki

2.2.1-les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (**Bruneton J. , 2008**).

Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Ils sont solubles dans l'éther, et peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes, par exemple, l'acide gallique agit comme inhibiteur de la floraison (**Pstova et al, 2005**). Parmi les acides phénoliques (**figure 1**) on distingue :

- les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbonés).
- les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type (C6-C3)).

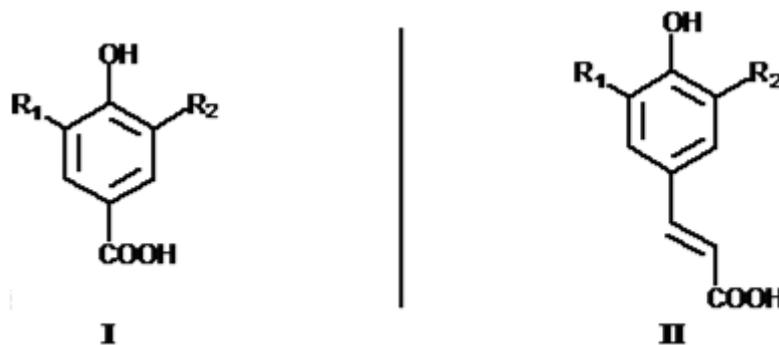


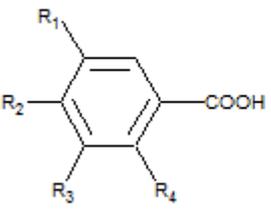
Figure 14 : Acides phénoliques (squelette benzoïque(I) et cinnamique(II))

2.2.1.1-les acides benzoïques

Ils dérivent de l'acide benzoïque et ont comme formule de base de type C6-C1) (**Budić-Leto et Lovrić 2002**). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glycosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins. (**Pascale. S, 2006**)

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (**Skerget M., 2005 et Bruneton J. (2008).**). Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (**Manach C.,2004**). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans le tableau 2.

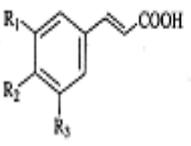
Tableau 5 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Pascale. S, 2006).

formule	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acide hydroxybenzoïque
	H	H	H	H	Acide benzoïque (non phénolique)
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

2.2.1.2-les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3 dérivé de celle de l'acide cinnamique, les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide p-coumarique et ses isomères les acides o- et m-coumariques et les acides caféiques, feruliques et sinapiques (Ribereau. G. P, 1968). Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés [Skerget M.,2005]et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (tableau 3), [Bruneton J. (2008)].

Tableau 6 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Pascale. S, 2006)

Formule	R ₁	R ₂	R ₃	Acide hydroxycinnamique
	H	H	H	Acide cinnamique (non phénolique)
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique) (Manach C., 2004). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) (Podsdek A.,2000) et dans le café, une seule tasse peut en contenir de 70 à 350 mg (Makalao. MM, 2015).

2.2.1.3-les coumarines

Ils dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale et certaines formes complexes. les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou l'ombelliférone, l'aescullétine et la scopolétine (**figure 2**) (Clifford M.N., 1999). Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. (Igor, 2002).

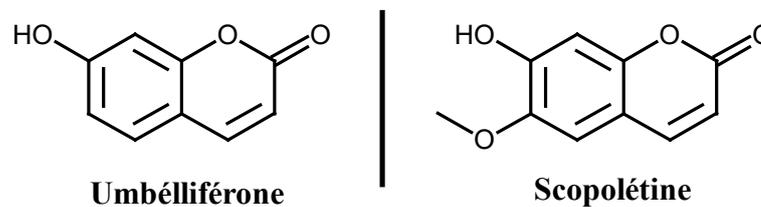


Figure 15 : Structures chimiques de quelques coumarines (Clifford M.N., 1999)

2.2.1.4– Les alcools phénoliques

Les alcools phénoliques sont des composés organiques possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe (**Figure 3**). Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique (Silva S. et al , 2010).

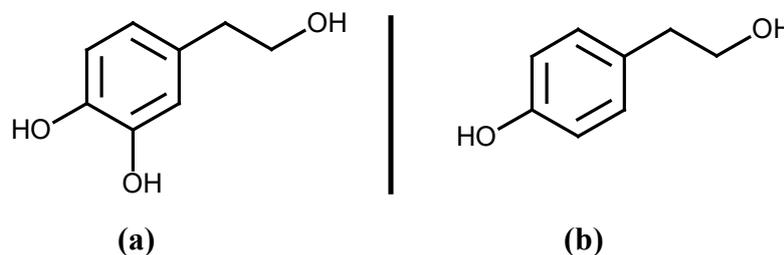


Figure 16 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) (Briante R., et al ; 2004).

Parmi ces dérivés phénoliques, le resvératrol et l'oleuropéine sont les composés qui sont les plus étudiés. En effet, le resvératrol, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes.. Par contre l'oleuropéine est le principal alcool phénolique de l'olive responsable de l'amertume du fruit (60 à 90 mg/g matière sèche) (Balasundram N.,et al ;

2004). L'activité antioxydante de ces deux composés est similaire à celles signalées pour les flavonoïdes (Igor, 2002).

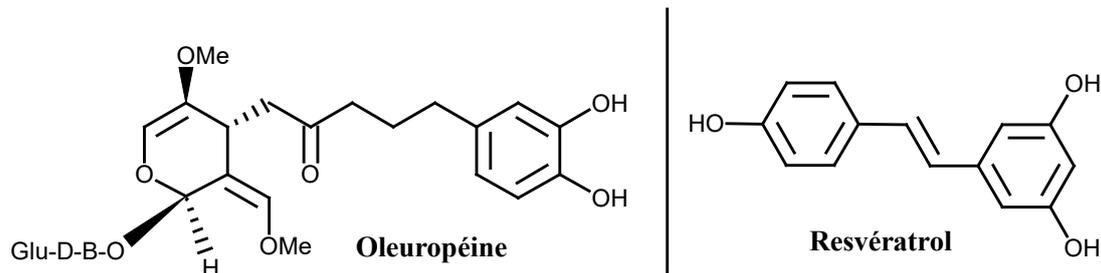


Figure 17: Structure de l'oleuropéine et du resvératrol

2.2.2-les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de composés naturels très important. Ils sont présents dans toutes les plantes vasculaires et on en a identifié au moins 4000. Ils sont responsables des couleurs variées des plantes et des fruits. Ils font partie de notre alimentation et leur absorption alimentaire journalière est d'environ 1 g, loin devant la vitamine E et les caroténoïdes (Hertog, M et al, 1993).

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Crozier A. (2003)). Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits et thé ...).

2.2.2.1-Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Bruneton, J, 1999). La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (Williams et Grayer, 2004).

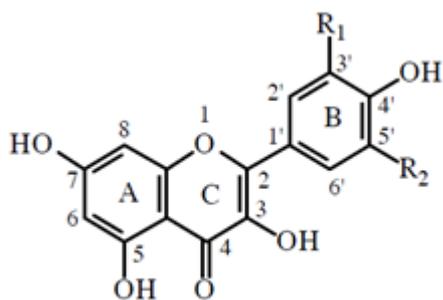


Figure 18 : Squelette de base des flavonoïdes (Kumar. S., et Pandey.A. K., 2013)

2.2.2.2-Les différentes classes des flavonoïdes :

Les flavonoïdes comprennent plusieurs milliers de molécules regroupés en plus de dix classes, qui diffèrent par leur structure chimique (Williams et Grayer, 2004) flavanols, flavones, flavanones, flavonols, isoflavones, anthocyanidines (Pascale. S, (2006) et Kumar. S., et Pandey.A. K., (2013)

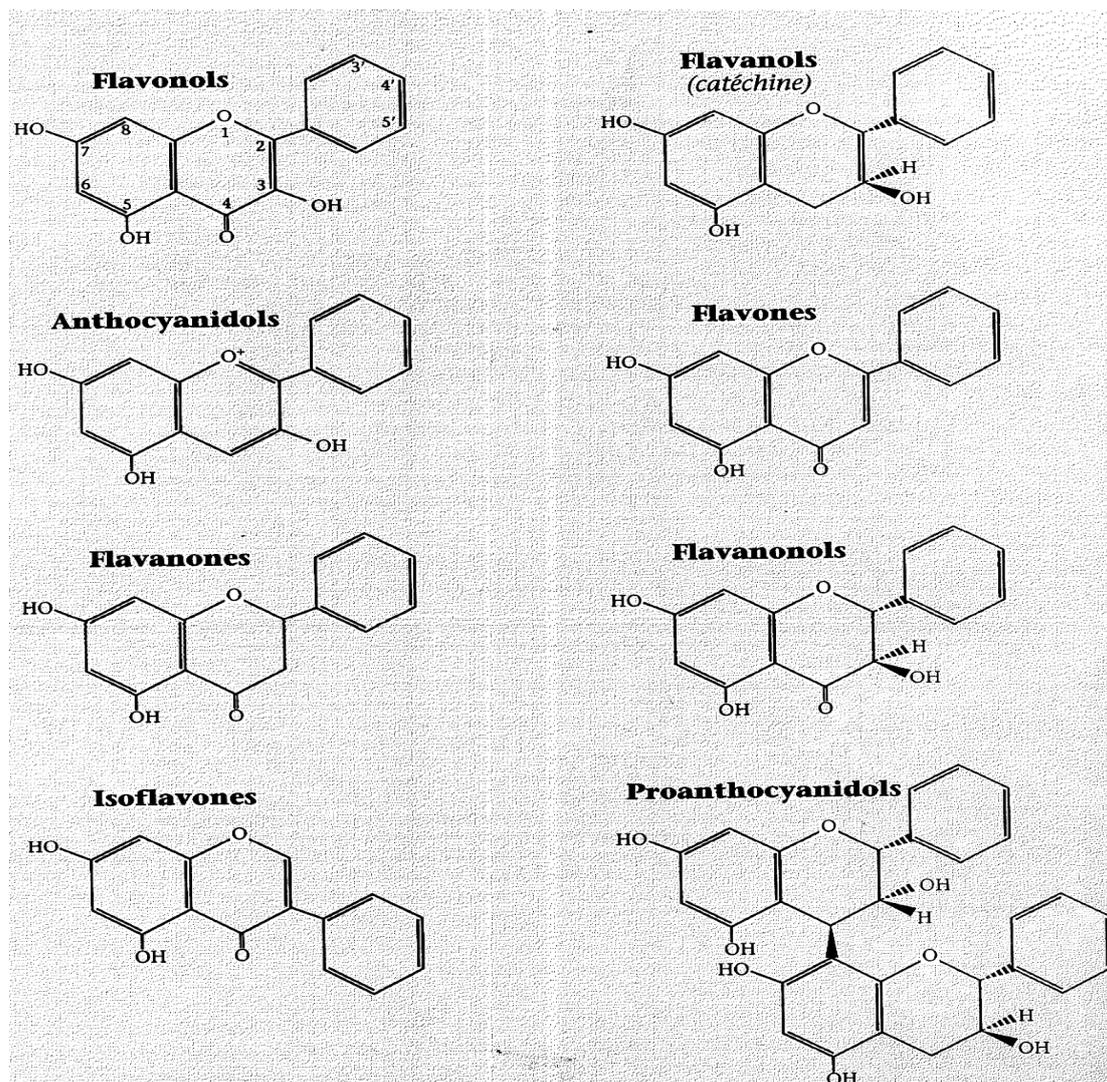


Figure 19 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes (Besançon. P, 2000).

2.2.2.2.1- Flavones et flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3 (Figure 7). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et L-arabinose (Hertog M.G.L., et al ., 1992). Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraîche) (Fossen T. et al,1996) et (Manach C. 1998), le poireau, le chou et les baies tel que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) (Hakkinen S.H., 1999). Le thé contient aussi des flavonols à hauteur de 45 mg/L (Hertog M.G.L.,1993).

Tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent généralement trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (**Figure 8**).

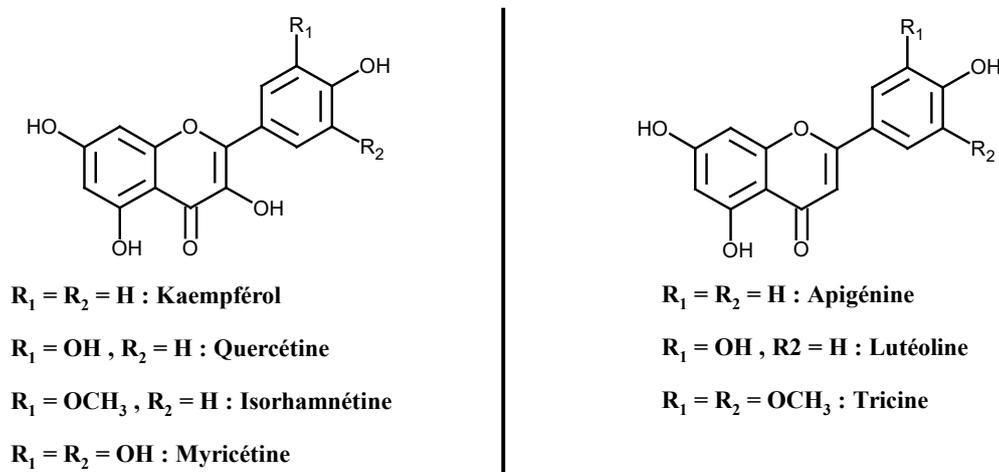


Figure 20 : Structure des Flavones et flavonols (Crozier A. (2003)).

Dans plus de 90% des cas, le **noyau A** des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables : les groupements hydroxyles peuvent être libres ou méthylés, ou impliqués dans une liaison glycosidique.

Le **noyau B** est monosubstitué dans 80% des cas en position 4', ou disubstitué en positions 3' et 4', ou trisubstitué (moins fréquemment) en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes OH ou OMe. Les positions 2' et 6' ne sont qu'exceptionnellement substituées.

Le **noyau C** peut être substitué par un groupement OH, OMe ou O-Gly.

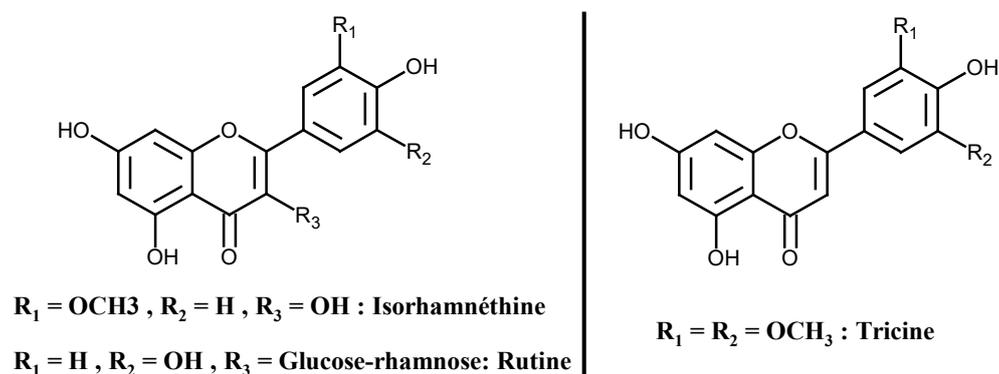


Figure 21 : Structures chimiques de flavonols

2.2.2.2.3–Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères, (+)-catéchine et son isomère (–)-épicatéchine, jusqu’aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés par l’acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatéchine gallate, épigalocatéchine, épigalocatéchine gallate) (**Figure 9**) (**Chira K. et al , 2008**). Les catéchines sont présentes dans le chocolat (jusqu’à 132,4 mg/kg de matière fraîche de chocolat noir), le thé (jusqu’à 120 mg du thé noir de Chine) et dans les fruits comme l’abricot (**Arts I.C.W.et al, 2000**).

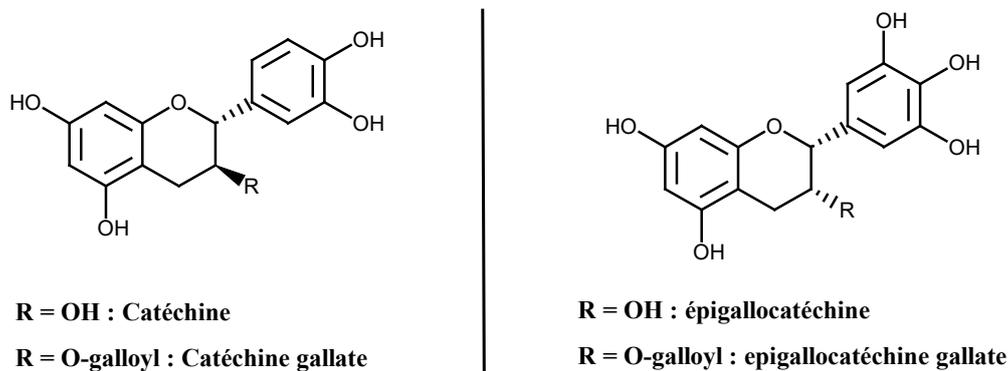


Figure 22 : Structures chimiques de certains flavan-3-ols (Chira K. et al , 2008).

2.2.2.2.1-Flavanones et flavanonols

Les flavanones sont caractérisées par l’absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d’un centre de chiralité en C2 (**Bruneton J. (2008),et (Chira K. et al , 2008)**). Les flavanonols (encore appelés dihydroflavonols) se distinguent des flavanones par l’hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé regroupant les flavones et flavonols. Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l’ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l’hespéritine dans l’orange (**Figure 10**) (**Manach C. et al ,2004**).

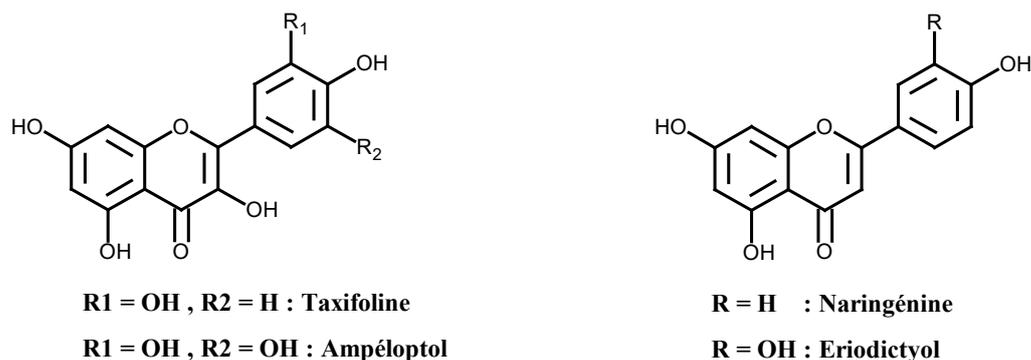


Figure 23 : Structure chimique des flavanones et falvonols (Crozier A. (2003)).

2.2.2.2.2-Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols

À la différence des flavanones et des flavanonols, ces deux groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4 (Figure 9).

Les flavan-3-ols (appelés aussi les catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en C2 et C3. Chaque composé peut alors exister sous forme de quatre stéréoisomères optiquement actifs : (+)-catéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, (-)-épicatéchine. Le premier et le quatrième sont les formes les plus répandues (Haslam, 1982, 1975).

Les flavan-3,4-diols se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4

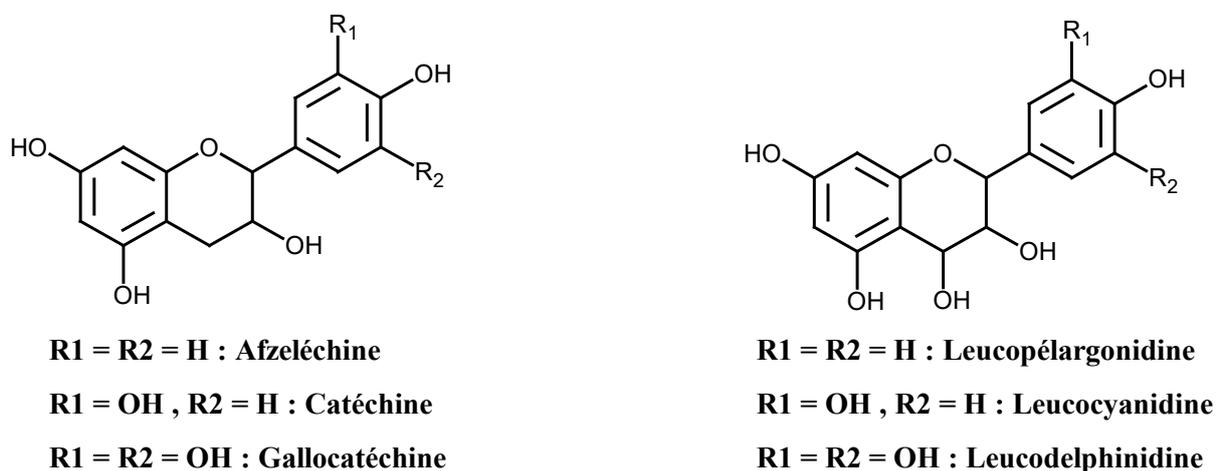


Figure 24 : Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols

2.2.2.3. Isoflavonoïdes

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavonoïdes dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses.

Les isoflavonoïdes sont des isomères des flavonoïdes. Elles sont caractérisées par le fait que le cycle B est attaché au cycle C en position 3 plutôt qu'en position C2 (**figure 12**). (**Crozier et al., 2008**).

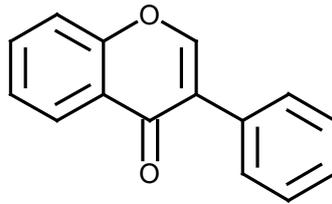


Figure 25 : Structure d'un squelette de base des isoflavones

Les isoflavonoïdes possèdent un squelette flavonoïde réarrangé. Une variété de modifications structurales de ce squelette conduit à une grande classe de composés qui comprend les isoflavones, les isoflavanones et la roténone. Les isoflavonoïdes sont des composés spécifiques de la famille des Fabacées (**Crout et Geissman, 1969**). Ces composés présentent des activités oestrogénique, insecticide et antifongique (**Rivera-Vargas et al., 1993 et Corwell, 2004**). Cependant certains isoflavonoïdes sont des poisons puissants (Boue, S. et al, 2008).

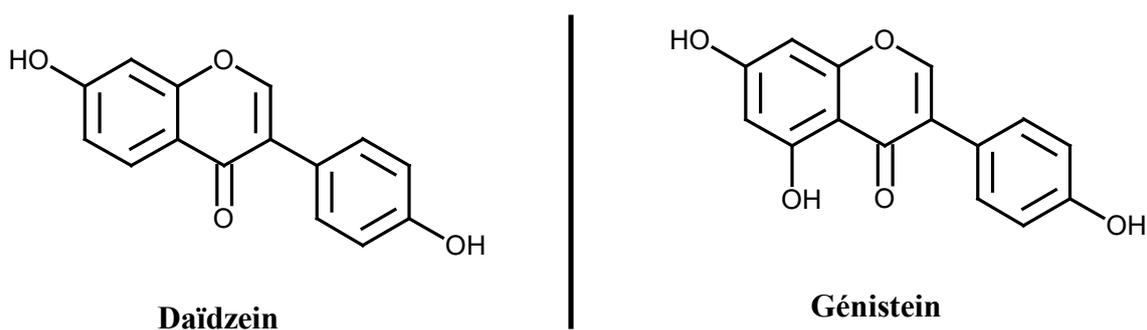


Figure 26 : Structure de quelques isoflavonoïdes

2.2.3– Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont des effets bénéfiques à la fois chez les plantes et chez les animaux. Un aperçu non exhaustif des principales propriétés des flavonoïdes est proposé ci-après. De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques (**Hertog. G, 1994**).

Les flavonoïdes sont présents dans de très nombreuses espèces végétales, dans les feuilles, les fleurs, le pollen et les fruits. Leur concentration augmente avec l'exposition au soleil, constituant de ce fait un écran protecteur contre les rayonnements ultraviolets (**larsson. S, 1988**).

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (**Fuhrman. B et al, 1995**), en stabilisant les radicaux peroxydiques, mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives comme l'ion superoxyde, le radical OH, ou l'oxygène singulet, Inhibe la lipoxigénase ou encore chélate les métaux (**Pascale. S, 2006**).

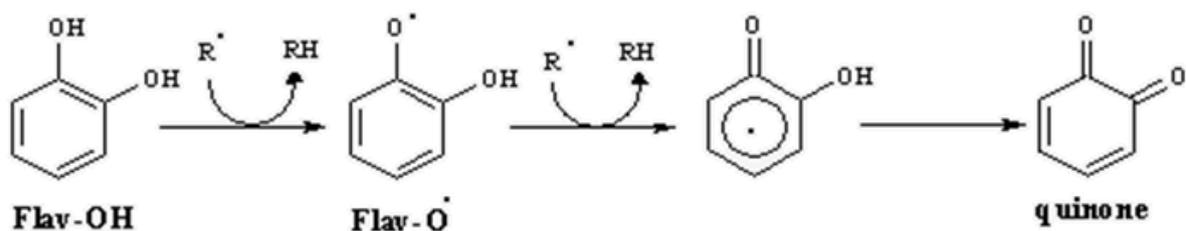


Figure 27 : Piégeage des ERO (R·) par les flavonoïdes (Jovanovic. S.V et al, 1998).

La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés. La figure 15 résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- un noyau catéchol sur le cycle B,
- les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C,
- (les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (**Van Acker et al, 1996**).

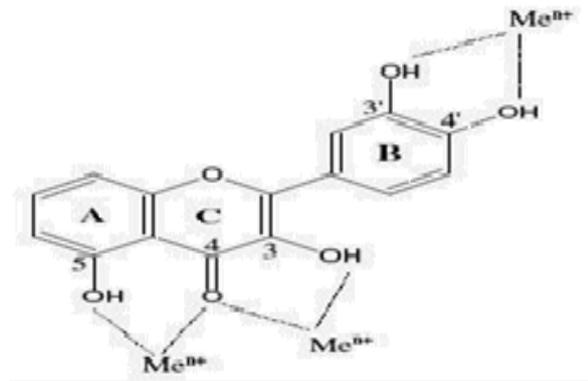


Figure 28 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (M^+) (Van Acker et al, 1996).

L'une de leurs fonctions indiscutables est leur rôle de protection des végétaux contre les invasions microbiennes. Ceci n'est pas seulement le fait de leur présence dans les plantes en tant que constituants, mais aussi celui de leur accumulation comme phytoalexines en réponse aux attaques fongiques, bactériennes ou virales. Une étude plus récente a montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram (+) et gram (-) (Zubair, M.F. 2017). Des chercheurs ont démontré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Ghedira K, (2005) (Harborne. J.B, 1994 et Harborne. J.B, 1999 et Zhu et *al.*, 2017).

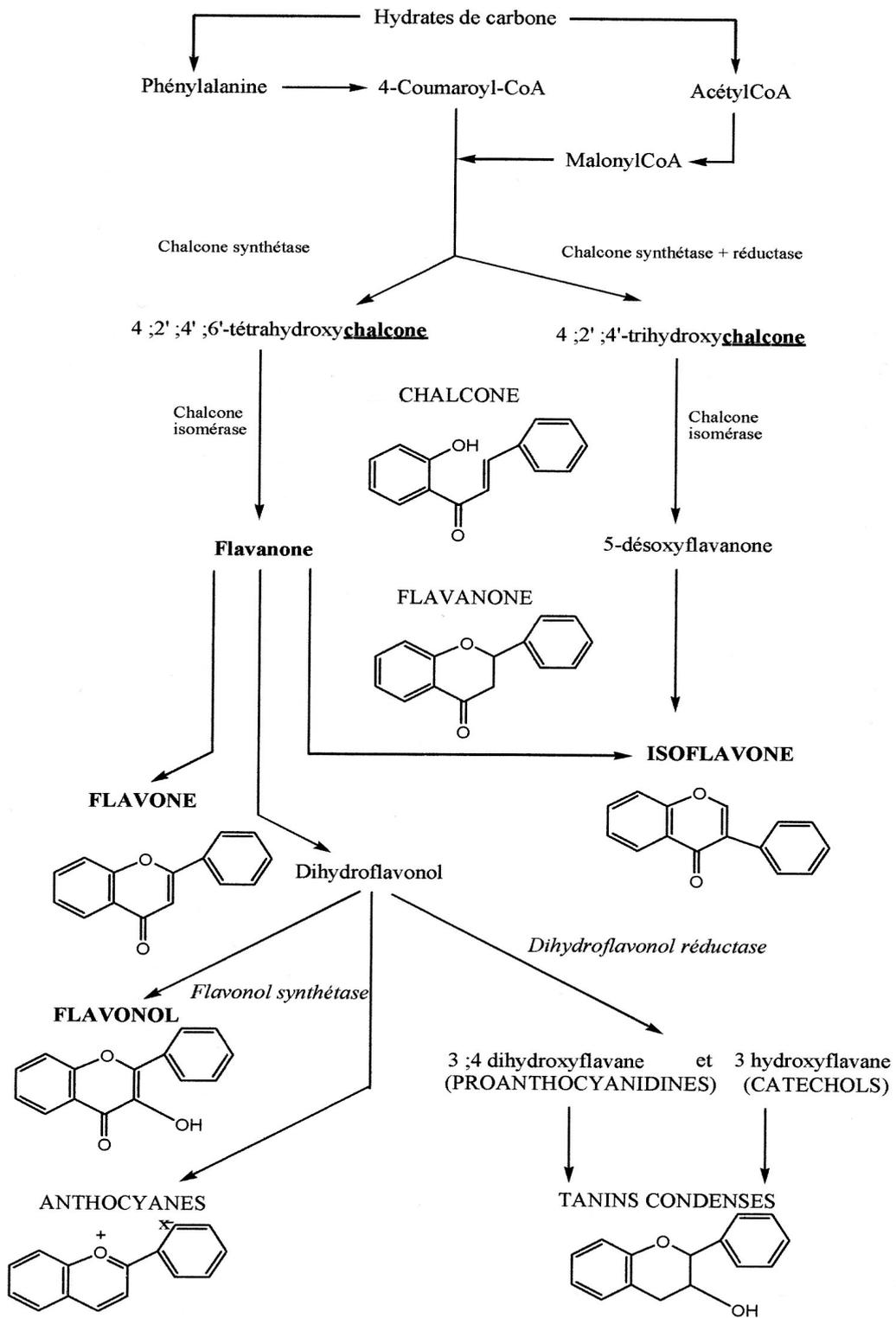


Figure 29 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy. C et al, 1996).

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires (Da Silva. E et al, 1994 ; Galati. E.M et al, 1994 ; Read. M.A, 1995), par l'inhibition d'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPC à la suite d'une inhibition des phosphodiesterases (Roengsumran. S et al, 2000). En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliquée dans l'agrégation de ces cellules ((Li et al., 2016),).

Les flavonoïdes montrent plusieurs effets biologiques antiulcéreux, anti-inflammatoires et anti hépatotoxiques. Beaucoup ont des actions antiallergiques et antivirales et certaines fournissent la protection contre les maladies cardiovasculaires. In vitro, chez les animaux de laboratoire, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées des cellules cancéreuses (Narayana. K.R et al, 2001) et (Navarro et al., 2017).

2.2.4– Biosynthèse des flavonoïdes

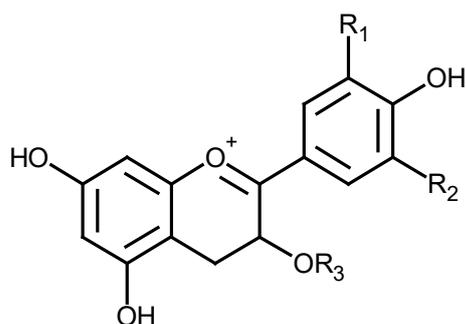
Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (**figure 16**). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavonone (naringénine) (1). Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner : flavone (apigénine) (2) ou le dihydroflavonol(3).

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol(4) ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4ols (6) et anthocyanidos (7), ce dernier sous l'action de 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanosides (8) (Marfak. A, 2003).

2.2.5– Les anthocyanes

2.2.5.1 Structure des anthocyanes

Ce sont des pigments, principalement sous formes de glycosides stables et hydrosolubles, rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin (Crozier et al., 2008). On les présente habituellement avec une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrium. Ils sont toujours glycosilés en position 3 (Ribereau. G.P, 1968 ; Brouillard. R et Dubois. J.E, 1977).

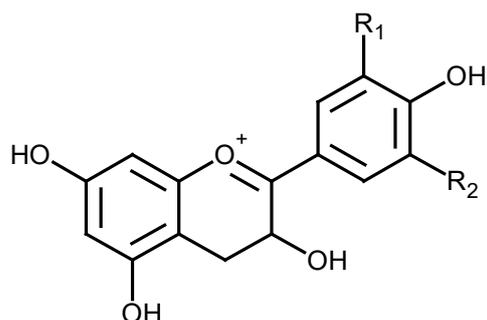


$R_1, R_2 = H, OH \text{ ou } OCH_3$

$R_3 = \text{sucre}$

Figure 30 : Structure de base commune des anthocyanes

Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (**Figure 18**) (**Harborne et Williams, 2000**). Ils sont présents dans les raisins (340-420 mg de malvidine 3-O-glucoside/L). De nombreux glucosides de cyanidine et deux dérivés de pélagonidine ont aussi été caractérisés dans l'oignon rouge (**Harborne, 2013**).



$R_1 = R_2 = H$: Pélagonidine

$R_1 = OH, R_2 = H$: Cyanidine

$R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidine

$R_1 = OCH_3, R_2 = H$: Péonidine

$R_1 = R_2 = OH$: Delphinidine

$R_1 = OH, R_2 = OCH_3$: Pétunidine

Figure 31 : Structure chimique de quelques anthocyanidines courantes.

2.2.5.2– Localisation des anthocyanes

Les anthocyanes sont généralement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques. Elles absorbent la lumière visible et sont responsables des couleurs très variées des fleurs et des fruits (**Brouillard R et Dubois J.E, 1977 ; Mclure. G.W, 1979; Harbone. J.B et Grayer. R.J, 1988; Merlin. J.C et al. 1985**).

Les anthocyanidines sont les aglycones des anthocyanes. En fait, les anthocyanes et anthocyanidines se présentent, selon le pH, sous diverses formes en équilibre : la forme cationique est responsable de la couleur en milieu acide, la forme chalcone étant responsable de la couleur en milieu basique (**Brouillard. R, 1977a, 1977b**).

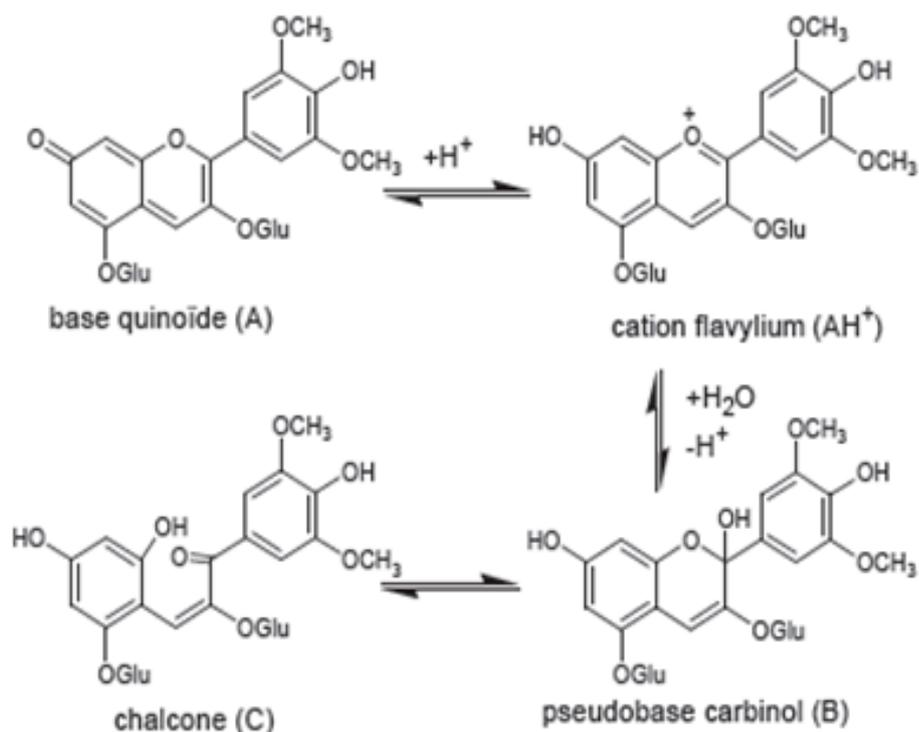


Figure 32 : Les différentes formes des anthocyanes selon le pH : Exemple de la Malvidine (Brouillard. R, 1977a, 1977b).

Tableau 7 : Les principaux anthocyanidines des végétaux (Pascale S., 2006)

R_1, R_2	Anthocyanidine	Couleur	Origine (exemple)
$R_1=R_2=H$	pélagonidine	Orange-rouge	Pélagonium rouge
$R_1=OH, R_2=H$	Cyanidine	Rouge	Pomme rouge
$R_1=OCH_3, R_2=H$	Péonidine	Rose	Pivoine rose
$R_1=R_2=OH$	Delphinidine	Bleue-violette	Mulier violet
$R_1=OCH_3, R_2=OH$	Pétunidine	Violette	Pétunia violet
$R_1=R_2=OCH_3$	malvidine	mauve	Mauve

Le rôle de la couleur peut s'avérer significatif comme c'est le cas chez certaines fleurs dont la couleur bleue due à la delphinidine est un des atouts privilégiés pour attirer les abeilles pollinisatrices (Harborne. J.B, Williams. C.A, 2000).

2.2.5.3 – Propriétés des anthocyanes

On attribue aux anthocyanes de nombreuses propriétés biologiques :

- Des études ont montré des effets intéressants d'anthocyanes de myrtilles en ophtalmologie. En fait, les anthocyanines sont utilisées lors le cas de myopie évolutive, de rétinopathie et pour améliorer la vision nocturne.
- Au niveau des maladies cardiovasculaires, les anthocyanes semblent avoir des activités anti-inflammatoires, vasoprotectrices et inhibitrices de l'agrégation plaquettaire (**Zhang et al., 2017**).
- La propriété des anthocyanes à diminuer la fragilité et la perméabilité capillaire est commune à la classe des flavonoïdes et a été identifiée sous le terme de vitamine P par **Szent- Gyorgi en 1936**.
- Récemment, **Ghiselli et al. (1998)** ont confirmé que des fractions d'anthocyanes pouvaient jouer un rôle d'antioxydant en inhibant l'oxydation des lipoprotéines et l'agrégation des plaquettes (**Szymanowska et al., 2015**).
- Les anthocyanes pourraient également jouer un rôle dans le traitement de tumeurs.
- Enfin comme la plupart des composés phénoliques, les extraits anthocyaniques possèdent des propriétés antibactériennes et antivirales (**Pascale S, 2006**).

2.6–Les Tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (**Doat 1978**). Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines [(**Dangles O. et al ,2000**), d'où leur capacité à tanner le cuir. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (**Linden et Lorient D. (1994)**).

2.6.1– localisation

Les tanins sont des polyphénols d'origine végétale caractérisés par leur réaction de précipitation avec les protéines les alcaloïdes et la gélatine . Ils existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (**Metche. M et Gérardin. M, 1980**). Ils sont souvent polymérisés donnant des molécules de poids moléculaires allant de 500 à 3000 (PM) (**Aguilera-Carbo A., 2008**).

2.6.2—classification des tanins

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (**Ribéreau-Gayon P. (1968)**) :

- Tanins hydrolysables (pyrogalliques)
- Tanins condensés (catéchiques ou non hydrolysables)

2.6.2.1 –Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou/et de ses dérivés l'acide digallique et en particulier l'acide éllagique (**Fengel. D, Wegener. G, 1984**). La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (**Ribereau, 1968**) (**figure 20**).

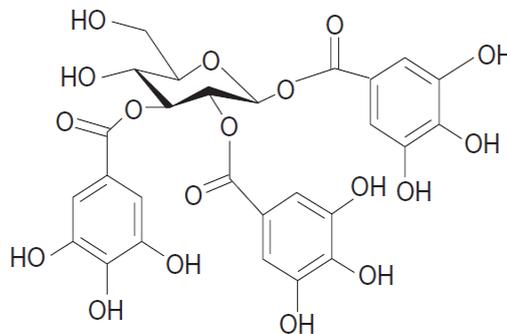


Figure 33 : Structure chimique d'un Gallotanin hydrolysable (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) (Bruyne T.,1999).

Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones ; on le rencontre notamment chez les rosidaees dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guignard, 1996**).

2.6.2.2 – Tanins condensées

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Porter et al. 1986**). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (**Guignard, 1996**).

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**). Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C₂ et C₃ et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (**figure 21**). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées). (**Roux. D.G et Evelyn. S.R, 1960**).

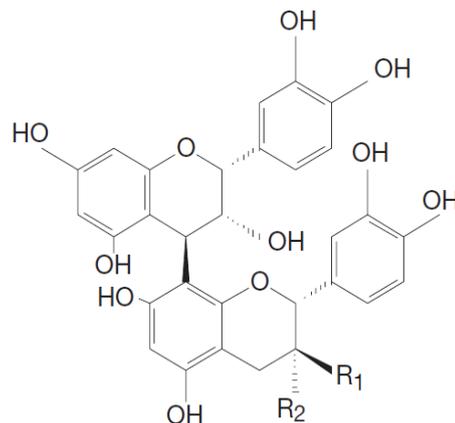


Figure 34 : Structure chimique d'un tanin condensé (Bruyne T.,1999).

2.6.3– Propriétés physico-chimiques des tannins

La solubilité des tannins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation (**Bruneton. J, 1999**). Les tannins sont également solubles dans l'acétone et les alcools, ce qui explique que l'optimum de rendement d'extraction soit généralement obtenu par des solutions acétone-eau ou méthanol-eau (**Makkar. H.P, 2000**).

Les tannins se fixent à la quasi-totalité des protéines et forment ainsi des complexes insolubles dans des conditions de pH physiologique (pH = 7 à 7,4) (**Zimmer. N et Cordesse. R, 1996**). Les tannins peuvent également former des complexes avec les acides nucléiques (**Mueller-Harvey. I et Allan. A.B, 1992**). **Labieniec. M et Gabryelak. T(2006)** ont montré que les dérivés de l'acide tannique interagissaient avec l'ADN induisant des modifications conformationnelles.

Ils ont la propriété de chélater les ions ferriques et cuivriques. Ainsi, l'acide tannique chélète les ions ferriques par ces groupements gallates ce qui limite l'absorption intestinale du fer non-hémique (**Hagerman. A.E, 2002 et Okullo JBL, 2010**).

Les tanins condensés sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigment rougeâtre et pour cette raison, ils sont dénommés « proanthocyanidines » (Pascale. S, 2006).

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, dattes etc...) et de certaines boissons (cidre, thé, etc...). (Roux. D.G et Evelyn. S.R, 1960). Certains auteurs ont trouvé pour la variété Deglet- Nour que le taux est 16,66 ug/ml d'acide tannique, au stade Tmar, cette teneur reste faible par rapport à celle notée par Yahiaoui, (1999) (70 ug/ml d'acide tannique).

3 – Stress oxydant et espèces réactives oxygénés

Récemment le monde scientifique commence à s'intéresser de plus en plus à l'importance et l'implication du stress oxydatif dans le développement de nombreuses pathologies humaines (cancer – maladies cardiovasculaires. (Descheemaeker. K et al, 2009).

En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques (Favier A. (2003) et Baudin B. (2006)), indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neuro-dégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Philippe Tacchini et Alice Neequaye, 2010).

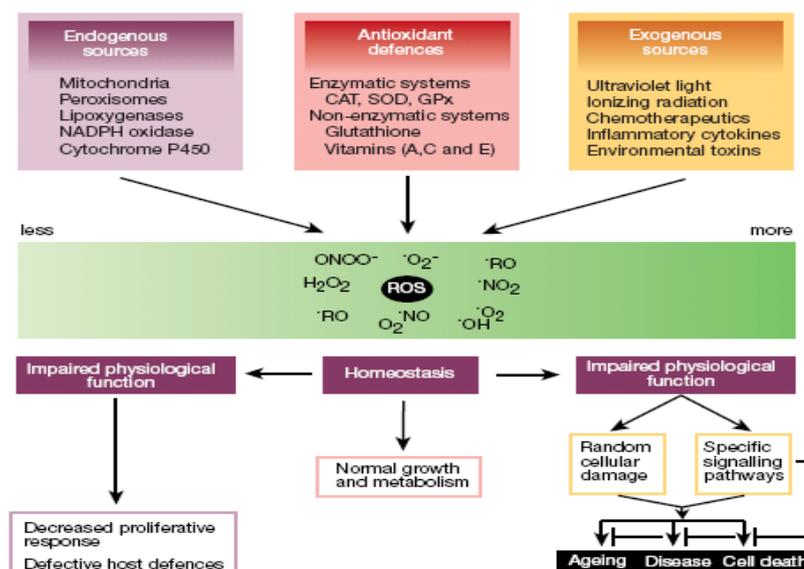


Figure 35 : Vue globale du stress oxydant (Borg. J et al, 2004)

En plus des chercheurs du monde biologique et médical ont orienté leur curiosité conception en situation de stress oxydant où elle est connue comme une agression biologique de notre organisme par des molécules toxiques. Le stress oxydant se définit comme un état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées ERO (les radicaux libres) et les défenses de l'organisme (les antioxydants) (**figure 23**). Ces radicaux libres sont responsables de nombreux désagréments, et de nombreuses maladies (**Delattre, J., Beaudoux J.-L, et al. (2005)**).

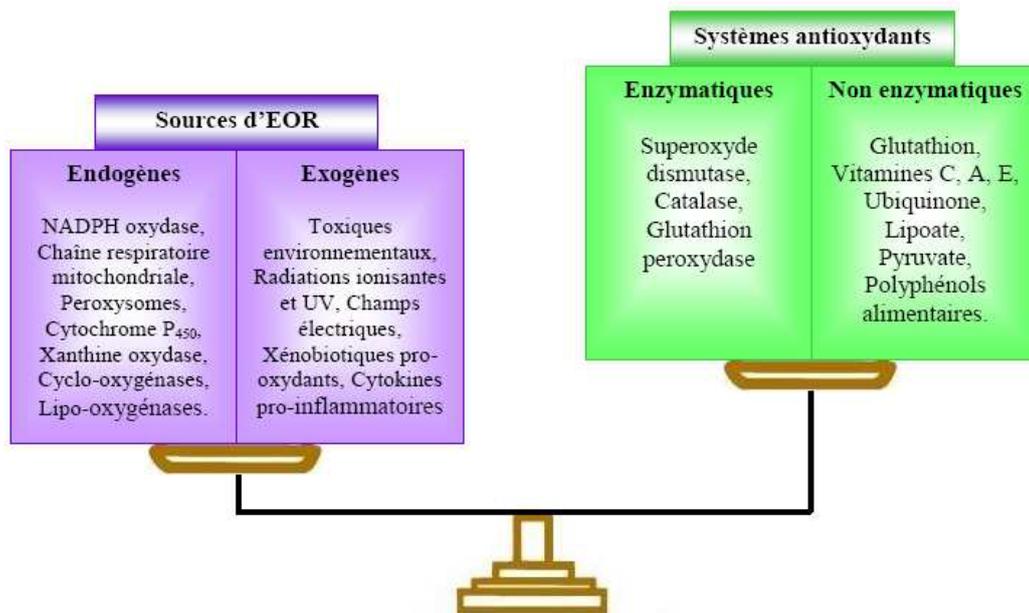


Figure 36 : Déséquilibre de la balance entre radicaux libres et antioxydants

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente :

- Excès des espèces réactives d'O₂, N₂ ou Cl₂
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes)
- Mécanismes de réparation insuffisants

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique mais alors qu'un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré. (**Tessier F., Marconnet P. (1995).**)

3.1– Les radicaux libres

Un radical est une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur ses orbitales électroniques externes. La présence d'un électron célibataire confère souvent à ces molécules, une grande instabilité, elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux

composés dans des processus le plus souvent non spécifiques. Ce caractère chimique rend les radicaux libres fortement réactifs. La réactivité varie d'un radical libre à un autre et dépend de l'environnement où ils sont présents. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO) (espèces réactives oxygénées) sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène (Gilbert D.L., Colton C.A. 1999).

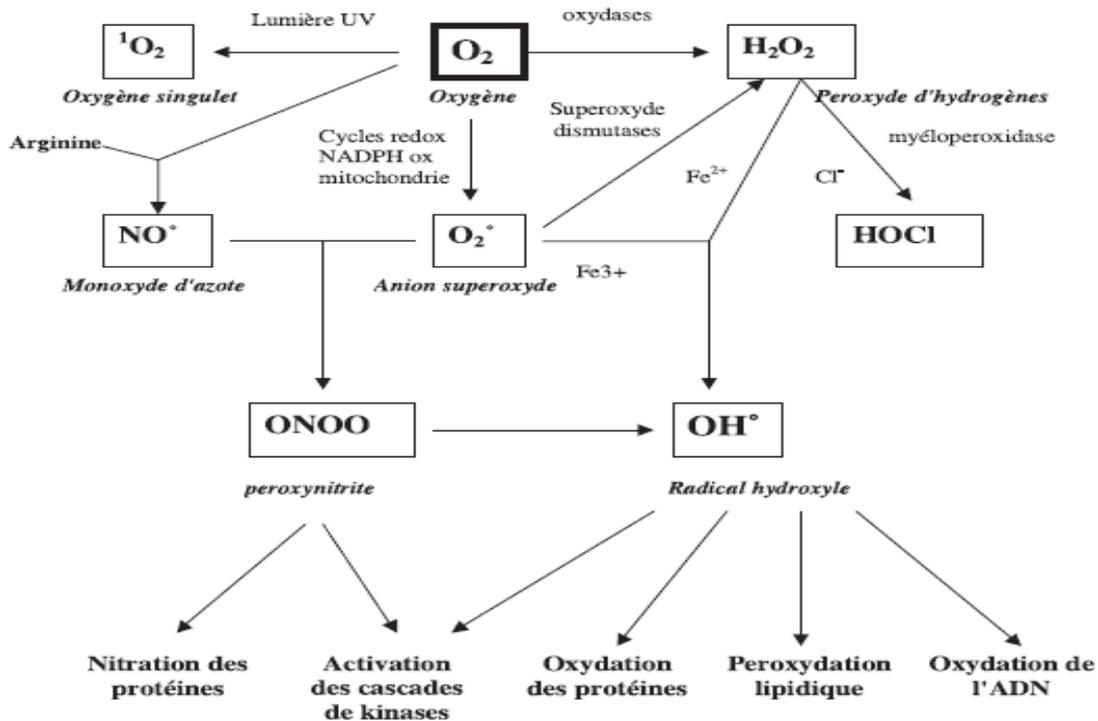


Figure 37 : Sources des différentes espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie (Favier.A, 2003).

Si l'instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. Le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne (Afonso V., 2007). Les conditions mises en jeu pour donner des radicaux sont souvent drastiques : hautes températures, radiations ionisantes, ultraviolets. Ces substances peuvent peroxyder les lipides insaturés qui composent les structures membranaires et peuvent alors tuer la cellule. Le remplacement de la cellule oblige l'organisme à activer ses cellules-souches, ce qui augmente le risque de cancérisation. Ceci contribue aussi à un vieillissement accéléré de l'organisme, les cellules-souches ne pouvant éternellement se multiplier « limite de Hayflick ». (Halliwell et Whiteman, 2004).

Les radicaux libres les plus importants dans le système biologique sont les espèces réactives de l'oxygène, ces derniers incluent non seulement les radicaux centrés sur l'oxygène comme le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) mais aussi certains dérivés de l'oxygène non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) tel que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux ($HOCl$), qui sont des agents oxydants et / ou sont facilement convertis en radicaux libres (Tableau 6). Un terme similaire, les espèces de l'azote réactif, devient également largement utilisé (Halliwell, 2001).

Tableau 8 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

Les espèces réactives de l'oxygène	
Radicalaires	Non radicalaires
Superoxide ($O_2^{\bullet-}$) Hydroxyl (OH^{\bullet}) Peroxyl (RO_2^{\bullet}) Alkoxyl (RO^{\bullet}) Hydroperoxyl (HO_2^{\bullet})	le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) l'oxygène singulet (1O_2) l'acide hypochloreux ($HOCl$) Ozone (O_3) l'acide hypobromeux ($HOBr$)
Les espèces réactives de l'azote	
Radicalaires	Non radicalaires
Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) Le dioxyde d'azote (NO_2^{\bullet})	L'acide nitreux (HNO_2) Le cation nitrosyle (NO^+) L'anion nitroxyle (NO^-) Peroxynitrite ($ONOO^-$) l'acide peroxynitreux ($ONOOH$) Peroxynitrites alkyle ($ROONO$)

Les radicaux libres sont très instables, leur durée de vie est très courte (10^{-4} seconde). Leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de réappairier leur électron célibataire; elle entraîne la propagation du phénomène par création d'un nouveau radical. Dans les milieux vivants, la diffusion du processus est limitée par la compartimentation tissulaire.

D'une manière générale, la fin de la réaction en chaîne peut se produire :

- Par la recombinaison des radicaux entre eux :



Ceci est possible s'il s'agit de chaînes organiques contenant uniquement des liaisons saturées, par l'intervention de systèmes antioxydants entraînant le piégeage des radicaux libres. Il s'agit d'enzymes (superoxyde dismutases, catalase, peroxydases) et de polyphénols telle que la quercétine. Ces systèmes antioxydants ont une action membranaire ou intracellulaire (**Hadi.M, 2004**).

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes physiologiques tant endogènes qu'exogènes et sont utiles pour l'organisme à faibles doses. Nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées et parfaitement maîtrisées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux (**Favier. A, 2003**).

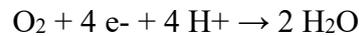
La formation des radicaux libres dans l'organisme doit être considérée comme un phénomène normal et maîtrisable dans un organisme sain. Il existe dans les leucocytes et les macrophages une production adaptée de radicaux libres qui leur sert à détruire les bactéries du fait de leurs activités bactéricides. Au cours de processus immunologique intensif, des radicaux libres peuvent notamment être libérés en plus grande quantité par les leucocytes et les macrophages et entraîner des lésions de structure intactes (**Biesalski et Grimm. P, 2001**).

Les O_2^- peuvent eux même activé la NADPH oxydase par un rétro contrôle positif, en agissant par l'intermédiaire de la phospholipase A et de la libération d'acide arachidonique (**Dellatre. J et al, 2003**)

Dans les circonstances normales, on dit que la balance *antioxydant/radicaux libres* est en équilibre, si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant, ou par suite d'une surproduction énorme des radicaux libres (**Favier.A, 2003**), ces derniers interagissent avec toute une série de substrat biologique conduisant à l'altération de l'homéostasie de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (**Favier. I, 2003**).

3.2 – Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène *in vivo*

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau. (Figure. 14)



Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose. Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques. En effet, les cellules convertissent 2 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène. (Ferradini, 1986).

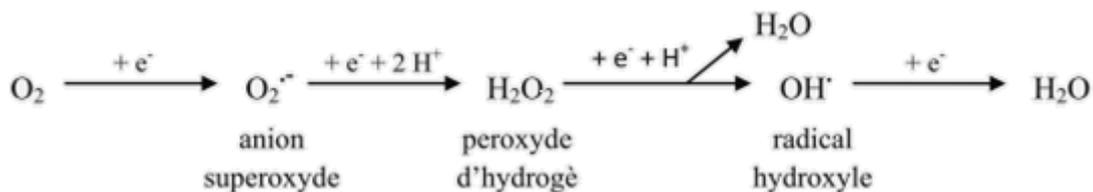
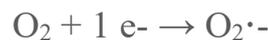


Figure 38 : Intermédiaires réduits de l'oxygène.

Cette réaction (réduction tétravalente) est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale. (Han *et al.*, 2003).

Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser «fuir» une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subissent une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron), conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, au niveau de l'ubiquinone ou coenzyme Q (Turrens *et al.*, 1985).



Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation :



Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ainsi formé n'est pas lui-même un radical libre mais une molécule ayant tous ses électrons périphériques appariés. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxyosomes) et les glutathions peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol).

La majeure partie de la toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle ·OH en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ « réaction de Fenton » ou Cu⁺ (**Wardman et Candeias, 1996**). Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques.



En réalité, la toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte. En effet, en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, les radicaux O₂^{·-} peuvent donner naissance à des radicaux ·OH selon la réaction de Haber Weiss :



Ou bien encore, en réagissant avec des radicaux ·NO (monoxyde d'azote), conduire à l'apparition de peroxy-nitrites :



Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs des espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

3.3– Les antioxydants

Une molécule antioxydante est définie, comme une substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative (**Halliwell, 1991**).

Pour réguler ces réactions d'oxydation, l'organisme a ses propres systèmes de défense antioxydante. Parmi eux, les systèmes enzymatiques, notamment les superoxydes dismutases, les catalases et les glutathions peroxydases, sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques regroupent quant à eux le glutathion, l'acide urique, le coenzyme Q10 et l'acide lipoïque. En outre, plusieurs études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes apportée par l'alimentation, dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant (**Frankel *et al.*, 1993**). Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de vitamines (vitamine C, vitamine E), de composés phénoliques, d'oligo-éléments et de caroténoïdes (**Hertog *et al.*, 1993**).

3.3.1– Pouvoir antioxydant des vitamines dans les aliments

Une alimentation contenant suffisamment de calories et étant également riche en fruits, céréales et légumes est associée à un risque plus faible de cancers, maladies cardiovasculaires, attaques, diabète non insulino-dépendants. Des facteurs multiples contribuent à cette observation, y compris la haute teneur en antioxydant de ces régimes alimentaires (**Hollman P.C. & Katan. M.B, 1999**).

3.3.1.1– Vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leurs foies ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO (HO• ou O₂•-). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (**Haleng, Pincemail et al. 2007**).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (**Retsky, Chen et al. 1999**). La vitamine C est indispensable pour prévenir le scorbut en servant de cofacteur pour plusieurs enzymes; elle possède également des propriétés antioxydantes. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs des ERO. Lors de son oxydation en acide

déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyle), qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Mak, Egri et al. 2002**).

Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme, situés dans les lipoprotéines et dans les membranes (**Delattre, Beaudoux et al. 2005**). Lors de la peroxydation lipidique, elle va permettre l'inhibition de l'étape de propagation, et ainsi assurer un rôle de protection des membranes contre l'oxydation lipidique (**Herrera et Barbas 2001**).

3.3.1.2. Vitamine E

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols et les tocotriénols. D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' α -tocophérol et le γ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxyde (ROO•) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique (**Haleng, Pincemail et al. 2007**).

La vitamine E est un puissant antioxydant qui protège les lipides contre les lésions des radicaux libres et constitue l'antioxydant le plus important contenu dans les lipides des BLP (**Joseph. J.A et al, 1998**). De plus Les antioxydants interagissent entre eux, la vitamine E associée à la vitamine C peut inhiber la lipoperoxydation mieux que la vitamine E seule (**Joseph. J.A et al, 1999**).

3.3.1.3– Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène et le lycopène. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet (**Causse et Renard 2008**).

Sont des pigments issus des plantes et microorganismes. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O₂•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (**El-Agamey, Cantrell et al. 2004**).

Les caroténoïdes sont les puissants antioxydants des végétaux et un grand nombre d'entre eux constituent une source de vitamine A chez l'homme. Des études ont conclu que

manger plus de végétaux diminuait les niveaux de dommages oxydatifs (**Youdim. K.A et al.,2000**).

3.3.1.4 – Pouvoir antioxydant des oligo-éléments dans les aliments

3.3.1.4.1–Le sélénium

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. La dose journalière recommandée est de 5070 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail... (**Kouassi1 . J.B. , 2013**).

3.3.1.4.2– Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) et peut , lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son l'avoine, le seigle, le foie de veau (**Kouassi1 . J.B. , 2013**)

3.3.1.4..3 – Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'EOA induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg (**Nkhili E. , 2009**).

4 - Pouvoir antioxydant des polyphénols dans les aliments

En tant qu'antioxydants, tous les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.). Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que cancers, maladies cardio-vasculaires ou ostéoporose. Ils ont aussi des propriétés spécifiques (affinité pour des récepteurs cellulaires comme les récepteurs des estrogènes, impact sur la signalisation cellulaire) qui induisent des réponses cellulaires très diverses. La somme de ces effets se traduit par des effets santé que l'on commence tout juste à comprendre à travers les expérimentations animales et cliniques.

Les polyphénols sont généralement de puissants antioxydants; Ils ont ainsi la capacité de protéger les végétaux contre les effets néfastes des radicaux libres générés en réponse aux polluants, infections, rayonnements UV etc. D'autres sont également de bons inhibiteurs d'enzymes ou sont reconnus pour leurs propriétés antiseptiques ou anti-inflammatoires.

Les flavonoïdes sont susceptibles de neutraliser les radicaux libres, d'exercer un rôle de protection cardio-vasculaire et de favoriser l'élimination de substances toxiques.

En raison de leur abondance dans les plantes consommées par l'homme et de leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes font l'objet d'une attention croissante. Que ce soit pour l'étude des relations structure-activité, le contrôle de la qualité alimentaire ou le suivi de l'absorption et de la métabolisation de ces composés phénoliques naturels. **(Perron et Brumaghim, 2009)**

Les antioxydants d'origine alimentaire contribuent vraisemblablement à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences. A ce titre, les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important.

La structure des polyphénols végétaux, leur confère une activité antioxydante aussi importante que celle de la vitamine C et la vitamine E. Leur mode d'action est une combinaison de réactions chimiques (chélation de métaux, la donation d'hydrogène ou d'électron) qui interrompt les réactions d'oxydation de molécules, comme l'ADN les lipides ou les protéines, en formant des radicaux plus stables, et donc qui aboutit à une diminution des teneurs en radicaux libres **(Pascale. S, 2006)**.

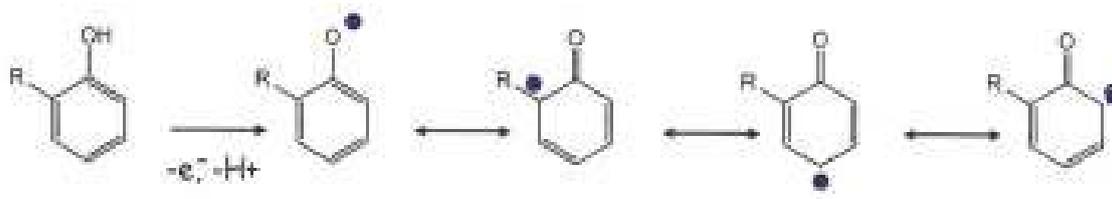


Figure 39 : Stabilisation du radical phénolique (Pascale. S, 2006).

4.1.2 - Propriétés chimiques des polyphénols

Dans ce paragraphe, il s'agira de décrire brièvement et sans être exhaustif les principales propriétés chimiques et physico-chimiques des composés phénoliques en les illustrant prioritairement par des exemples se rapportant aux principaux polyphénols de la pomme discutés précédemment. En résumé, les composés phénoliques sont des molécules ayant des propriétés réductrices, des propriétés nucléophiles, des propriétés acides (faible), et parfois des propriétés de chélation de métaux. Certains composés se voient aussi attribuer des propriétés dites « tannantes » qui reflètent leur capacité à interagir en milieux aqueux avec des protéines pour former des complexes plus ou moins réversibles.

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6. L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomères.

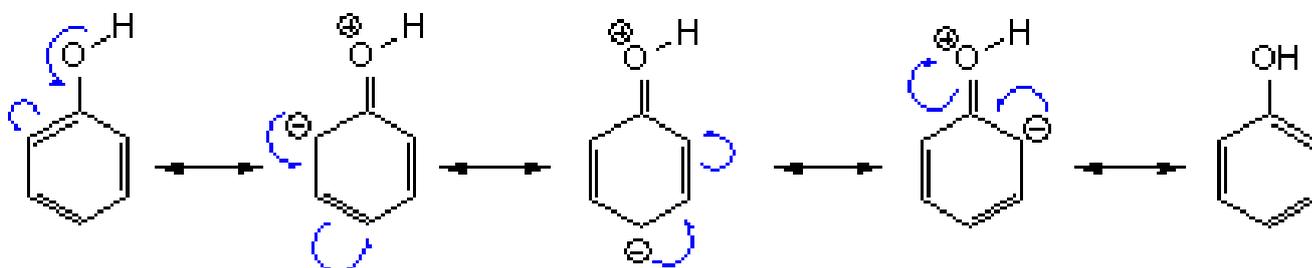


Figure 40 : Formes mésomères du phénol.

De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques suivantes que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

4.1.2.1 - Nucléophilie et électrophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH (suite à l'effet (+M)). Cette propriété est à l'origine des réactions de substitutions électrophiles aromatiques (alkylation, acylation, etc.) régiosélectives des positions ortho et para. Les substituants de type 1,3-dihydroxy (résorcinol) et 1,3,5-trihydroxy (phloroglucinol) permettent une accumulation de densité électronique sur les sommets C2, C4 et C6 (tous *ortho* ou *para* des groupements OH), accentuant ainsi le caractère nucléophile.

Le cycle A des flavanols (catéchines et procyanidines) possède deux centres C6 et C8 fortement nucléophiles car en *ortho* et en *para* de trois groupements OH ou OR à effet (+M).

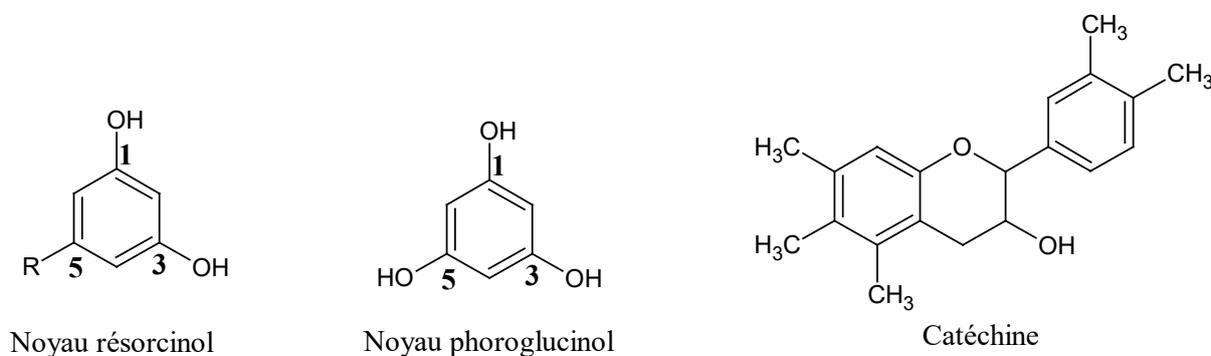


Figure 41 : Sites nucléophiles sur les noyaux résorcinol et phloroglucinol et extrapolation sur la molécule de catéchine

Le noyau A est également activé par le groupement carboné saturé en C4. Cette nucléophilie permet des réactions de substitutions électrophiles aromatiques qui peuvent par exemple intervenir lors de la production du thé noir. (Figure 23).

A l'inverse des phenols, les *o*-quinones formées par oxydation présentent un déficit électronique responsable de leur caractère électrophile qui se manifeste sur plusieurs positions du cycle comme l'illustrent les formes mésomères possibles (Figure 24).

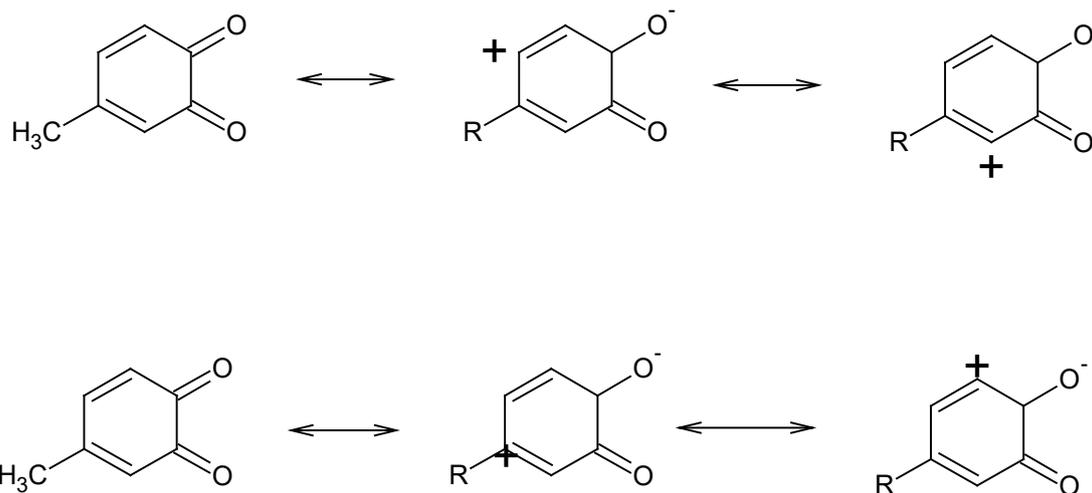


Figure 42 : Formes mésomères d'une *o*-quinone

Dans les conditions permettant l'oxydation des phénols et en particulier des *o*-diphénols, ces derniers, dotés de leur caractère nucléophile se trouvent en présence d'*o*-quinones électrophiles. Les conditions sont alors favorables à des réactions d'additions parmi lesquelles la réaction d'addition de type Michael apparait souvent privilégiée.

Ces réactions d'addition de Michael sont par exemple responsables de la formation d'une structure de type biaryle dans le cas d'un couplage oxydatif entre une *o*-quinone, résultant de l'oxydation d'un catéchol, avec le phloroglucinol ou avec une molécule contenant un noyau de ce type, tel qu'on peut le trouver dans la catéchine (Poupard et al., 2008) (Fig27).

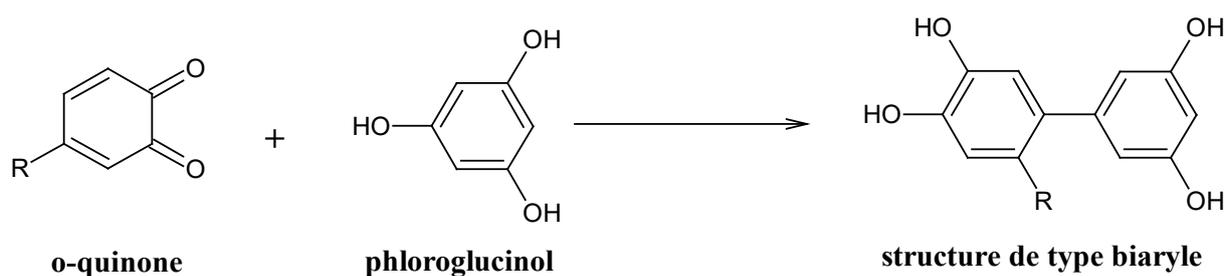


Figure 43 : Formation d'une structure de type biaryle par couplage oxydatif issu de l'addition de Michael entre une *o*-quinone et un noyau phloroglucinol

Les additions radicalaires sont aussi des voies réactionnelles possibles, impliquant notamment les espèces semi-quinones. Dans ce cas, des structures de type biaryléther sont potentiellement formées. Ceci a été observé en solution modèle d'oxydation enzymatique de (+)-catéchine avec la formation de certaines déhydrodicatéchines de type B (Guyot et al., 1996).

4.1.2.2 - Propriétés réductrices

Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. Dans le cas d'un phénol ArOH, le radical-cation formé est un acide fort qui se déprotone aussitôt pour conduire à un radical phénoxy ou aryloxy $\text{ArO}\cdot$ (Spiteller G. (2006)).

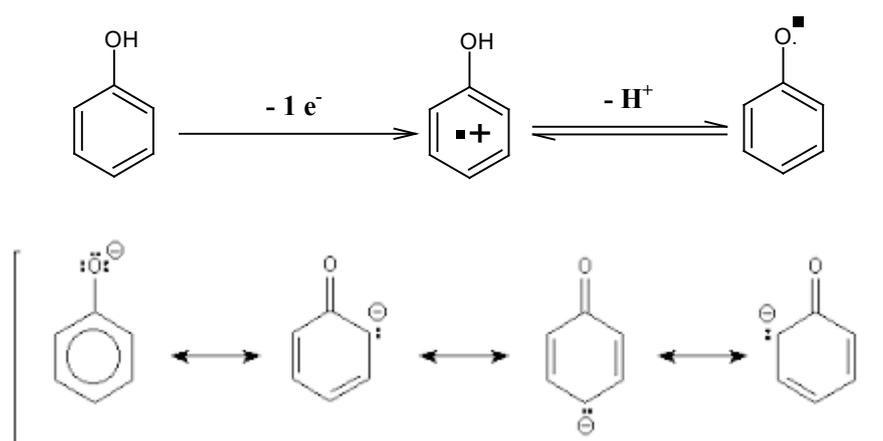


Figure 44 : Oxydation mono-électronique d'u phénol et et stabilisation du radical aryloxy formé par ses formes mésomères.

Le radical aryloxy ($\text{ArO}\cdot$) peut être formé directement par transfert d'hydrogène phénolique vers un radical de haute énergie telle que les radicaux oxyl ($\text{RO}\cdot$) et peroxy ($\text{ROO}\cdot$) formés par exemple au cours de l'autoxydation des composés polyphénoliques (Halliwell B., Chirico S. 1993).

L'oxydation des composés phénoliques est la conséquence de leur action réductrice. L'oxydation des composés phénoliques concerne d'abord les composés présentant dans leur structure des noyaux phénoliques de type *o*-diphénol (ou catéchol) qui sont de plus forts réducteurs.

L'oxydation monoélectronique d'un catéchol conduit alors à un radical aryloxy correspondant à une semi-quinone. Par perte d'un électron ou par dismutation, les radicaux semi-quinones conduisent à la formation d'*o*-quinones qui sont elles aussi des espèces très réactives.

Dans les modèles alimentaires de transformation de la matière végétale fraîche, par exemple lors du broyage et du pressage des pommes, la formation des *o*-quinones directement à partir

des *o*-diphénols, en présence d'oxygène, est largement catalysée enzymatiquement par l'activité polyphénoloxydase.

Cependant, sans ce recours à une activité enzymatique mais sur des cinétiques plus lentes et simplement du fait de la présence d'oxygène dans le milieu, les espèces semiquinones et quinones peuvent se former lorsque les conditions sont favorables. On parle alors d'autoxydation des polyphénols. L'autoxydation est favorisée par les pH plus élevés et la présence de métaux de transition (Fe(II)/Fe(III) et Cu(I)/Cu(II)), même sous forme de traces.

4.1.2.3 - Liaison hydrogène

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité). Par exemple, en donnant une liaison H, le phénol allonge sa liaison OH. Cet état de prédissoiation accentue la densité électronique sur le centre O et donc son caractère accepteur de liaison H.

4.1.2.4 - Acidité

La coupure hétérolytique de la liaison OH (déprotonation) entraîne la formation d'un ion phénate dans lequel la délocalisation électronique de l'atome O vers le cycle (effet +M) est fortement augmentée. Ce phénomène et la forte solvatation de l'anion phénate par formation de liaisons H avec l'eau permettent d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols dans l'eau. Les propriétés caractéristiques des phénols (nucléophilie, caractère réducteur, polarisabilité) sont amplifiées lors de la formation des anions phénates correspondants.

Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Cette exaltation de l'acidité est due à la stabilisation de l'ion phénate correspondant par délocalisation de la densité électronique vers le groupement à effet (-M). Elle peut être traduite en termes de formes mésomères.

4.1.3 - Propriétés tannantes des polyphénols

Il s'agit d'une propriété essentielle de certains polyphénols qui prennent alors le nom de tannins. Cette propriété correspond à leur aptitude à interagir en formant des complexes solubles et/ou insolubles, plus ou moins réversibles, avec la plupart des protéines. Aujourd'hui, cela inclut aussi leur capacité à s'associer à certaines structures polysaccharidiques (Le Bourvellec and Renard, 2012). De manière très simplifiée, on peut dire que ces associations sont gouvernées à la fois par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes dues au caractère polarisé et acide de la fonction phénol (donneur de liaisons hydrogènes) et à l'existence de fonctions « accepteur de liaisons hydrogènes » présentes dans la structure des protéines (fonctions carbonyles par exemple). Dans certaines conditions, des liaisons ioniques sont potentiellement impliquées mais elles ne semblent pas prépondérantes au pH des aliments, les molécules polyphénoliques étant alors peu chargées. Les propriétés tannantes ont des conséquences majeures et trouvent de nombreuses applications impliquant les polyphénols en technologie alimentaire ou dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments. Sans être exhaustif, on peut citer:

- la perception de l'astringence d'un aliment quand elle est liée à la précipitation des protéines salivaires par les tannins,
- l'amertume d'aliments due à certains polyphénols comme les procyanidines oligomères du fait de leur capacité à se lier à certains récepteurs spécifiques de la cavité buccale,
- l'instabilité colloïdale de certaines boissons en raison de complexations tannins-protéines-polysaccharides pouvant générer des troubles et précipités lors du stockage,
- l'inhibition d'enzymes utilisées en technologie alimentaire pour clarifier, stabiliser les boissons.

4.1.4 - Propriétés de copigmentation

Cette propriété ne concerne pas tous les composés phénoliques mais intéresse surtout les anthocyanes. Ces pigments phénoliques colorés, par la structure plane de leur forme cation flavylum, peuvent établir des interactions non covalentes de faible énergie de type p-p responsables d'empilements (*stacking*) au niveau des noyaux aromatiques avec d'autres motifs phénoliques. Lorsque ces derniers sont présents dans la même molécule on qualifie la copigmentation d'intramoléculaire et lorsque les interactions se font avec d'autres molécules phénoliques colorées ou non, on parle alors de copigmentation intermoléculaire et la molécule en question est appelée copigment. En outre, pour que l'on puisse effectivement parler de

phénomène de copigmentation, les interactions doivent en plus induire des modifications des propriétés optiques du pigment seul.

Ce phénomène a été particulièrement étudié dans le cas des vins rouges pour lesquels les anthocyanes et leurs potentiels co-pigments (flavonols, acides hydroxycinnamiques, et flavanols incluant catéchines et tannins condensés) sont en concentrations parfois importantes. Ce phénomène s'exprime aussi fortement dans le cas de la couleur des fleurs pour lesquelles les anthocyanes et co-pigments coexistent dans les vacuoles des cellules des pétales. En général, les conséquences d'un phénomène de copigmentation dans un vin est à la fois un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité de la couleur) et bathochrome (décalage du spectre UV-visible vers les longueurs d'onde plus élevées, donc du rouge vers le bleu) (Escribano-Bailon and Santos-Buelga, 2012). Dans une synthèse récente, Trouillas et Coll. ont revisité la question de la copigmentation des anthocyanes en confrontant les approches expérimentales et théoriques pour mieux comprendre le phénomène aux échelles moléculaires et atomiques (Trouillas et al., 2016).

4.1.5 - Propriétés Complexantes

Il s'agit là d'une autre propriété essentielle des polyphénols même si elle concerne surtout les composés présentant dans leur structure un noyau catéchol ou une fonction (C=O) positionnée de façon coplanaire à proximité d'une fonction OH (Dangles, 2006). Ces conditions sont favorables à la formation de chélates avec les ions métalliques présentant une forte charge positive (ex : Fe^{3+} et Al^{3+}), à condition de ne pas se trouver en situation trop fortement acide afin d'autoriser la substitution des protons phénoliques. Les pH des jus et des cidres, supérieurs à 3, permettent à cette complexation de s'exercer. (Figure 45)

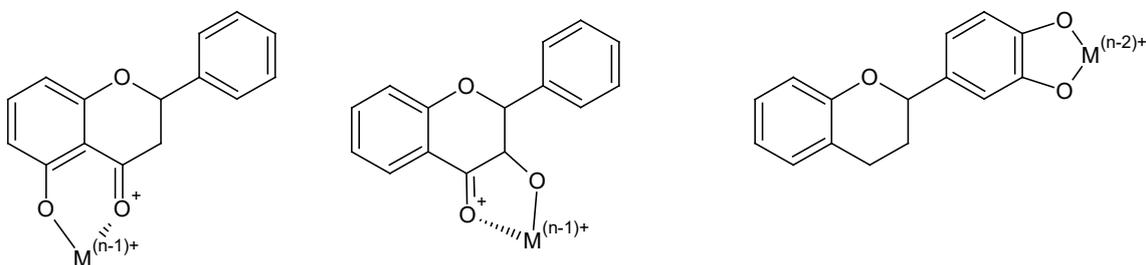


Figure 45 : Complexation métallique des flavonoïdes (Dangles, 2006)

Ce phénomène de complexation métallique avec le Fe^{3+} et Mg^{2+} est connu pour modifier et stabiliser la couleur d'anthocyanes vacuolaires dans des édifices

supramoléculaires impliquant aussi des flavones et responsables de couleurs florales bleues (Kondo et al., 1992).

La complexation métallique est également responsable de la « casse ferrugineuse » des cidres. Celle-ci se manifeste par un brunissement voire un noircissement du liquide exposé à l'air. Même si les mécanismes fins ne sont pas complètement connus, cette coloration peut s'interpréter comme le résultat d'une complexation métallique entre les tannins présents dans le cidre et le fer introduit dans le produit au cours de l'élaboration (par exemple, utilisation d'outils et d'équipements en acier non inoxydable et/ou mal entretenus).

4.2 - Relations structures-activités des polyphénols

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres (Pietta P. G., 2000 ; Rice-Evans C.A. et coll., 1996 ; Dugas A.J. et coll., 2000 ; Bors W. et coll., 1997 ; Orsolya Farkas et coll., 2004). Ainsi, Cuvelier (1992) et Fang H. (2001) et leurs collaborateurs ont testé l'activité antioxydante des acides phénoliques et obtenu les résultats suivants :

- Les acides cinnamiques ont une activité antiradicalaire supérieure à celle des acides benzoïques correspondants. Les acides caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique sont respectivement plus actifs que les acides protocatéchique, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont plus actifs que les phénols simples: acide *p*-coumarique > phénol et acide caféique > pyrocatechol.

Ainsi, le groupe CH=CHCOOH participe à la stabilisation du radical aryloxy par résonance.

- Les acides benzoïques sont, quant à eux, moins actifs que leurs homologues phénols, ce qui tend à démontrer le rôle négatif du COOH directement fixé sur le noyau benzénique.
- L'addition d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante des acides phénoliques, particulièrement quand le second OH est en *ortho* ou *para* du premier: *ortho* = *para* > *métab* ou *para* > *ortho* > *métab* (Thumann V.F. et Herrman K., 1980). Un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique).
- Le groupement méthoxyle joue, dans une moindre mesure le même rôle que les groupements OH.

La présence de plusieurs unités de type acide phénolique peut concourir à renforcer l'activité antioxydante (**Berset C., 2006.**)

4.3 - Comparaison de l'activité des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes

Les travaux effectués sur la capacité antioxydante des polyphénols à piéger un radical libre en comparaison avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) permettent d'estimer le paramètre TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée, plus la molécule est active.

En effet l'activité de la quercétine (4,72 mM) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (2,4 mM). La cyanidine a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine. Ces résultats démontrent l'importance de la présence d'un cycle central insaturé, qui permet la délocalisation des électrons dans le radical (**Figure 46**).

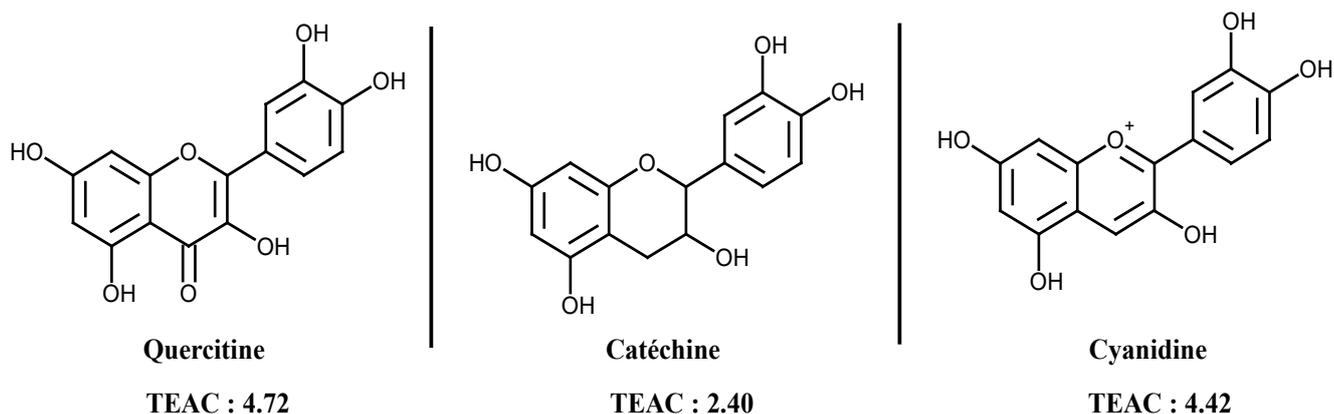


Figure 46 : Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonoïdes. (Rice-Evans C.A. et al., 1996)

4.2.2 Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et de la double liaison C2-C3

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) réduit l'activité antioxydante à 2,4 mM et 2,1 mM, respectivement. Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3 et à la fonction 4 oxo.

L'importance de la double liaison C2-C3 est confirmée en comparant l'activité de la quercétine avec celle de la taxifoline (dihydroflavonol), qui est deux fois moins active que son analogue flavonol, la quercétine (**Figure 47**).

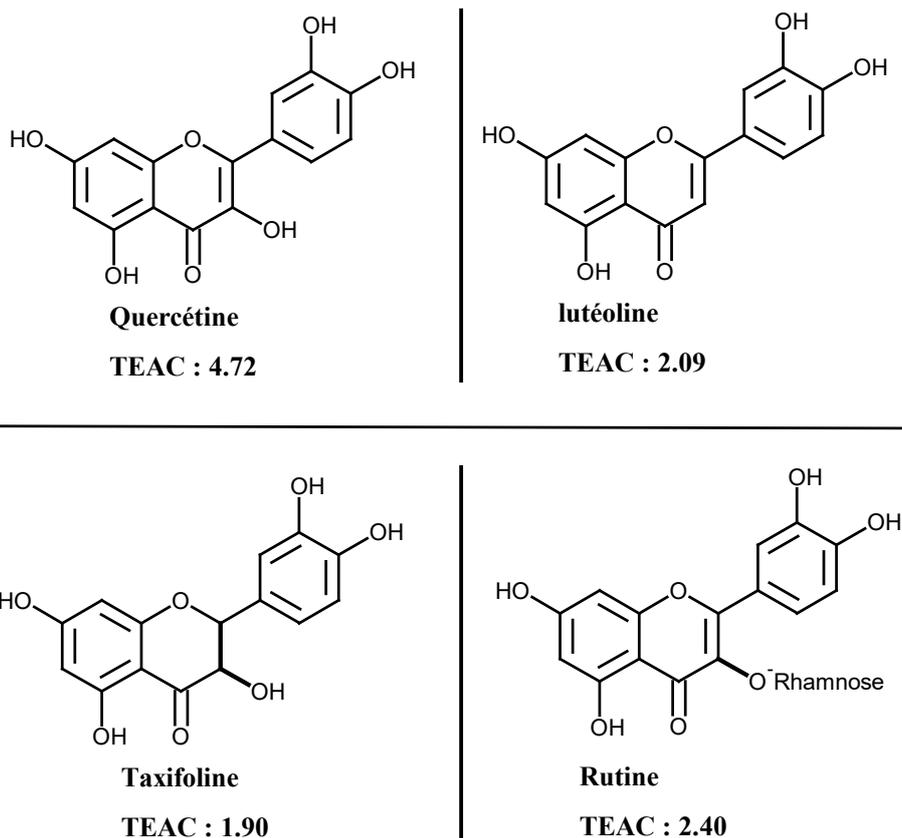


Figure 47 : Valeurs de TEAC indiquant l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison C2-C3. (Rice-Evans C.A. et *al.*, 1996)

4.2.3 Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B

La morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyles en *ortho*) (**Figure 48**). Les résultats démontrent l'importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B.

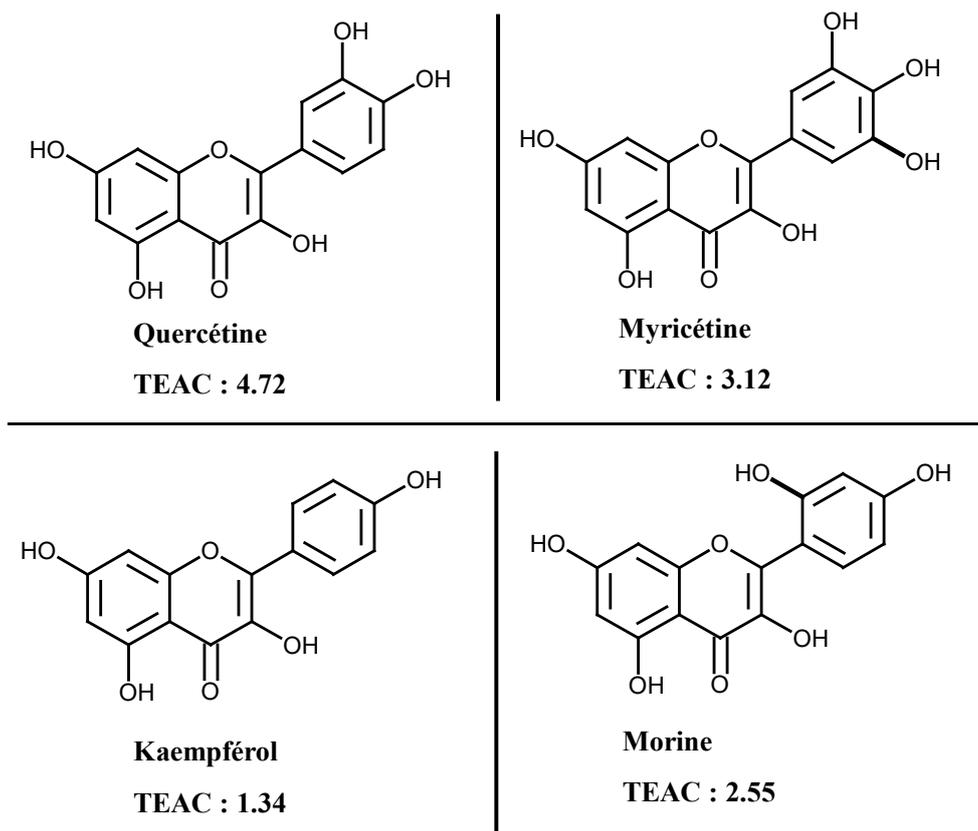


Figure 48 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol sur le cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.

La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B (myricétine) diminue légèrement l'activité antioxydante, sans doute en raison de l'instabilité de ce flavonoïde (grande sensibilité à l'autoxydation). (Gramaza A. et coll., 2006). Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante (Figure 49).

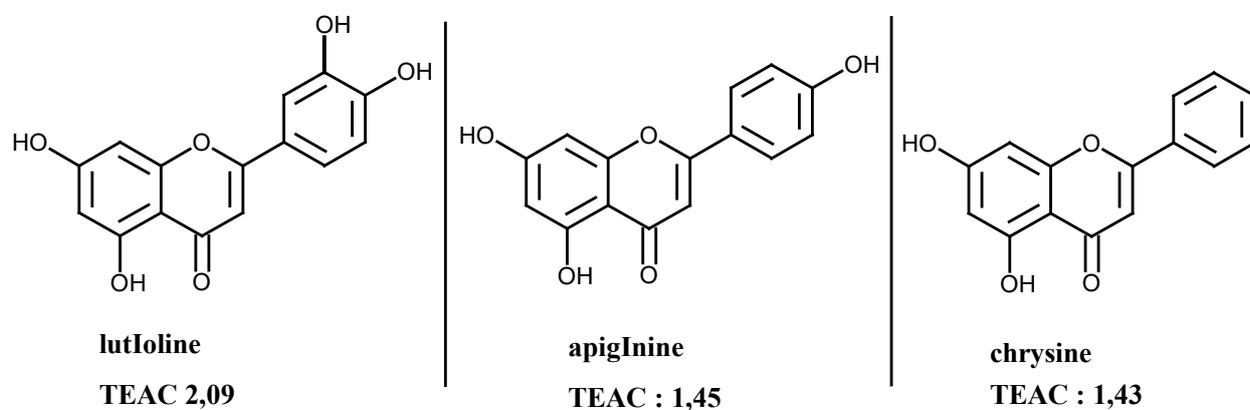


Figure 49 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.

4.2.3 L'effet de la glycosylation sur l'activité des flavones et flavanones

La comparaison de la naringénine avec la naringoside montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue notablement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucoside (Figure 51) (Yukiaki K. & Yukihiko H., 1999).

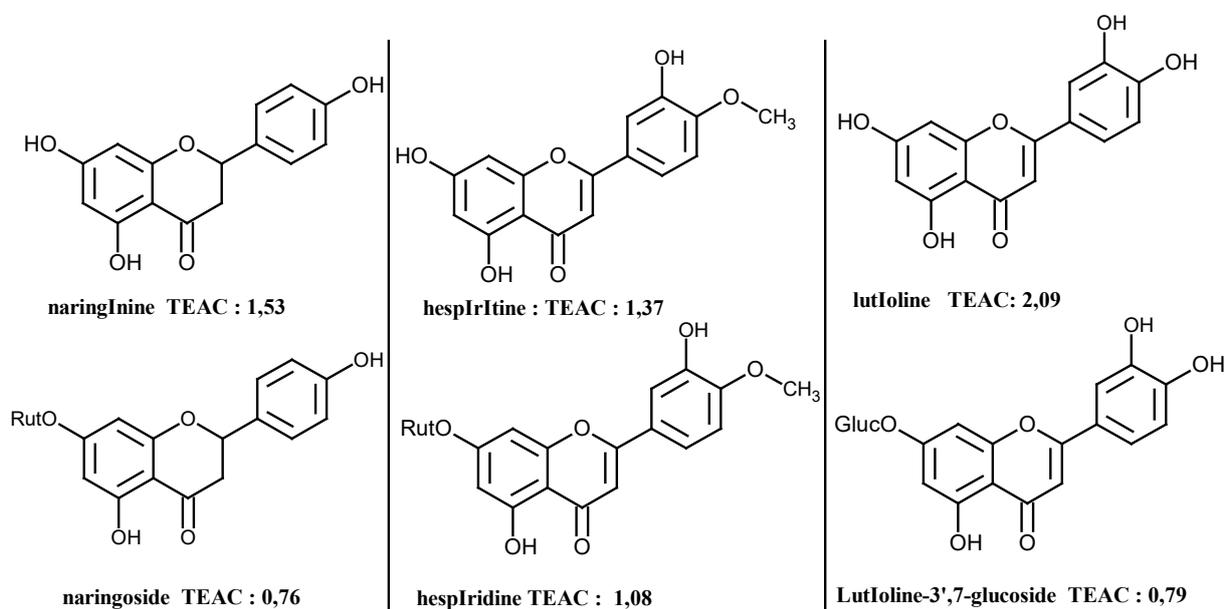


Figure 50 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones.

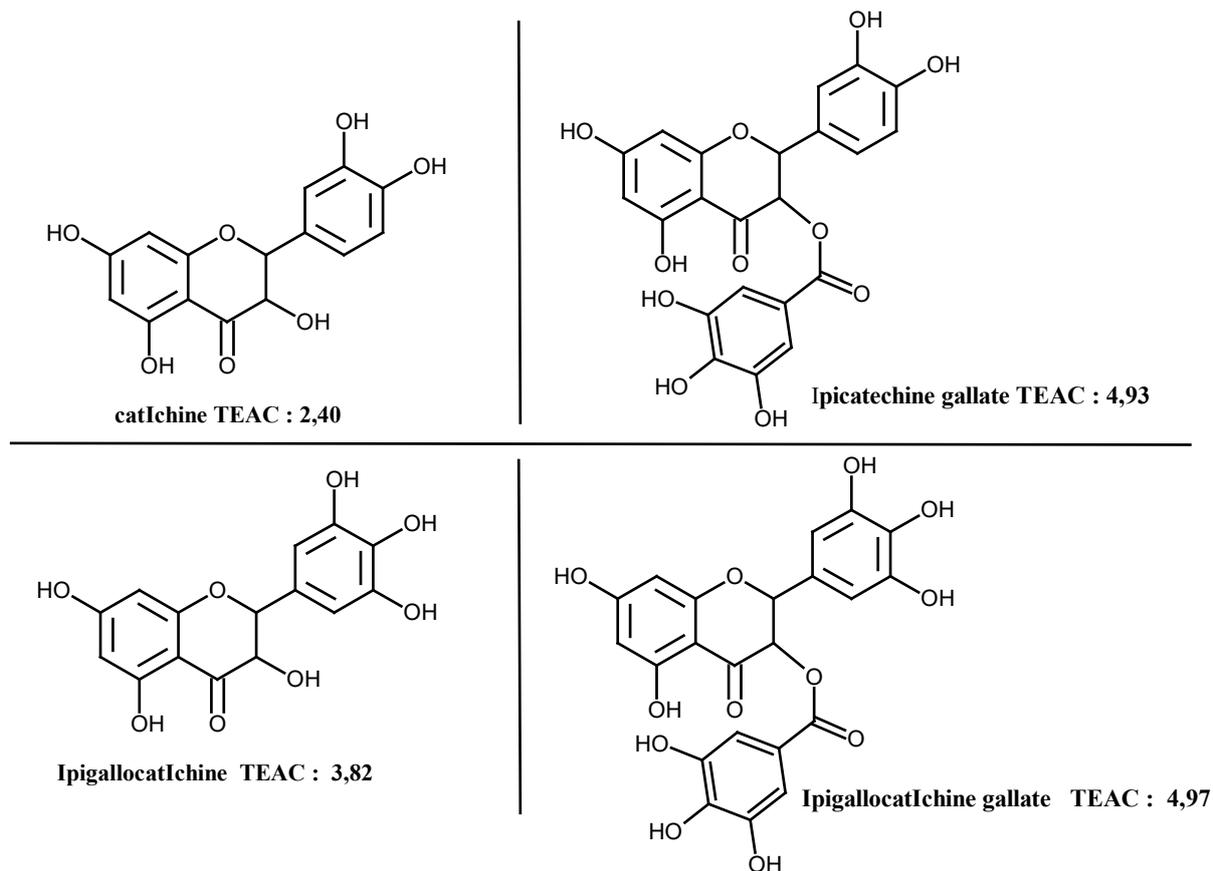


Figure 51 : Activité antioxydante de la catéchine et de la catéchine gallate.

4.2.4 Comparaison de l'activité des flavan-3-ols et des tannins condensés

On les désigne souvent sous le terme générique de catéchines. Ils sont particulièrement abondants dans le thé vert, le chocolat et les raisins. De nombreuses études montrent que ce sont les composés bioactifs les plus importants du thé vert (**Gramaza A. et coll., 2006**). Les potentiels d'oxydoréduction des flavan-3-ols sont classés selon l'ordre suivant : 46 gallate d'épigallocatechine (EGCG) = épigallocatechine (EGC) < gallate d'épicatéchine (EGC) < épicatechine. D'après les mesures de TEAC, le potentiel antioxydant des catéchines du thé vert suit l'ordre suivant : gallate épigallocatechine = gallate épicatechine > épigallocatechine > catéchine **Mandel S. & Youdim M B.H, 2004**.

Les catéchines agissent *in vitro* comme pièges à radicaux libres, y compris NO• et le l'ion superoxyde (**Unno T. et coll., 2001**). Plusieurs facteurs entrent en jeu dans leur activité comme la stabilité du radical formé et son évolution pour conduire à une variété de produits d'oxydation. (**Wiseman SA. et coll. , 2000**) et (**Muir AD., 1996**).

4.2.5 Comparaison de l'activité des différents anthocyanidines

La cyanidine, la delphinidine et la malvidine sont les composés les plus actifs de cette série. Cependant, la grande instabilité chimique de ces composés (sauf en solution fortement acide, pH < 2) est susceptible d'interférer notablement dans les tests. (Higdon J.V et Frei B., 2003).

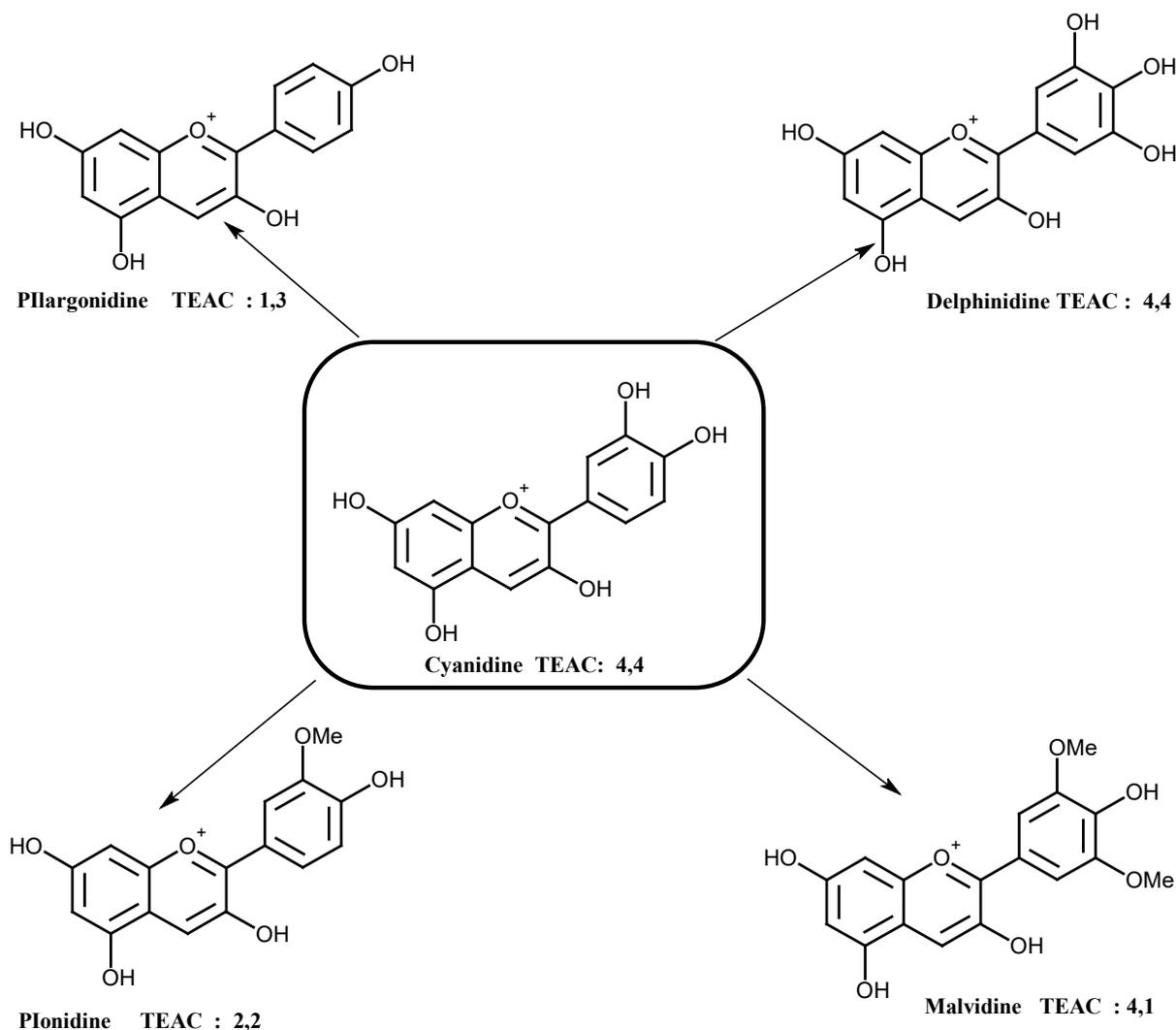


Figure 52 : Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidines.

En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol).
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Bors W. et coll., 1990).

Les flavonoïdes tels que la quercétine qui répondent à ces trois critères structuraux, sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes (impliqués dans la peroxydation lipidique). Enfin, les flavonoïdes possédant une structure catéchol sur le cycle B, et en particulier la catéchine, sont des piègeurs du dioxygène singulet. (Berset C., 2006).

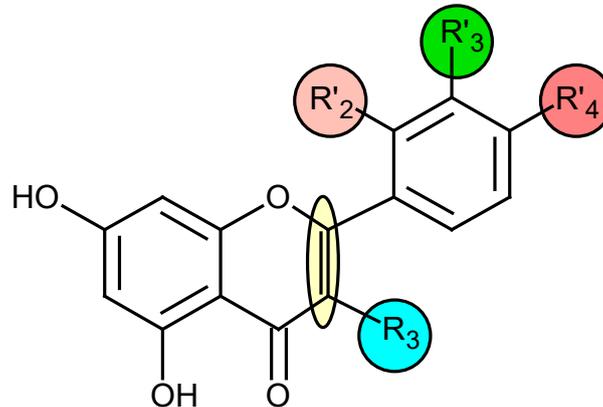


Figure 53 : Les sites essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

5 - Biodisponibilité des polyphénols

Des effets protecteurs vis-à-vis de diverses pathologies ont été attribués aux polyphénols, possédant des propriétés antioxydantes. Pour être actifs, cela suppose que les polyphénols puissent franchir la barrière intestinale pour accéder en tant que molécules biologiquement actives aux tissus et cellules cibles. Il a été montré qu'après administration de doses nutritionnelles, les polyphénols circulants sont très majoritairement des formes conjuguées et que les formes aglycones ne sont pas ou très peu représentés, à l'exception des catéchines, pour lesquelles les aglycones peuvent représenter une proportion très importante des formes circulantes totales (jusqu'à 77% pour l'épigallocatechine gallate).

Des études ont montré que les concentrations plasmatiques postprandiales sont faibles, de l'ordre de 1 μM , et que ces concentrations varient selon la structure. la concentration plasmatique pour l'acide gallique peut atteindre 4 μM . par ailleurs, le maintien d'une concentration plasmatique plus élevée en polyphénols requiert une ingestion répétée ; en effet, les concentrations maximales sont le plus souvent atteintes 1 à 2 heures après ingestion, excepté pour les polyphénols qui nécessitent d'être dégradés par la microflore colique avant d'être absorbés.

Des travaux récents montrent que bien que certains polyphénols soient capables d'emprunter des transporteurs protéiques présents au niveau des anthérocytes, ils sont le plus souvent excrétés vers la lumière intestinale, conduisant ainsi à une absorption nette limitée. L'organisme considère les polyphénols comme des xénobiotiques, limitant leur absorption au niveau de l'intestin grêle et/ou en les modifiant de façon à les rendre plus facilement éliminables par les reins et le foie (**Amiot. M.J et al, 2009**).

4.4 - Action et intérêt des polyphénols sur la santé

Les polyphénols sont particulièrement abondants dans les fruits. Leurs teneurs peuvent atteindre 500 mg / 100 g dans certains fruits comme la pomme, le raisin ou les cerises. Le champion toutes catégories est le kaki avec des teneurs de 1 g / 100 g. Les légumes contiennent de plus faibles quantités de polyphénols, de l'ordre de 25 à 100 mg /100g.

Les recherches sur les effets santé des polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants (**Scalbert A, et Williamson G , 2000**). Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments répartis en plusieurs classes : on peut citer parmi les plus importantes les anthocyanes responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki, etc.), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondants dans l'orange. Pour les légumes, on peut citer l'oignon riche en flavonols (quercétine) (**Mila, I, 1996**).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'effet protecteur d'une alimentation riche en fruits et légumes vis-à-vis de différentes maladies dégénératives (**Pascale S, 2006**) comme les cancers ou les maladies neurodégénératives, mais aussi pour prévenir les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou le diabète (**Tomas-Barberan F. A, Gil M. I, 2008**).

Plusieurs méta-analyses de plusieurs études épidémiologiques suggèrent une contribution des polyphénols aux effets bénéfiques des fruits et légumes (**Amiot. M.J et al, 2009**). Ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées (cancers, maladie cardiovasculaire et neurodégénératives) (**Augustin. S, 2003**).

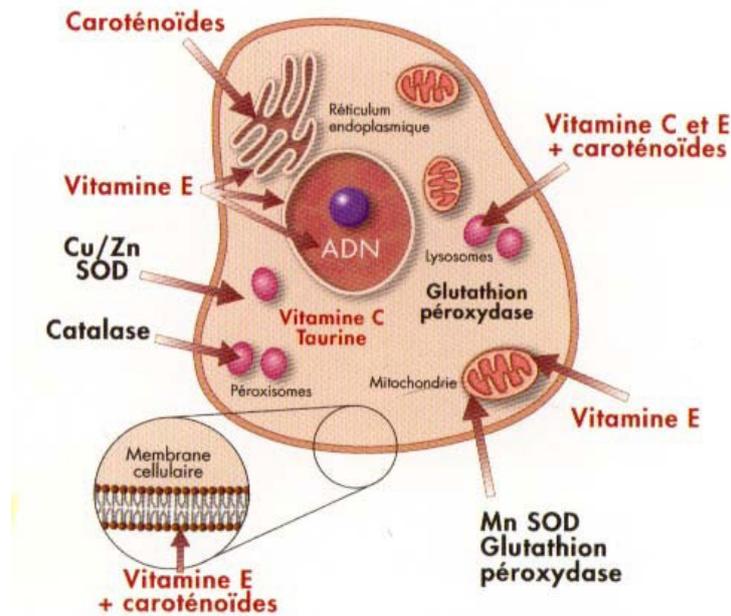


Figure 54 : Site d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (Justine.O, 2005)

Les fruits et légumes contribuent largement à l'équilibre hydrique, vitaminique et minéral de l'alimentation. La richesse en fibre en fait un aliment de choix pour la régularisation des processus digestifs et métaboliques. Grâce à leur apport minéral, ils exercent une action alcalinisante sur le milieu interne, équilibrant l'effet trop acide de l'alimentation actuelle.

En général, les fruits contiennent moins de minéraux que les légumes, mais ils apportent plus de vitamines C. leurs compositions peuvent être très différentes, puisqu'ils peuvent provenir de toutes les parties de la plante : bourgeons, bulbe, racine (Knekt. P, Ritzj, Pereira. MA, 2004).

Des études épidémiologiques (Pierre.B et al, 2000) mettent clairement en évidence le rôle primordial des fruits et des légumes dans la préservation de nombreuses pathologies chroniques : cancer et maladies cardiovasculaires. Les mécanismes invoqués pour expliquer le bénéfice santé des fruits et des légumes mettent en jeu des propriétés très différentes :

- propriétés antioxydantes (vitamines, polyphénols)
- action sur la flore bactérienne intestinale (fibres)
- régulation des enzymes de détoxification (antioxydants)
- inhibition de la formation de composés carcinogènes (fibres)
- effets spécifiques de nature immunitaire (composés phénoliques)
- action mécanique sur le tractus digestif (fibres).

De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (Augustin. S, 2003) en contribuant à l'élimination du cholestérol dans la circulation sanguine et en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Patterson. C.A, 2008) et en limitant chez l'Homme le risque d'athérosclérose par leur action anti-inflammatoire en diminuant la production des cytokines inflammatoires impliquées dans l'adhésion cellulaire (Sagols. E et Prymenko. N, 2010).

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion de l'artère (Jean-Paul. C et Jean-Paul. R, 2000 ; Augustin. S, 2003).

Des études réalisées in vitro et in vivo suggèrent que les polyphénols sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse (initiation, promotion et progression). Ils inhibent la croissance de lignées cellulaires cancéreuses, en interférant avec les mécanismes de transduction des signaux mitogènes. De nombreuses enquêtes épidémiologiques attribuent, un effet préventif très important à la consommation de fruits et légumes, riches en ces composés pour divers cancers (Jean-Paul. C, Jean-Paul. R, 2000 ; Augustin. S, 2003).

Tableau 9 : Activités biologiques des polyphénols

Polyphénols	activités	Références
flavonoïdes	Antioxydants	(Pasc ale. S, 2006)
	Anti-inflammatoire	(Jaganath. I. B et Crozier. A, 2008)
	Anticancéreux	(Harborne. J.B et Williams. C.A, 2000)
	Antimicrobiennes	(Grayer. R.J, et Harborne. J.B, 1994)
	Hypotenseurs et diurétiques	(Bruneton. J, 1993)
anthocyanes	Antioxydants	(Pasc ale. S, 2006)
	Anti-inflammatoire antibactérienne	(Amiot. M.J et al, 2009). (Pasc ale. S, 2006; Patterson. C.A, 2008).
	antivirale vasoprotectrices et inhibitrices de l'agrégation plaquettaire	(Patterson. C.A, 2008). (Pasc ale. S, 2006).
Acides phénoliques (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques antioxydants	(Didry. N et al, 1982) (Ravn. H et al, 1984) (Hayase. F et kato. M, 1984)
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants, Anti-obésité	(Amiot. M.J et al, 2009).

Un dénominateur commun dans la pathogenèse de la plupart des maladies inflammatoires chroniques est l'implication du stress oxydatif, lié à la production de ERO (**Gasparri, 2017**). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont rapporté les effets d'extraits de fraise sur la suppression du stress oxydatif et du processus inflammatoire. Les polyphénols contenus dans les fraises seraient responsables de ces propriétés bénéfiques (**Battino, 2020**).

Des études épidémiologiques et cliniques démontrent que sa consommation aiguë améliorerait la réponse glycémique postprandiale. Dans le même temps, un apport prolongé améliorerait le profil lipidique plasmatique, favorisant la santé cardiovasculaire, en particulier chez les personnes présentant un risque accru de syndrome métabolique (**Forbes-Hernandez, 2016**).

Pour expliquer leurs effets bénéfiques, une grande attention a été accordée par le passé aux propriétés antioxydantes des polyphénols de la fraise. Cependant, des recherches récentes ont montré que leurs activités biologiques et fonctionnelles sont liées non seulement à la capacité antioxydante mais également à la modulation de nombreuses voies cellulaires impliquées dans le métabolisme, la survie, la prolifération et les défenses antioxydantes (**Nowicka. A et al, 2019**)

4.5 - Applications pratiques des polyphénols

Les polyphénols constituent aujourd'hui un vaste sujet de recherches et intéressent non seulement le chimiste, mais aussi les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier sur la saveur des aliments. Leur incidence sur la conservation des produits retient également l'attention dans le secteur alimentaire, mais aussi dans celui des cosmétiques (contre le vieillissement cellulaire) et de la pharmacologie. Les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols suscitent également beaucoup d'intérêt dans le domaine médical par leur caractère préventif à l'égard de diverses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou dégénératives (**Sarni-Manchado. P et Cheynier. V, 2006**).

4.5.1 - Applications des polyphénols en agro-alimentaires

En agroalimentaire, Les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux (**Bessas. A, 2008**). Ils occupent une place importante dans l'évaluation sensorielle de l'huile extra-vierge. Ils contribuent aux propriétés organoleptiques de l'huile d'olive essentiellement décrites par l'astringence, l'âcreté et

l'amertume. De plus, ces polyphénols augmentent la résistance à l'autooxydation de l'huile et agissent en tant que protecteurs de sa qualité **(Denise. N, 2006)**.

Toutefois, certains antioxydants naturels diminuent d'efficacité lors des processus technologiques (stockage ou chauffage), ce qui nécessite l'addition d'antioxydants exogènes synthétiques afin de retarder l'oxydation lipidique. Parmi les antioxydants chimiques effectifs en industrie alimentaire, la gamme des antioxydants phénoliques est la plus utilisée tels que : le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), le tertio-butylhydroquinone (TBHQ) selon une incorporation directe dans les huiles ou indirecte à travers l'emballage. Selon le code des réglementations fédérales 1998, ils sont autorisés à des concentrations maximales de 200 ppm. Le TBHQ est un antioxydant très commercialisé actuellement de cinq à sept fois plus puissant que BHA et BHT, ainsi qu'il prolonge la durée d'utilisation du produit **(Denise. N, 2006)**.

La fabrication du cuir par tannage des peaux des animaux est une activité humaine traditionnelle, déjà mise en œuvre il y a plusieurs millénaires dans le bassin méditerranéen. Elle a utilisé pendant longtemps des extraits végétaux riches en tannins **(Bessas. A, 2008)**.

4.5.2 - Applications des polyphénols en pharmacie

Les anthocyanes entrent dans de nombreuses préparations pharmaceutiques. Essentiellement sous formes de sels de flavylium, les plus utilisées sont les anthocyanines de myrtille, mais aussi de raisin et de cassis. De tels extraits sont commercialisés contre différentes troubles : douleurs rhumatismales et articulaire, ulcères d'estomac et duodéal, inflammations de la bouche **(Pascale. S, 2006 ; Patterson. C.A, 2008)**.

Des extraits de myrtille sont commercialisés sous forme de préparations phytothérapeutiques pour le traitement de l'insuffisance veineuse et de la fragilité capillaire **(Pascale. S, 2006)**.

4.5.3 - Applications des polyphénols en industrie Chimique

Les polyphénols, et notamment les tannins du marc de raisin, peuvent servir à l'élaboration d'adhésifs « verts » pour le collage de panneaux de particules. A l'heure actuelle, la majorité des colles utilisées dans ce domaine sont à base de formaldéhyde produit à partir de ressources fossiles. Or, les réglementations concernant les émissions de formaldéhyde sont de plus en plus strictes et le remplacement des résines à base de dérivés pétroliers par des produits bio-sourcés devient nécessaire d'un point de vue environnemental

(Pizzi A., 2006). Il a été précédemment démontré que les tannins condensés étaient à la fois chimiquement et économiquement intéressants pour la préparation d'adhésifs et de résines destinés à la production de panneaux de particules et qu'ils pouvaient être utilisés avec succès en tant que substituts de phénol dans la production des résines phénol-formaldéhyde (Pichelin F. *et al.*, 2006; Pizzi A. *et al.*, 2003; Tondi G. *et al.*, 2009). A titre d'exemple, le VITITAN® est un extrait de marcs distillés, disponible commercialement, contenant un mélange complexe de polysaccharides et de tannins condensés. Plusieurs applications industrielles sont possibles : colle renouvelable, structurant de panneaux de particules et de fibres pour isolants contreplaqués, en complément de colles synthétiques, ou en antioxydant dans les matériaux. Le *tableau I-6* résume les applications potentielles des différents composés phénoliques issus du raisin et dérivés de raisin et présente quelques entreprises susceptibles de commercialiser des extraits et/ou produits finis enrichis en composés phénoliques issus du raisin et/ou dérivés tels que les marcs.

Tableau 10 : Applications potentielles des extraits phénoliques issus du marc de raisin.

Application	Type de composés phénoliques	Source	Effets
OE nologie	Tannins condensés de haut degré de polymérisation	Pellicule, Pépin	Augmentation de : - la structure tannique, - la persistance gustative - la sensation de gras et de rondeur - Diminution de l'astringence
Nutraceutique & Compléments alimentaires	Tous types de composés phénoliques Resvératrol	Pellicule, Pépin, Marc de raisin	Antioxydants Prévention des maladies cardiovasculaires
Alimentation	Anthocyanes	Pellicule	Colorants alimentaires naturels
Cosmétique	Tannins condensés Resvératrol Viniférine	Pellicule, Pépin, Raffles	Antirides, Antitaches, Protection solaire
Chimie verte	Tannins condensés	Marc de raisin	Colles vertes

Il ressort que **l'aspect qualitatif**, et notamment la composition en composés phénoliques des extraits, est un **facteur-clé qui détermine l'application potentielle** des extraits. Ainsi, des extraits riches en stilbènes seront principalement utilisés pour la formulation de compléments alimentaires ou de crèmes cosmétiques, tandis que des extraits riches en tannins condensés auront un intérêt particulier en oenologie ou pour la production de colles vertes, dépendamment de leur degré de polymérisation et de leurs sous-unités constitutives.

4.6 - Bilan et perspectives des recherches effectuées sur les polyphénols :

Les orientations récentes des recherches sur les polyphénols visent d'une part à mieux comprendre les mécanismes d'action au niveau moléculaire et cellulaire. Les résultats des études portant sur les marqueurs du stress oxydant sont très contradictoires et ne progresseront qu'à la lumière des progrès réalisés dans la validation de ces marqueurs. L'utilisation de nouveaux outils de la génomique et de la protéomique devrait permettre l'identification de certaines cibles d'importance. Trop peu d'études cliniques ont encore été publiées mais elles suggèrent un rôle protecteur vis à vis des maladies cardiovasculaires.

Les recherches épidémiologiques visant à préciser les associations entre les niveaux de consommation des divers polyphénols et le risque de développer les pathologies permettront de préciser la nature des polyphénols et les niveaux d'apports les plus favorables à la prévention des diverses pathologies. Ces études épidémiologiques en sont encore à leurs balbutiements. Les progrès sont rendus difficiles par l'insuffisance des tables de compositions alimentaires pour les polyphénols. Une première table partielle vient d'être publiée aux Etats-Unis. Une autre table plus complète est en cours d'élaboration en France. Le développement de tels outils contribuera à préciser les associations entre consommation de polyphénols et santé, une des clés nécessaires pour l'établissement de recommandations nutritionnelles.

Dans l'état des connaissances actuelles, il est illusoire de recommander une augmentation des niveaux d'apports en polyphénols. Un apport excessif en polyphénols à travers notamment la consommation de suppléments nutritionnels pourrait avoir éventuellement des conséquences fâcheuses pour la santé (statut en fer, effets pro-oxydants, effets goïtrogènes, etc.). Seules les recherches à venir permettront de mieux préciser les niveaux d'apport les plus favorables au maintien de la santé (**Scalbert. A, 2004**).

5 - Conclusion

Les polyphénols sont présents dans de nombreux aliments et boissons d'origine végétale. Les études épidémiologiques et d'intervention sont encore trop peu nombreuses pour conclure sur les effets de ces substances. Tout comme d'autres antioxydants il est déconseillé de prendre des suppléments nutritionnels riches en polyphénols pour leurs possibles effets délétères à haute dose. La consommation d'aliments de diverses origines végétales ne peut être qu'encouragée, car elle permet d'apporter une diversité de substances phénoliques qui pourraient contribuer au rôle bénéfique sur la santé (Amiot. M.J et al, 2009). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux définir la frontière entre effets pro-oxydants et effets antioxydants. Quoiqu'il en soit, les nombreux effets positifs sur la santé attribués aux composés phénoliques ne mettent pas uniquement en jeu les propriétés antioxydantes mais aussi des propriétés plus spécifiques impliquant leur interaction avec diverses protéines au sein de la cellule.

Chapitre III

Procédés d'extraction des antioxydants naturels

1– Introduction

L'extraction des antioxydants naturels des fruits et légumes est certainement la phase la plus délicate. Elle a pour but de séparer les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal. Il existe plusieurs procédés d'extraction utilisés de manière conventionnelle depuis de nombreuses années dans l'industrie chimique, pharmaceutique ou même agroalimentaire ; mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature des extraits ainsi que leurs éventuelles utilisations et permis une meilleure exploitation de ces antioxydants naturels.

Les méthodes d'extraction conventionnelles par solvant peuvent causer la dégradation des antioxydants naturels à cause des températures élevées et de la longue durée d'extraction.

Afin de pallier à ces problèmes, de nouvelles techniques ont émergé (extraction par micro-ondes, extraction par ultrasons, extraction par détente flash, extraction par détente instantanée contrôlée, extraction par fluide supercritique ou par eau sous critique... etc) pour intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement d'extraction (**Chemat et al., 2009 ; Rawson et al., 2011**).

Dans ce chapitre seront présentées les caractéristiques des différentes méthodes d'extraction des antioxydants naturels contenus dans les matrices végétales.

2– Extraction conventionnelle

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des antioxydants naturels. De nombreux paramètres d'extraction doivent être pris en compte pour l'optimisation de cette méthode: le type et la concentration du solvant organique, la température, le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction (**Yim et al., 2014**).

L'extraction solide/liquide de molécules végétales est une étape clé des procédés de raffinerie des agro-ressources (huilerie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire, nutraceutique, etc.). L'extraction solide/liquide permet de séparer les composés extractibles solubles (soluté) d'une matrice solide, formée par les tissus végétaux, à l'aide d'une phase liquide (solvant) et permet de générer un extrait liquide (solvant + soluté).

L'extraction dépend du type d'antioxydants en question et de la procédure d'extraction à utiliser (**Li B. B.,2006**). La première étape consiste à broyer et macérer l'échantillon pour augmenter la surface, permettant un meilleur contact du solvant d'extraction avec l'échantillon (**Waterman et Mole 1994**). Cela aide également à mélanger l'échantillon pour garantir que la portion extraite est représentative de l'ensemble de l'échantillon.

Trois grands processus élémentaires régissent l'extraction solide/liquide (**figure 55**) :

- la diffusion du solvant dans le solide,
- la dissolution du soluté et son transfert par diffusion à la surface du solide,
- la diffusion des solutés solvatés à travers le solide.

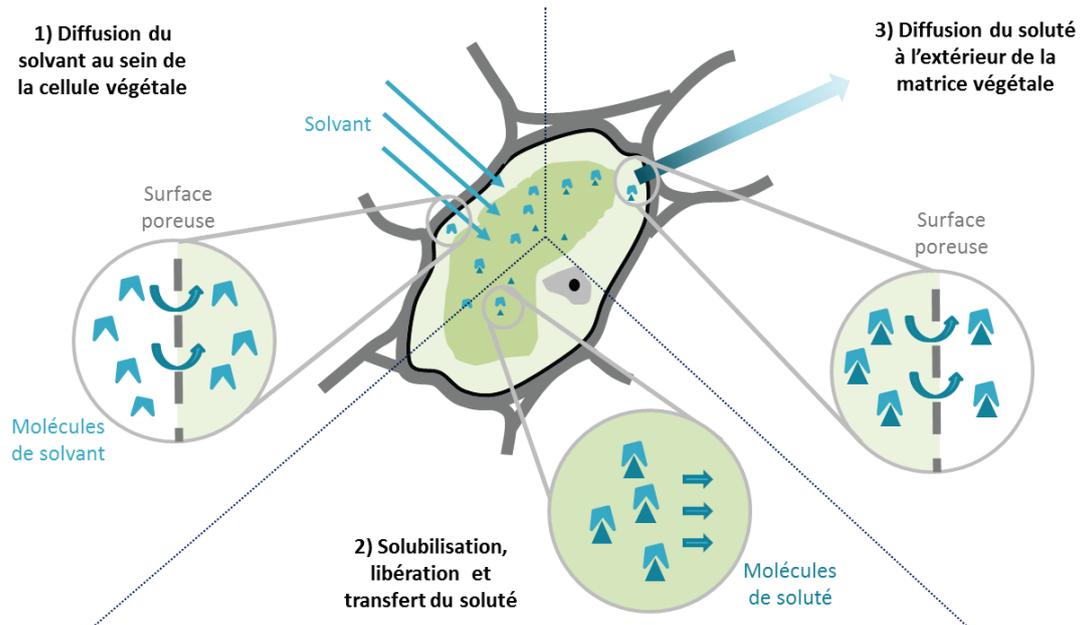


Figure 55 : Schéma des trois étapes élémentaires de la diffusion solide/liquide dans une matrice végétale (Chemat, 2011).

La diffusion s'arrête, quand le système atteint l'équilibre, c'est-à-dire quand la concentration à l'intérieur des cellules est égale à la concentration à l'extérieur des cellules. Ainsi, plus le ratio liquide-solide est élevé, meilleure sera l'extraction des antioxydants naturels (**Bucić-Kojić A. et al., 2007**).

L'extraction de certains composés d'une matrice végétale s'effectue selon diverses techniques. Ces techniques d'extraction se résument en extraction au Soxhlet, la macération et l'hydrodistillation ...etc (**Herodez. S. S. et al, 2003**).

Les paramètres de base qui influent sur la qualité de l'extraction sont :

- la nature du solvant
- la procédure d'extraction
- la méthode d'extraction (**Gullberg.J, et al, 2004**)

2.1– Influence des paramètres opératoires sur l'extraction

Plusieurs paramètres sont alors susceptibles d'influencer les processus élémentaires qui régissent la diffusion solide/liquide (tableau 1). Parmi ces paramètres opératoires, on peut noter que la composition du solvant et la température d'extraction conditionnent particulièrement l'efficacité de la diffusion. L'impact de ces paramètres sur l'extraction est spécifique à chaque matrice végétale et à la nature des composés phénoliques à extraire. (Guerrero M.S. *et al.*, 2008).

Tableau 11 : Processus élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal (Chemat F., 2011).

Processus élémentaire	Phénomènes	Facteurs impliqués	Paramètres influençant ces facteurs	Effet
Diffusion du solvant	Transport du solvant dans le solide	Affinité solvant/phase solide Viscosité Rapport de taille molécules/pores	Nature du solvant, Température, Pré-traitement de la matière solide (augmentation des surfaces d'échanges) Compression-détente, Percolation forcée	Gonflement, Remplissage, Plastification
Libération du soluté	Rupture des liaisons chimiques, Dissolution, Diffusion au travers d'une membrane	Nature des liaisons soluté/solide (hydrogène, covalente, etc.), Affinité solvant/soluté	Nature du solvant, Température, pH	Molécules libres dans la matière
Diffusion du soluté	Transport du soluté solvaté dans le solide Transfert du soluté en périphérie du solide vers le solvant	Porosité de la matrice, Intégrité des membranes, Viscosité	Taille des particules, Déstructuration du solide, Nature du solvant Température Dilution, Agitation, Compression-détente, Percolation forcée	Epuisement de la matière

2.1.1 – Nature du solvant d'extraction

Le choix d'un solvant ou d'un mélange de solvants est primordial lorsqu'il s'agit d'une extraction des composés à partir d'une matrices végétales. Il est fondé sur plusieurs paramètres physicochimiques : La polarité, la solubilité des constituants cibles, l'innocuité, la facilité d'élimination et la pureté du solvant (Handa. SS et al, 2008).

Le solvant d'extraction doit être sélectif, possède une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée et une faible viscosité. A ce stade du procédé d'extraction, le choix du solvant déterminera le profil phytochimique de l'extrait, dépendamment de la polarité de chaque molécule. atmosphérique (Lattanzio V. *et al.*, 2006). On classe en général les solvants en fonction de leur polarité et leur capacité à extraire certaines molécules. L'extraction d'une molécule se fera toujours par solvant de même polarité. Les solvants polaires tels que l'eau, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone permettront d'isolement de molécules polaires : terpénoïdes phenols, lactones, alcaloïdes, protéines, acide amines, gommes, mucilage. Les solvants apolaires comme l'hexane, le toluène, le chlorure de methylene, le chloroforme vont extraire les carbures, lipides, sterols, huiles essentielles, cires, résine, et chlorophylle (Pinelo M. *et al.*, 2005a 2005 ; Pinelo M. *et al.*, 2005b). (Lapornik B. *et al.*, 2005). Le tableau 2 donne un aperçu des solvants utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de co-produits viticoles.

Tableau 12 : Solvants d'extraction appropriés en fonction du type de polyphénols à extraire.

Composés phénoliques	Solvants	Références
Acides phénoliques	Eau/Acétone/Méthanol Eau, Eau/Ethanol	(Brazinha C. <i>et al.</i> , 2014a; Mané C. <i>et al.</i> , 2007)
Tannins	Eau/Acétate d'éthyle Eau/Ethanol	(Pekić B. <i>et al.</i> , 1998; Spigno G. <i>et al.</i> , 2007)
Monomères et dimères de flavan-3-ols	Eau/Acétate d'éthyle, Acétone, Méthanol	(Jayaprakasha G. <i>et al.</i> , 2001; Kallithraka S. <i>et al.</i> , 1995)
Anthocyanes	Eau, Eau/Ethanol, Eau/Méthanol	(Lapornik B. <i>et al.</i> , 2005)
Stilbènes	Méthanol, Méthanol acidifié, Eau/Ethanol	(Brazinha C. <i>et al.</i> , 2014a; Sun B. <i>et al.</i> , 2006)
Flavonols	Eau/Ethanol	(Makris D.P. <i>et al.</i> , 2007; Spigno G. <i>et al.</i> , 2007)

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la nature du solvant sur le contenu phénolique des écorces d'agrumes. Le tableau 3 résume les publications les plus récentes relatives à l'extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes.

Zia-ur-Rehman (2006) a montré que le rendement le plus élevé a été obtenu en utilisant le méthanol (19,87%), suivi par de l'acétone (15%), de l'éther de diéthyle (12,75%) et de l'éthanol (11,00%). Ce résultat a été confirmé par **Goulas et al. (2012)** qui ont testé l'efficacité d'extraction de trois solvants (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle) à partir de la pulpe de « Mandora ».

Tableau 13 : Extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes

Matrice	Composés	Solvants (ratio: m/v: g/ml)	T(°C)	Temps	Références
Citrus	Phénols	Méthanol (10:100)	TA	24h	Zia-ur-Rehman et al., 2006
		Acétone (10:100)	TA	24h	
		Ether (10:100)	TA	24h	
		Ethanol (10:100)	TA		
Mandarine	Phénols	Ethanol (2:16)	80	3h	Liet al., 2006a
	Hespéridine,	Méthanol (10:300)	-	20h	Huanget al., 2010
	Narirutine	Eau chaude (5:100)	100	30 min	Xuet al., 2008
		Acétone (50 ml/g)	40	2h	Tumbaset al., 2010
	Hespéridine	Eau chaude (2:200)	90	3h	Cheighet al., 2012
	Narirutine	Ethanol (2:200)	79	3h	
		Méthanol (2:200)	65	3h	

Les paramètres d'extraction conventionnelle par solvant utilisés dans la littérature sont différents (rapport masse/volume, le temps et la température d'extraction et le nombre d'extraction). Par conséquent, il est difficile de déterminer le solvant permettant l'obtention du rendement le plus élevé en antioxydants naturels.

La plupart des auteurs ont constaté que le méthanol donne le rendement le plus élevé.

Cependant, dans des applications industrielles, le méthanol n'est pas utilisé du fait de sa toxicité. Il est souvent remplacé par d'autres solvants organiques non toxiques et ayant des rendements d'extraction satisfaisants, tels que l'éthanol, le n-butanol, l'isopropanol ou l'éther de pétrole (**Bartnick, 2006**). En raison de son efficacité et de sa sûreté, l'éthanol est le solvant le plus recommandé pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes pour des applications alimentaires et cosmétiques (**Brazinha C. et al., 2014; Tephly T.R., 1991; Yilmaz Y. et al., 2006**).

2.1.2– Concentration du solvant

L'eau est généralement ajoutée au solvant d'extraction tel que l'éthanol ou le méthanol afin d'améliorer l'extraction des composés phénoliques polaires à partir des écorces d'agrumes. Une étude sur les valeurs théoriques de l'hydrophobicité (Log P) des composés phénoliques, ainsi que ceux de certains solvants organiques a montré que le méthanol et l'éthanol mélangés avec de l'eau, sont les solvants les plus appropriés pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Selon **Li et al. (2006)** 85% d'éthanol est la concentration optimale pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Les auteurs ont montré que la teneur en phénols totaux augmente avec l'augmentation de la concentration d'éthanol jusqu'à 85%, puis elle diminue. Ce résultat a été confirmé par **Tumbas et al. (2010)** et **Cheigh et al. (2012)**. **Khan et al. (2010)** ont conclu que la concentration optimale en éthanol pour l'extraction des flavanones des écorces d'orange est de 80%.

2.1.3 – L'acidification du solvant d'extraction

L'acidification du solvant d'extraction par de l'acide citrique, acétique ou encore chlorhydrique, permet, d'autre part, d'améliorer la stabilité des composés phénoliques, et en particulier celle des anthocyanes (**Escribano-Bailon M.T. et al., 2003**). A pH acide (pH \approx 2), la solubilisation des polyphénols et leur diffusion à travers la matrice végétale sont facilitées (**Chirinos R. et al., 2007**).

2.1.4 – Température et temps de l'extraction

La température est un accélérateur d'extraction son augmentation facilite l'extraction du fait de la perméabilisation des parois cellulaires (dénaturation des protéines membranaires), de l'augmentation de la solubilité des solutés, de l'amélioration des coefficients de diffusion et de la diminution de la viscosité des solvants d'extraction. Toutefois, en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, une température trop élevée peut conduire à leur décomposition et leur dégradation (**Wang et Weller, 2006; Routray et Orsat, 2012 ; Lafka T.L. et al., 2007**). La température d'extraction doit rester modérée, de l'ordre de 50-60°C et/ou le couple temps/température d'extraction doit être choisi de manière à limiter la dégradation des composés phénoliques.

Les combinaisons temps-température utilisées par différents auteurs pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes sont résumées dans le tableau 11. Ces deux paramètres sont inversement proportionnels : pour une courte durée d'extraction, des

températures élevées sont utilisées, et vice versa. (**Cacace J. et al., 2003; Spigno G. et al., 2007**)

Par exemple, **Xu et al. (2007)** ont effectué des extractions des composés phénoliques des écorces d'agrumes à 100°C pendant 30 min, tandis que **Ziu-ur-Rehman et al. (2006)** ont utilisé un temps d'extraction de 12h à température ambiante. Le défi est de trouver la combinaison optimale de ces deux paramètres.

2.1.5 – Nombre de cycles d'extraction

Le rendement d'extraction est limité par l'atteinte de l'équilibre, qui correspond à l'épuisement des composés phénoliques dans la matière végétale. En général, il est nécessaire de renouveler le solvant en utilisant le même volume afin de déterminer le rapport optimal (m/v). L'extraction répétée améliore le rendement d'extraction et réduit la durée du chauffage (**Routray et Orsat, 2012**). Une seule extraction (3h, rapport: m/v: 02:16, 80°C) (Li et al., 2006a) ou une double extraction (rapport: m/v: 01:10, à température ambiante, pendant une nuit (**Ziu-ur-Rehman et al., 2006**) sont souvent utilisées.

2.1.6 – L'agitation mécanique

L'agitation mécanique du milieu améliore les phénomènes de transfert de matières en favorisant l'homogénéisation de la suspension lors de l'extraction, limitant ainsi la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface liquide / solide (couche limite) (**Leybros J. et al., 1990**).

2.2– procédures d'extractions

Le choix de la procédure d'extraction est basé sur les caractéristiques physicochimiques des composés à extraire. Deux procédures d'extraction sont généralement utilisées :

- Extraction par mise en contact avec un solvant : les échantillons végétaux broyés sont mis en contact avec le solvant dans un mélangeur, puis l'extrait est filtré. Le filtrat peut être séché sous pression réduite, puis redissout dans le solvant (**Handa. SS et al, 2008**).
- Extraction successive avec des solvants de polarité croissante : d'un solvant apolaire à un solvant polaire afin d'assurer une extraction optimale des composés de polarités différentes (**Jones WP, Kinghorn AD ; 2005**).

2.3 – Méthodes d'extraction

2.3.1– Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. Elle consiste à faire passer des métabolites (solutés) dissous dans une phase liquide, dans une seconde phase liquide non miscible avec la première (**Peyron L., 1992**)

2.3.2– Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant (**Bonnaillie.C , 2012**).

3 – Méthodes d'extractions des composés bioactifs à partir des matrices végétales

Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données préalables sur les caractéristiques physicochimiques des métabolites à extraire. On distingue de nombreuses méthodes d'extraction (solide-liquide) des composés phytochimiques : des méthodes conventionnelles et des méthodes nouvelles (**Gertenbach D.D., 2001**).

3.1– Méthodes conventionnelles dites classiques

L'extraction est la séparation des parties actives de tissus végétaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales.

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : l'infusion, la digestion, la décoction, la percolation, extraction hydro-alcoolique par fermentation, entrainement à la vapeur d'eau, extraction à chaud en continu (Soxhlet), chauffage sous reflux l'hydro-distillation et la macération avec un mélange alcool-eau ou une graisse chaude (**Moller.K, 2008**).

Les produits ainsi obtenus sont relativement Impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (**Handa. SS et al, 2008**).

Il existe différentes méthodes d'extractions, parmi celles-ci on peut citer :

3.1.1– Extractions par hydrodistillation et ses variantes

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (Figure 2). (Crouzet J. , 1998).

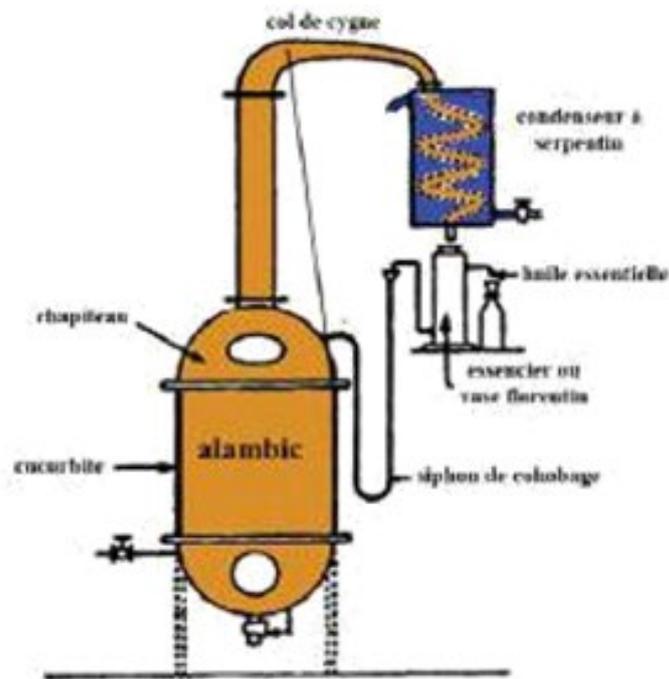


Figure 56 : Schéma du montage de l'hydrodistillation

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotrope.

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage (cohobage) de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.

Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînaables, l'hydrodistillation à pression réduite représente une bonne alternative. Cette technique est en outre utilisée pour le santal, le girofle ou les rhizomes de vétyver, de gingembre et d'iris.

La turbodistillation est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinue. Cette technique est prédestinée aux matières premières végétales difficiles à traiter (les racines, les

ligneux ou les graines, exemple : badiane de Chine ou les graines de céleri). Elle représente une alternative à des hydrodistillations de longue durée. Le réacteur contenant la matière végétale est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part, une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation (Azmir *et al.*, 2013).

3.1.2 – Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (Figure 3). Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse le libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange (eau+huile essentielle). Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Moulin J.-P *et al.*, 2002).

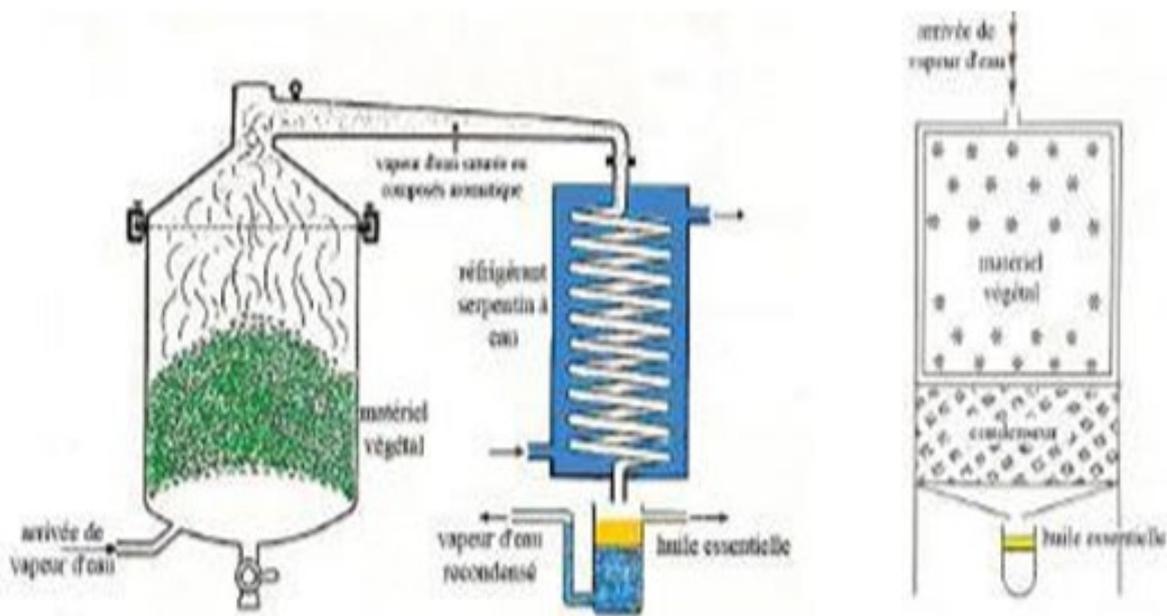


Figure 57 : Schéma du montage de l'entraînement à la vapeur d'eau (Benjlali B.2004)

3.1.3 – Extraction par expression à froid

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange, etc.) de l'écorce ou des fruits (**Dugo G. et Di Giacomo A., 2002**).

Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique. La rupture de la paroi des poches oléifères fait intervenir trois procédés :

- Une technique qui agit sur le fruit entier, elle utilise des machines exerçant une action abrasive.
- Une technique qui agit sur le fruit sans endocarpe. Elle utilise des machines exerçant une pression suffisante pour libérer l'essence.
- Un troisième procédé permet d'extraire en une seule opération l'essence et le jus sans mélanger les deux produits.

3.1.4 – Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction (**Azmir et al., 2013**).

La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint. Le mélange est alors tendu, le marc (la matière solide humide) est pressé, et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos. Cette méthode a plusieurs avantages : utilisation de mélange de solvants, contrôle de la température d'extraction et maintien des molécules thermosensibles. La macération nécessite des étapes de filtration et d'évaporation qui sont plus ou moins longues (**Handa. SS, 2008**).

3.1.5 – Infusion

L'infusion est préparée par macération de la matrice végétale pour une courte période de temps avec de l'eau bouillante. Ce sont des solutions diluées des constituants facilement solubles de médicaments bruts (Handa, 2008).

3.1.6 – Digestion

C'est une forme de macération dans laquelle la chaleur douce est utilisée pendant le processus d'extraction. Il est utilisé lorsque modérément la température élevée n'est pas répréhensible. L'efficacité du solvant est ainsi augmentée (Handa, 2008).

3.1.7– Décoction

Dans ce procédé, la matière végétale brute est bouilli dans un volume donné d'eau pour un temps défini; il est ensuite refroidi et filtré ou tendues. Ce procédé est adapté à l'extraction de constituants, stables à la chaleur non thermo dégradables et solubles dans l'eau (Handa, 2008).

3.1.8– Percolation

C'est la procédure la plus fréquemment utilisée pour extraire des ingrédients actifs dans la préparation de teintures et les extraits fluides. Un percolateur (un étroit récipient ouvert en forme de cône aux deux extrémités) est généralement utilisé. Les ingrédients solides sont humidifiées avec une quantité appropriée de solvant spécifié et on laisse reposer pendant environ 4 h dans un récipient, par la suite la masse est emballée et le haut du percolateur est fermé. Le solvant additionnel est ajouté pour former une couche superficielle au-dessus de la masse, et le mélange est mis à macérer dans le percolateur fermé pendant 24 h.

La sortie du percolateur est alors ouverte et le liquide contenu est autorisé à couler lentement. Un solvant supplémentaire est ajoutée au besoin, jusqu'à ce que les mesures percoler environ les trois quarts du volume requis du produit fini. Le marc est ensuite pressé et le liquide exprimé est ajouté à la percolation. Une quantité suffisante de solvant est ajoutée pour produire le volume requis, et le liquide mixte est clarifié par filtration ou par décantation (Handa, 2008).

3.1.9– Extraction hydro-alcoolique par fermentation

Certaines préparations médicinales adoptent la technique de fermentation pour extraire les principes actifs. Le procédé d'extraction consiste à faire tremper la matrice

végétale, sous la forme soit d'une poudre ou d'une décoction, pour une période de temps spécifique, au cours de laquelle il est soumis à la fermentation de l'alcool généré in situ; ce qui facilite l'extraction des principes actifs contenus dans la matière végétale. L'alcool ainsi produit sert également comme un agent de conservation. Dans la fabrication à grande échelle, des cuves en bois, pots en porcelaine ou récipients métalliques sont utilisés à la place des vases de terre. Quelques exemples de ces préparations sont karpurasava, kanakasava, dasmularista. Dans l'Ayurveda, cette méthode n'est pas encore standardisée mais, avec le degré extraordinairement élevé de progrès dans la technologie de fermentation, il ne devrait pas être difficile à standardiser cette technique d'extraction pour la production d'extraits de médicaments à base de plantes (Handa, 2008).

3.1.9 – Extraction par solvants organiques

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter (figure 4). Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation (Luque de Castro *et al.*, 1998).

L'extraction par solvant organique volatil reste très pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et moins fréquemment le dichlorométhane.

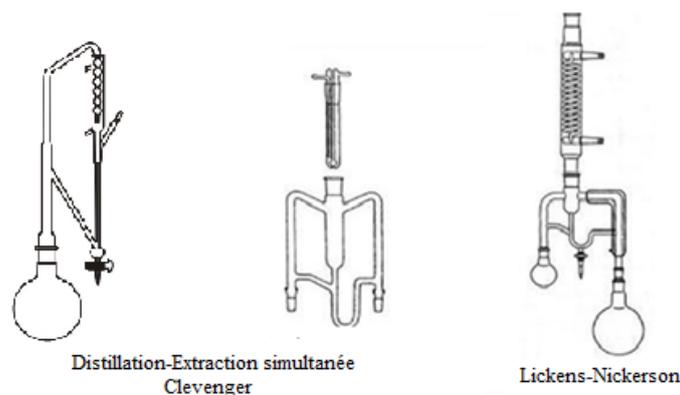


Figure 58 : Schéma des différents types de montage pour l'extraction par solvants volatils.

Dans le cas de la méthode de Clevenger (1928) qui est la procédure de distillation de référence. Bien que très efficace est largement acceptée par la communauté scientifique, la distillation selon Clevenger présente néanmoins plusieurs inconvénients. Les plus significatifs sont les longues procédures d'extraction requises et les grands volumes d'eau consommés.

3.1.10 – Extraction à chaud en continu par Soxhlet

L'extraction au Soxhlet a été développée en 1879 par le chimiste allemand Franz Ritter Von Soxhlet. Le Soxhlet a été utilisé principalement pour l'extraction des lipides mais au cours des années il a été utilisé pour extraire des composés bioactifs précieux de diverses sources naturelles (figure 4).

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière végétale (**Luque de Castro et Priego-Capote, 2010**).

Le principe de l'extraction au Soxhlet nécessite que l'échantillon soit placé dans un porte-cartouche qui est progressivement rempli de solvant. Lorsque le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire le soluté du porte-cartouche et le décharge dans le ballon de distillation. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extrait. Cette opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction soit terminée (**Grigonis, 2007**).

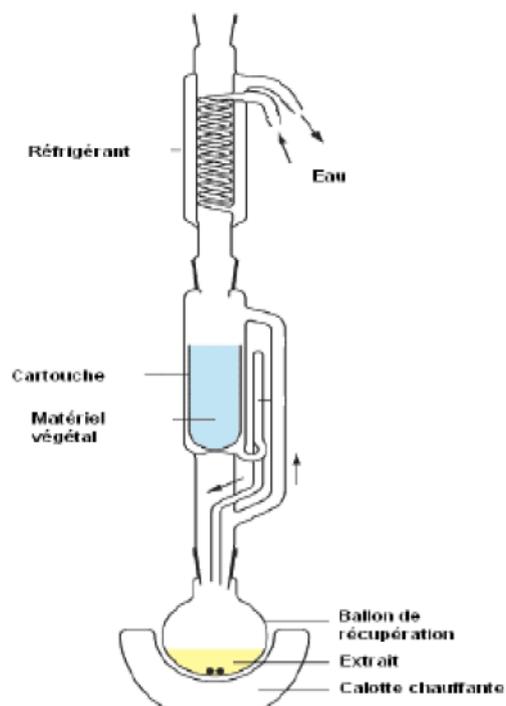


Figure 59 : Schéma du montage pour l'extraction par soxhlet

Les avantages de l'extraction au soxhlet peuvent être énumérés comme suit : contact rapide entre le solvant et l'échantillon, meilleur transfert de matières et pas d'étape de filtration après l'extraction. Cette technique présente plusieurs inconvénients tels que : temps d'extraction important, consommation importante de solvants, consommation d'énergie importante, utilisation de hautes températures pendant longues périodes et dégradation des composés thermolabiles (**Wang and Weller, 2006**).

3.1.11– Extraction par chauffage à reflux

C'est une méthode d'extraction solide-liquide à chaud. Le reflux permet la réalisation d'une extraction à une température constante (température de reflux) égale à la température d'ébullition du solvant. Ainsi le solvant s'évapore et le réfrigérant condense les vapeurs qui retombent dans le ballon, permettant au solvant d'être ainsi recyclé (figure 5). Le chauffage (augmentant solubilité et transfert de matière), l'ébullition (agitation) et le reflux permettent une extraction efficace avec un appareillage relativement simple (**Jones WP, Kinghorn AD , 2005**). Le chauffage à reflux est utilisé pour extraire efficacement des composés phytochimiques (**Gao M, Liu C.Z , 2005 et Plesa C, 2011**).



Figure 60 : Montage d'un système de chauffage à reflux.

3.2– Les méthodes alternatives dites nouvelles

L'extraction de molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps d'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents. Ces dernières années de nombreuses techniques alternatives ayant pour but de pallier à ces problèmes se sont développées. Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par solvant accélérée sont des techniques rapides et efficaces pour extraire des composés chimiques des matrices solides de plantes. Ces techniques peuvent fonctionner à haute température et/ou haute pression améliorant nettement les rendements et la cinétique d'extraction (**Wang. X, et al., 2014**).

Dans la catégorie des méthodes nouvelles on peut citer l'extraction à ultrasons, contre-courant, technique phytonique, micro-onde, accélérée par solvants, fluide supercritique, solide-liquide à moyenne pression) (**Grigonis. D,2005 et Reighard. T. S , Olesik. S. V,2006**).

Les contraintes écologiques et l'émergence de la sécurité alimentaire et industrielle, incitent les professionnels à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes. Toutes visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement (**Huie C., 2002 et Wang L, Weller CL., 2006**).

3.2.1 – Extraction assistée par ultra-sons

3.2.1.1 - Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (figure 6). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences (**Pétrier, C., Gondrexon N., Boldo P. (2008)**) :

- **Ultrasons de diagnostic:** Ces ultrasons sont aussi appelés ultrasons de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10 MHz). Les ultrasons constituent une méthode non destructive d'évaluation de propriétés physico-chimiques ou mécaniques, de mesures de concentrations, de mesures de niveaux, etc. Les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle car leur utilisation est simple et efficace (**Suslick K.S., Price G.J. 1999**).
- **Ultrasons de puissance:** Aussi appelés ultrasons de haute intensité ou de basse fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération de réactions chimiques en milieu hétérogène ou l'extraction d'arômes. Contrairement aux ultrasons de diagnostic, ces ultrasons sont capables de générer des bulles de cavitation (**Mason T. J. et Lorimer J. P. 2002**).

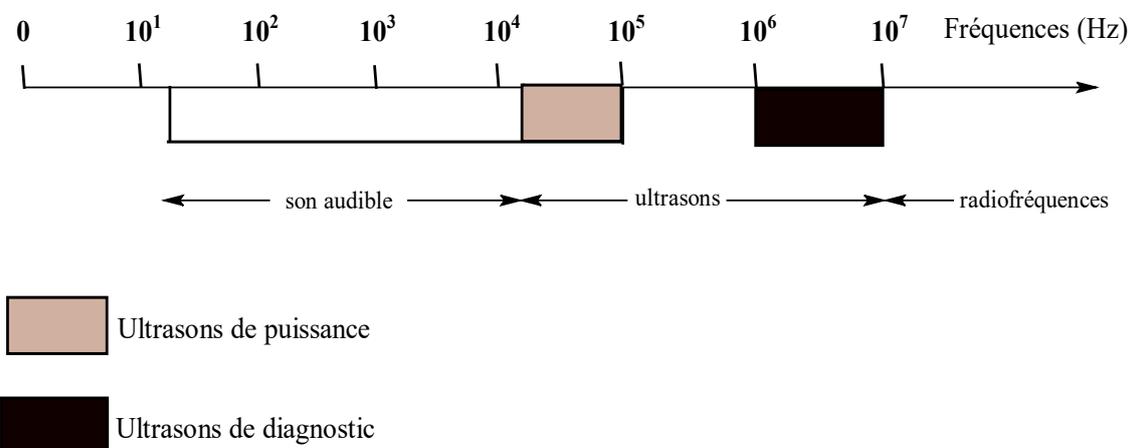


Figure 61 : Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence

L'extraction assistée par ultrasons consiste à utiliser des ultrasons à des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz, engendrant de très hautes températures (augmentation solubilité et diffusivité) et des pressions (amélioration de la pénétration et du transfert de matière) entre la matrice végétale et le solvant.

Un inconvénient de la procédure est l'effet délétère de l'énergie ultrasonore (plus de 20 kHz) sur les principes actifs végétaux par la formation de radicaux libres et dégradation des composés. Son application à grande échelle est limitée en raison des coûts plus élevés (Chemat F. 2011).

L'extraction assistée par ultrasons est cependant une méthode efficace pour extraire des composés bioactifs des plantes, phytonutriments, huiles essentielles, stéroïdes, triterpénoïdes et lipides (Chemat F. 2009). Le principe de cette procédure est illustré dans la figure 65.

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

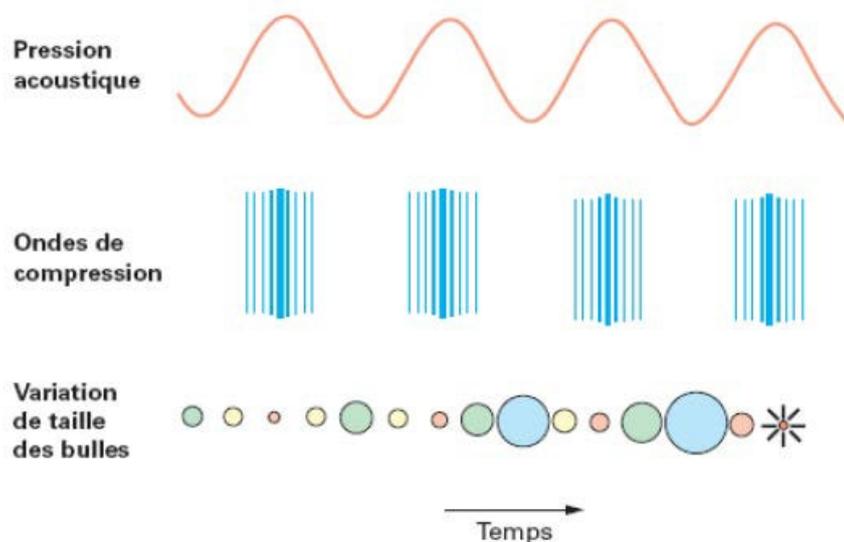


Figure 62 : Représentation schématique du phénomène de cavitation acoustique (Chemat F. et al , 2008 ; Draye et al., 2009).

3.2.2– Ultrasons en technologies d'extraction

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les premières applications ont été liées à la détermination des métaux dans les aliments. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants (**Pena.M. R., 2005**).

3.2.2.1– Extraction des huiles essentielles et des arômes

Les arômes sont des mélanges complexes de composés volatiles qui sont généralement présents en faible concentration dans les plantes aromatiques. Ces concentrations sont variables en fonction de la plante considérée et de la partie de la plante (fleur, feuille, tige, racine...). Les techniques conventionnelles d'extraction de molécules aromatiques sont souvent longues et posent un réel problème pour l'extraction de molécules thermosensibles puisque le plus souvent ces extractions se font par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur. En plus d'être longues et destructives pour les molécules sensibles, ces techniques sont également coûteuses car il faut porter puis maintenir à ébullition de grands volumes d'eau pendant de longues périodes. La technologie ultrasonore permet de pallier à certains de ces problèmes et est par conséquent de plus en plus utilisée (**Mason T.J, et al ; 2010**) (**Tab.III**).

L'extraction assistée par ultrasons a été utilisée sur de nombreuses variétés de plantes aromatiques telles que les feuilles de menthe, l'artémise ou la lavande. Les rendements en huile essentielle ont pu être légèrement augmentés pour l'artémise et la menthe (12 % pour ce dernier), quant à la lavande, des quantités deux à trois fois supérieures ont été obtenues par utilisation des ultrasons. Le second avantage des ultrasons pour l'extraction de l'huile essentielle est le fait de travailler à froid, ce qui réduit la dégradation des composés volatiles. Cet aspect est très intéressant pour les secteurs de la nutraceutique et de l'agroalimentaire car dans les deux cas des huiles très pures sont nécessaires (**Jadhav D. et al ,2009**).

Concernant les épices on peut citer l'extraction de vanilline à partir de gousses de vanille. Les rendements en vanilline étaient similaires après 1 h d'extraction assistée par ultrasons et 8 h d'extraction conventionnelle. La carvone peut également être extraite des graines de carvi de façon plus pure lors d'une extraction aux ultrasons (pas de présence de matières grasses comme dans l'extraction classique par Soxhlet (**Jadhav D. et al ,2009**)).

Tableau 14 : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes (Chemat F., 2008)

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Raisin	Composés aromatiques	US, 20 °C, 3-étapes d'extraction CH ₂ Cl ₂ . TS : 3x10 min. Valeurs moyennes (µg/L) 291 (linalol), 248 (α-terpinéol), 397 (citronellol).
Graines de carvi	Carvone & Limonène	US, 20 kHz, 150 W, 20 °C, n-hexane. TS: 60 min. Rd (mg/g): 17 (carvone) 16 (limonène).
Vanille	Vanilline	US, 20 kHz, 750 W, 25 °C, EtOH or EtOH/H ₂ O. TS: 1-2 min
Safran	Safranal	US, 35 kHz, 25 °C, H ₂ O: Et ₂ O. TS: 5x10 min. Rd : Safranal entre 40.7 and 647.7 mg/100g safran
Miel	Composés aromatiques	US, 25 °C, H ₂ O, n-pentane : Et ₂ O,

3.2.2.2– Extraction des antioxydants contenus dans les fruits et légumes

Les fruits et légumes sont riches en antioxydants et sont par conséquent intéressants dans un but nutritionnel mais ils peuvent aussi bien l'être dans un but de préservation des aliments.

Dans l'industrie agroalimentaire, de plus en plus d'attention est portée au recyclage des coproduits, eux-mêmes source intéressante d'antioxydants. Comme pour les arômes, l'extraction assistée par ultrasons des antioxydants peut être un outil avantageux dans le but d'optimiser le rendement et la pureté des extraits (Tableau15)

Tableau 15 : Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants (Chemat F., 2008).

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Peaux de citron	Composés phénoliques	Bain US, 60kHz, 15 et 40°C dans méthanol. Plus gran des quantités avec US, les basses températures permettent un meilleur rendement.
Noix de coco	Composés phénoliques	Bain US, 25 kHz, 150 W, 30°C. 22.44 mg de composés phénoliques extraits par gramme de noix de coco
Raisin et pépins de raisin	Acides tartarique et malique	Sonde US, 24 kHz, 200 W, 70°C. 194.3 ppm d'acide tartarique et 37.4 ppm d'acide malique.
Feuille d'olivier	Oleuropéin	Sonde US, 20kHz, 450 W, 40°C. Même quantité d'oleuropéine après 25 min d'extraction par US que 24h par méthode conventionnelle
Fraise	Composés Phénoliques	Sonde US, 20 kHz, 100 W. Même efficacité en 2 min que 20 h par technique conventionnelle ou 3h au CO2 supercritique
Framboise	Anthocyanes	Sonde US, 22 kHz, 650 W, 40°C. Même rendement après 200 sec avec US que 53 min par méthode conventionnelle
Tomate	Lycopène	Bain US, 40 kHz, 300 W. 90% du lycopène total extrait en 29 min, amélioration avec couplage micro ondes

Grâce à la richesse en antioxydants de ces matrices, de nombreux essais ont été menés sur différentes plantes et différentes parties de chaque plante. L'extraction assistée par ultrasons permet notamment de réduire considérablement le temps d'extraction des antioxydants. C'est le cas pour l'extraction du lycopène de la tomate, des anthocyanes de la framboise (3 min comparé à 53min) ou encore pour les composés phénoliques de la fraise (2 min comparé à 20 h) (Herrera M.C., Luque de Castro M.D. 2005).

L'action des ultrasons peut différer en fonction de la partie de la plante étudiée, ainsi ils sont plus intéressants pour extraire des composés des pépins de raisin que sur le fruit entier (Chen F. et al ,2007).

Les ultrasons permettent une meilleure diffusion du solvant dans les pépins ce qui augmente l'extraction de l'acide malique et de l'acide tartrique. En effet, l'extraction assistée par ultrasons des composés aromatiques du raisin a été comparée à l'extraction en phase solide et en immersion en phase solide. L'extraction par ultrasons a permis de meilleurs rendements en un temps réduit et 37 composés aromatiques ont pu être quantifiés dans le raisin grâce à cette technique (Palma M., Barroso C.G. (2002).

Les antioxydants ne sont pas simplement présents dans les fruits, mais ils peuvent également être présents dans les feuilles des plantes aromatiques ou encore dans les feuilles de certains arbres. L'une des plantes les plus étudiées est le romarin, à la fois pour ses propriétés organoleptiques et pour son activité antioxydante. Les ultrasons permettent non

seulement d'augmenter le rendement de l'extraction mais rend celle-ci moins dépendante du solvant ; on peut donc obtenir les mêmes extraits en utilisant des solvants moins dangereux pour l'environnement lorsque l'on utilise des ultrasons (Albu S. et al ,2004). L'oleuropéine peut également être extraite des feuilles d'olivier et l'utilisation des ultrasons permet d'obtenir le même rendement en 25 minutes qu'après 24 h de macération classique (Japon-Lujan R et al .,2006).

Les coproduits de l'industrie des jus de fruits ne sont pas seulement intéressants pour leur richesse en huiles essentielles, mais des composés phénoliques peuvent aussi être extraits des peaux d'agrumes (Ma Y.Q. et al ,2009). Dans cette étude, les ultrasons ont permis de réduire le temps d'extraction et l'augmentation de la quantité de polyphénols extraits, qui due aux plus faibles températures d'extraction utilisées. Cette température est particulièrement intéressante lors de l'extraction des antioxydants car ces molécules sont thermosensibles. D'autres bons rendements d'extraction de composés phénoliques ont été enregistrés dans la coque de noix de coco et de son de blé (Rodrigues S., 2008 et Wang J., 2008 ; Suslick K.S. et Price G.J., 1999 et Mason T. J. et Lorimer J. P. , 2002).

3.2.3 – Extraction assistée par micro-ondes

En 1986, Ganzler *et al*, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle. En 1994, Paré *et al*, ont déposé un premier brevet européen, sur « **l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes** ». Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal. C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. L'extraction assistée par microondes est un processus par lequel l'énergie microonde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales (Jawad *et al.*, 2012; Inoue *et al.*, 2010).

Dans cette technique, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les composés volatiles sont entraînés dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée.

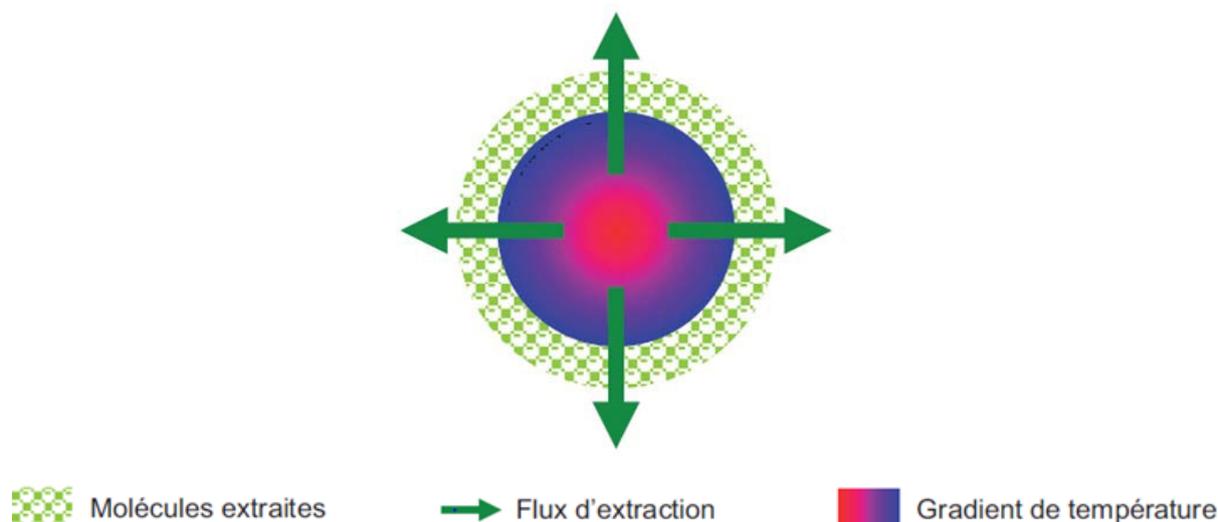


Figure 63 : Principe de chauffage par microondes (Al-Harashsheh *et al.*, 2004).

Au cours du traitement par microonde, le chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui s'accumule à l'intérieur du biomatériau, en modifiant les propriétés physiques des tissus biologiques qui brise les parois végétales et améliore la porosité de la matrice biologique et libère ainsi le contenu en huile (Herrero *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2013; Herrero et Ibanez, 2015; Gong et Bassi, 2016.). Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice et facilite l'extraction des composés entre autre les composés phénoliques (Kratchanova *et al.*, 2004 ; Mandal *et al.*, 2007).

Cette technique utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas couteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants (Yeoh *et al.*, 2008;).

Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait (Wang et Weller, C.L. 2006).

3.2.4.– Différentes techniques d'extraction par micro-ondes

Différentes techniques d'extraction par micro-ondes ont été développées et de nombreux brevets ont été déposés :

- Le procédé d'hydrodistillation par microondes est basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité

d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique (Kingston M.M. et Haswell S.J., 1997).

- Extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP (Microwave Assisted Process). Cette méthode est la plus utilisée. Si sa rapidité de mise en oeuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu ne peut réglementairement être considéré comme une huile essentielle. De plus l'utilisation de solvant organique présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés (Kingston M.M. et Haswell S.J., 1997).

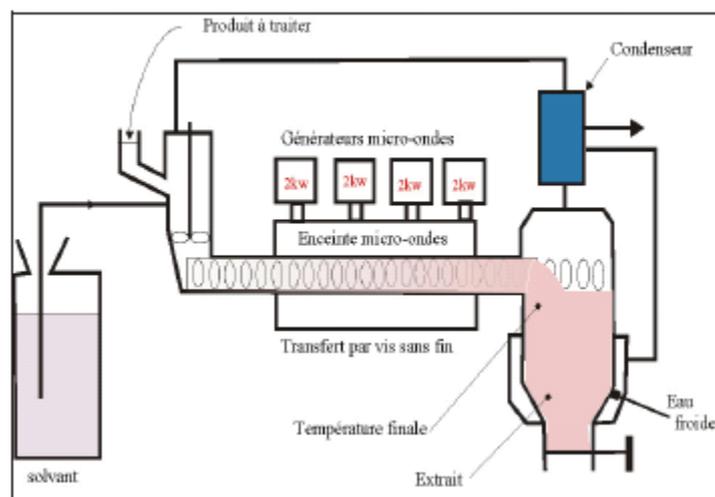


Figure 64 : Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP (Microwave Assisted Process) (Lucchesi. M., 2007).

3.2.4.1– L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD)

Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. D'après les concepteurs du VMHD l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique. Les composés responsables des notes « crues » les plus thermosensibles semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique.

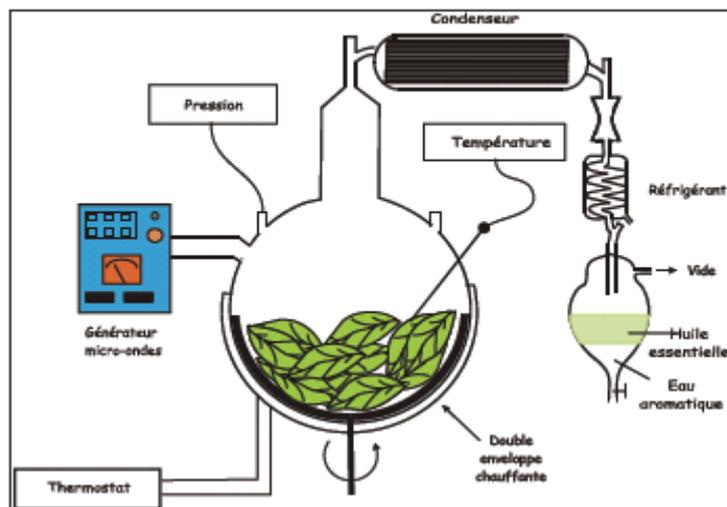


Figure 65 : Schéma du montage d'extraction selon le principe « VMHD » (Vaccum Microwave HydroDistillation) (Lucchesi.M ; 2007).

3.2.4.2– Solvant Free Extraction Microwave (SFME)

Ce procédé est le mode d'extraction le plus récent et a été développée par le groupe Chemat-Smadja à l'Université de la Réunion. Cette technique a été rebaptisée « **Dry-Dist** » et est commercialisée à travers le monde par la société Milestone (Bergame-Italie). Elle associe un four micro-ondes et une distillation sèche. L'extraction est réalisée à la pression atmosphérique, en l'absence de solvant et d'eau ajoutée. Les principaux avantages de cette technique résident dans l'augmentation de la cinétique d'extraction ainsi que son caractère plus respectueux de l'environnement (absence de solvant) qui constitue un des exemples de chimie verte.

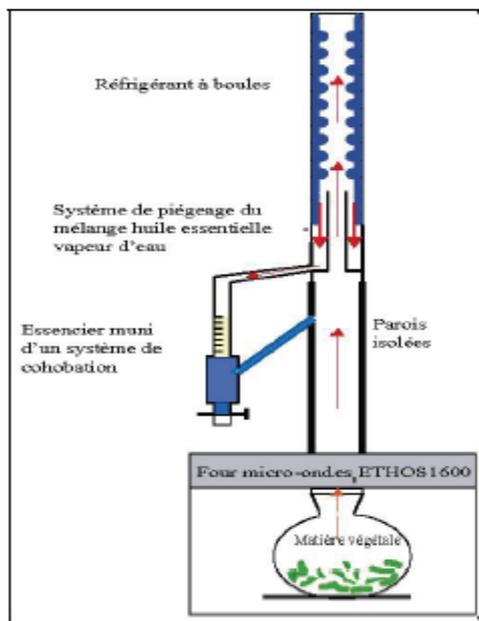


Figure 66 : Schéma d'extraction selon le principe SFME (Solvant Free Extraction Microwave) (M. Lucchesi. ; 2007)

Le mécanisme de chauffage par micro-ondes repose sur le fait que certaines molécules telles que l'eau présentent des excès et des défauts de charges dus à la différence d'électronégativité entre les atomes d'oxygène et d'hydrogène. Ces molécules polaires présentent alors un moment dipolaire ou dipôle. Les dipôles sont susceptibles de s'orienter lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique et génèrent alors un moment dipolaire induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans la direction du champ, puis se désorientent à la disparition du champ et enfin se réorientent dans l'autre sens. Il s'agit de la rotation dipolaire.

Cependant, l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par l'existence de liaisons hydrogène et de liaisons de Van der Waals qui freinent la libre rotation et conduisent à un dégagement de chaleur. L'énergie cinétique est alors transformée partiellement en chaleur. Le chauffage de l'eau présente dans la plante provoque l'éclatement des glandes contenant l'huile essentielle. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par la vapeur d'eau contenue elle aussi dans la matière végétale. Un essencier de type Clévenger permet de condenser le distillat et de récupérer l'huile essentielle par simple décantation en tenant compte la différence de densité.

Malgré l'utilisation d'un essencier de type Clévenger pour condenser et refroidir les vapeurs issues du chauffage du végétal par les micro-ondes, l'échantillon obtenu par SFME ne peut en toute rigueur être considéré comme une huile essentielle. En effet, le terme « huile

essentielle » nécessite l'utilisation du principe de l'hydrodistillation, de l'entraînement à la vapeur ou de l'expression à froid. Les deux modes d'extraction, bien que voisins, diffèrent cependant par la nature du chauffage. Or les phénomènes de solubilité des composés organiques dans l'eau sont particulièrement importants dans une hydrodistillation ou encore dans un entraînement à la vapeur (Liazid .A et al., 2011).

Dans la très grande majorité des cas, les rendements de l'extraction par micro-ondes sont proches voire supérieurs à ceux obtenus par hydrodistillation, le temps d'extraction est plus court, de l'ordre de 30 minutes alors qu'une hydrodistillation nécessite classiquement trois heures au minimum. A rendement équivalent, il est constaté une augmentation de la proportion des composés oxygénés dans les extraits obtenues par SFME (Lucchesi *et al.*, 2007). Plusieurs explications sont avancées pour expliquer ces différences :

- L'observation des végétaux par Microscopie Electronique à Balayage montre des différences en termes d'altération des glandes à huile essentielle. Celles-ci semblent totalement détruites sous l'effet des micro-ondes ;
- Les composés oxygénés plus polaires et plus solubles dans l'eau seraient distillés en priorité par rapport aux hydrocarbures terpéniques dont la température d'ébullition est pourtant plus faible.
- Dans une huile essentielle obtenue par hydrodistillation, les composés oxygénés ont une plus grande affinité que les hydrocarbures pour la phase aqueuse et se retrouve donc l'hydrolat. Lors d'une extraction micro-onde, il est ainsi possible qu'étant donné le faible volume de la phase aqueuse, les composés oxygénés qui sont souvent assez solubles dans l'eau, demeurent dans l'extrait obtenu par SFME.

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait. Cependant irradiation d'un volume important pose des problèmes techniques (Li Y., et al 2011).

3.2.5 – Extraction assistée par micro-ondes des antioxydants des végétaux :

Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux : épices de *Cuminum cyminum* L. et *Zanthoxylum bungeanum* L. par Farhat A., 2011 et Wang et col en 2006, fruits de *Xilopia* par Stashenko et col en 2004, hysope, sariette, marjolaine, sauge (*Salvia officinalis*) et thym par Collin en 2000 1991,

feuilles de *Lippia sidoïdes* par **Craveiro et col. en 1989**, menthe poivrée et persil commun par **Pare et col. en 1989**.

Une grande partie des travaux concernant le four micro-ondes et le thé vert, est rapportée sur l'inactivation des enzymes présents dans les feuilles de thé fraîches ou sèches.

Seung-Cheol Lee et coll. (2006), **Sharma. V et coll (2004)**, **Pan X., et coll. (2003)** ont montré que le traitement du thé par micro-ondes permet d'obtenir une élévation rapide de la température à l'intérieure des feuilles « *Camilla sinensis* » et de diminuer ou de supprimer l'activité enzymatique « polyphénols oxydase » (PPO) tout en limitant les réactions de dégradation thermiques des catéchines à extraire. Cette application a été réalisée à l'échelle industrielle pour garder la qualité de thé vert et éviter sa transformation en thé noir.

L'extraction des polyphénols de thé vert assistée par micro-onde a fait l'objet de deux travaux. Le premier est celui de **Xuejun Pan et coll. (2003)**. Ils ont réalisé une étude qui a pour but le développement, la validation et l'optimisation de cette nouvelle technique. Ils ont testé tout d'abord différents solvants d'extraction des antioxydants du thé vert par le four microondes et confirmé que l'extractant « Ethanol/Eau (1/1) » est le plus efficace et le plus sélectif pour l'extraction des polyphénols et de la caféine du thé vert par micro-ondes (90°C). Ils ont ensuite comparé ce nouveau procédé par chauffage conventionnel et extraction par ultrason.

Ils ont constaté que l'extraction assistée par micro-onde est plus rapide (4 min) que le chauffage conventionnel (45 min) et que l'ultrason (90 min). Enfin, ils ont conclu que l'extraction assistée par micro-ondes des polyphénols et de la caféine du thé vert est plus rapide, plus sélectif et plus efficace.

Le deuxième travail est celui de **Chan E.W.C et coll. (2007)**. Ils ont commencé par tester l'efficacité d'extraction des polyphénols du thé vert par l'eau ou le méthanol en utilisant le four micro-onde. Après une heure d'extraction, ils ont dosé les phénols totaux par le réactif de *Folin*, puis ils ont testé l'activité antioxydante de l'extrait par le DPPH. Ils ont démontré que les valeurs de dosage des phénols totaux et les valeurs d'activité antioxydante de l'extrait préparé par l'eau sont plus faibles que celles du méthanol. Enfin ils ont confirmé que le méthanol est le plus efficace et le plus sélectif pour extraire les polyphénols du thé vert par micro-ondes.

3.2.5 – L'extraction assistée par liquide pressurisé

L'extraction assistée par liquide pressurisé est une méthode très efficace. Le concept de cette technique consiste à l'application de haute pression pour que les solvants restent au-delà de leur point d'ébullition normal (Azmir *et al.*, 2013). En tenant compte du rendement, de la reproductibilité, du temps d'extraction et de la consommation de solvant, l'extraction assistée par liquide pressurisé a été considérée comme une alternative aux méthodes conventionnelles en raison d'un procédé plus rapide et d'une utilisation plus faible des solvants (Howard et Pandjaitan, 2008). L'utilisation d'une température et d'une pression plus élevée permet d'augmenter la solubilité des composés dans le solvant tout en diminuant la viscosité et la tension de surface du solvant utilisé, ce qui favorise un meilleur contact avec la matrice végétale (Mattea *et al.*, 2009; Jaime *et al.*, 2010).

L'extraction par fluide pressurisé implique une moindre utilisation du solvant par rapport à l'extraction conventionnelle par solvant et il en résulte une faible dégradation oxydative des flavonoïdes car le processus se déroule en absence d'oxygène et à l'abri de la lumière (Wang et Weller, 2006, Raynie, 2006; Stalikas, 2007). Par contre, l'utilisation de températures d'extraction élevées peut entraîner la dégradation des composés thermolabiles (Chemat *et al.*, 2011).

L'extraction par fluide pressurisé a été largement appliquée pour l'extraction des flavonoïdes. Li, W *et al.* (2012) ont rapporté que le méthanol semble être le solvant d'extraction le plus efficace par rapport à l'éthanol et à l'eau pour l'extraction accélérée par solvant des flavones de *Citrus reticulata*. Les auteurs rapportent également qu'un cycle d'extraction est suffisant. Wang *et al.* (2011) ont utilisé l'éthanol à 40% et un seul cycle d'extraction pour l'extraction accélérée par solvant de composés phénoliques de *Citrus sulcata*.

Une augmentation de la température de 80 à 160°C entraîne une augmentation du rendement d'extraction des flavones des écorces de *Citrus reticulata* (Li, Y *et al.*, 2012a). Ceci peut être expliqué par la diminution de la viscosité du solvant et l'augmentation de sa diffusivité à haute température, ce qui peut conduire à des rendements d'extraction élevés de flavones (Li *et al.* 2012a, Antunes *et al.*, 2008). Au-dessus de 160°C, le rendement en flavones diminue lentement en raison de leur dégradation par la chaleur (Li *et al.*, 2012a).

Une augmentation du temps d'extraction de 5 à 20 min entraîne une augmentation du rendement d'extraction des flavones de *Citrus reticulata* (Li *et al.*, 2012a). Cependant, le rendement d'extraction diminue lorsque le temps d'extraction est supérieur à 20 min. Cela peut être dû à la décomposition des flavones en raison d'une exposition prolongée à une haute pression ou à une haute température. Ce résultat a été confirmé par Wang *et al.* (2011) qui ont

rapporté la baisse du rendement d'extraction des phénols de *Citrus sulcata* à partir de 30 min d'extraction.

3.2.6 – L'extraction par de l'eau subcritique

L'extraction par eau sous-critique est une technique réalisée en utilisant de l'eau chaude à une température comprise entre 100 et 374°C sous haute pression pour maintenir l'état liquide (point critique de l'eau : 22,4 MPa et 374°C) (Schoefs, 2005). A de telles températures, l'eau perd sa polarité, ce qui lui permet d'agir comme solvant pour les composés à la fois polaires et non polaires (Prasad *et al.*, 2010 ; (Herrero *et al.*, 2006).

L'extraction par de l'eau subcritique est une technique largement utilisée pour l'extraction de molécules bioactives. En effet, elle représente une excellente alternative pour extraire tous les flavonoïdes, même les flavanones d'agrumes non polaires (Cheigh *et al.*, 2012). Une augmentation de la température d'extraction de 100 à 160°C sous 10 MPa pendant 10 min entraîne une augmentation de la teneur en hespéridine et en narirutine des extraits des écorces de *Citrus unshiu* (Cheigh *et al.*, 2012), tandis que au-dessus de 160°C, une diminution de la teneur en hespéridine et en narirutine a été observée. Ce phénomène peut être expliqué par la dégradation des flavanones dans les écorces de *Citrus unshiu* en raison de la température élevée appliquée. Kim *et al.* (2009) ont extrait les composés phénoliques de *Citrus pomaces* à 200°C, 1,4 MPa pendant 60 min. Une augmentation des rendements en hespéridine et narirutine a été observée en augmentant le temps d'extraction jusque 10 min. Lorsque le temps d'extraction dépasse 10 min, les rendements diminuent progressivement. Cheigh *et al.* (2012) ont rapporté qu'un temps d'extraction de moins de 10 min peut diminuer l'efficacité d'EESC en raison de la solubilisation insuffisante des flavanones. D'autre part, un temps d'extraction supérieur à 10 minutes peut provoquer la dégradation des flavanones induite par leur instabilité thermique.

Le temps d'extraction de cette technique est considérablement réduit par rapport aux méthodes conventionnelles. Le reflux répété du fluide supercritique sur l'échantillon fournit une extraction complète (Lang et Wai, 2001).

3.2.7 – Extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique : le CO₂ sous pression et à température supérieure à 31 °C, le gaz carbonique se trouve dans un état «supercritique », la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression et réfrigéré.

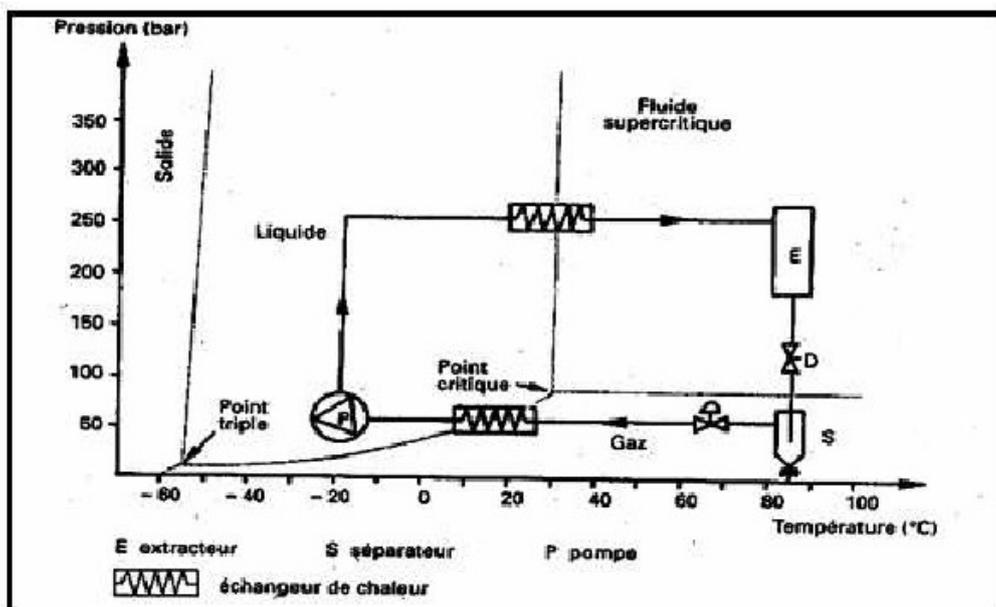


Figure 67 : Principe d'une extraction par CO₂ supercritique (pellerin., 2001)

Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend ainsi sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant (pellerin., 2001)

L'utilisation de l'extraction par CO₂ supercritique permet d'éviter la dégradation thermique et la décomposition des composés labiles du fait que l'opération est effectuée à une basse température, tandis que l'absence de la lumière et de l'oxygène empêche les réactions d'oxydation. L'efficacité de la technique d'extraction par CO₂ supercritique est associée à plusieurs paramètres, notamment la température, la pression, la présence de co-solvant et le temps d'extraction (Diaaz-Reinoso, B; et al., 2006).

L'extraction par CO₂ supercritique est adaptée pour extraire des huiles et des composés lipophiles, mais de nombreux composés phénoliques naturels sont peu solubles dans ce solvant (Pereira et Meireles, 2010). La présence de co-solvant permet alors d'améliorer le rendement d'extraction par augmentation de la solubilité. Le type de co-solvant utilisé est déterminé en tenant compte de l'affinité entre le co-solvant et les composés cibles (Pereira et Meireles, 2010). Les co-solvants les plus fréquemment utilisés sont le méthanol et l'éthanol qui induisent des interactions dipôle/dipôle et à former une liaison hydrogène avec des groupes fonctionnels polaires. Giannuzzo et al. (2003) ont indiqué que le contenu en naringine était d'environ 10,8 g naringine/kg pour l'éthanol utilisé comme co-solvant contre

9,2 g naringine/kg pour le méthanol. Un résultat similaire a également été observé pour l'extraction par CO₂ supercritique de la nobiletine et de la tangerétine des écorces de *Citrus depressa Hayata* (Lee et al., 2010). Les rendements en nobiletine et en tangerétine (14,68 mg/g) sont plus élevés avec de l'éthanol qu'avec le méthanol (12,92 mg/g).

Cette observation est confirmée par He et al. (2012) et Toledo-Guillen et al. (2010). En effet, une augmentation des concentrations de co-solvant peut améliorer les rendements d'extraction, mais la température nécessaire pour atteindre l'état supercritique est plus élevée et peut ne pas être appropriée pour les produits naturels sensibles à la chaleur.

La température optimale dépend du choix de la pression d'extraction. Cette température est comprise entre 58,6°C et 80°C pour une pression variant de 9,5 MPa à 40 MPa. Lee et al. (2010) ont constaté que 80°C (30 MPa) est la température optimale pour l'extraction de la nobiletine et de la tangerétine à partir des écorces de mandarine. Giannuzzo et al. (2003) ont conclu que la température optimale pour l'extraction par CO₂ supercritique de la naringine à partir des écorces de pamplemousse est de 58,6°C pendant 45 min à 9,5 MPa. Toledo-Guillen et al. (2010) ont indiqué que les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes des écorces d'orange sont une température de 60°C à 40 MPa, alors que He et al. (2012) ont indiqué que les conditions optimales pour extraire les flavonoïdes des écorces de pamplemousse sont une température de 80°C à 39 MPa pendant 49 min.

Lee et al. (2010) ont étudié l'effet de la pression sur le rendement d'extraction des composés phénoliques de *Citrus depressa Hayata* et ils ont rapporté qu'à 80°C, le contenu en nobiletine et en tangerétine augmente avec une pression croissante de 20 à 30 MPa. Cependant, le rendement d'extraction diminue significativement lorsque la pression augmente de 30 à 40 MPa.

Les quelques travaux disponibles portant sur l'extraction du CO₂ supercritique des composés phénoliques des écorces d'agrumes ont montré qu'il est nécessaire d'ajouter un co-solvant au CO₂ afin d'améliorer l'extraction de ces composés. En outre, l'éthanol est le co-solvant le plus utilisé quel que soit les conditions opératoires (temps, pression, température) appliquées.

3.2.8 – Extraction par Détente Eclair (Flash-Détente)

La Flash-Détente brevetée par l'INRA en 1993, fut mise au point pour extraire les arômes de bananes, de mangues ou de lichis. La Flash-Détente (figure 13), est un procédé qui se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85–90°C. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (~ 30 mbar) du matériel végétal

(fruits, légumes, plantes...etc). Cette mise sous vide provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé et une chute de la température du milieu. Cette perte d'eau engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires. Les eaux d'évaporation sont récupérées séparément par condensation et sont particulièrement riches en composés volatils aromatiques (eaux aromatiques) **(Brat P., 2001)**.

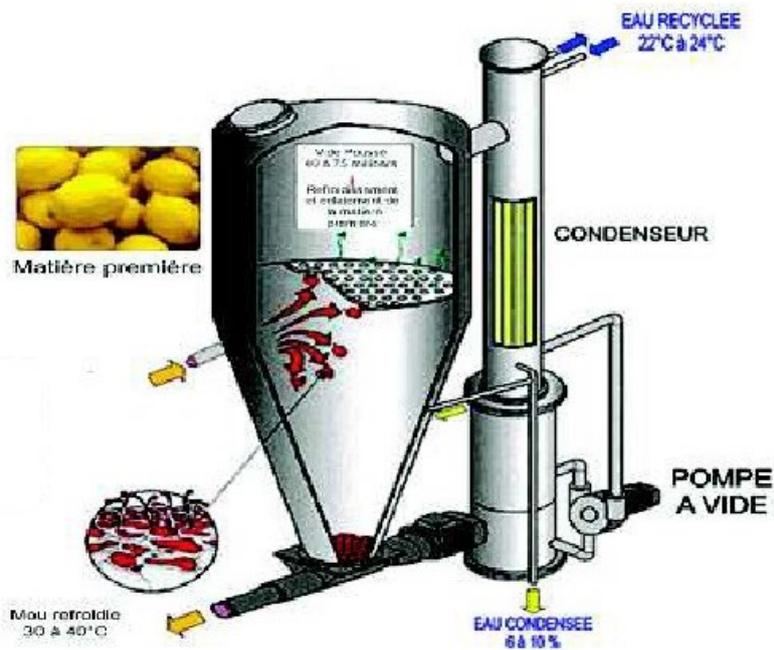


Figure 68 : Schéma de l'extraction par Flash-Détente (B rat P., 2001).

Des essais ont été effectués par le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement-France (CIRAD) pour l'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes (pomelo, orange, mandarine, citron). Après extraction et condensation les huiles essentielles seront récupérées sous forme d'émulsion aqueuse, puis purifiées par centrifugation. Les rendements d'extraction obtenus à partir d'écorces de citron, d'orange, de mandarine et de pomelo sont respectivement égaux à 44%, 29%, 33%, et 27%. Après déterpénation, les huiles essentielles extraites par le procédé Flash-Détente sont de qualité supérieure à celles des huiles fraîchement pressées et ce, avec des proportions relatives supérieures en aldéhydes mon et sesquiterpéniques **(Allaf et al., 1989 et allaf 1994)**. Comparée aux autres procédés conventionnels la La flash-Détente est relativement rapide, et donne des rendements supérieurs. En effet, Cette technique permet de produire simultanément de la purée de fruits aux propriétés sensorielles renforcées avec des rendements avoisinant les 75%.

Ce procédé est comparable à l'extraction par CO₂ supercritique au niveau de la qualité des extraits, alors que la consommation énergétique est inférieure à celle de la distillation et de l'entraînement à la vapeur (**Rezzoug, 1998**). La flash-Détente présente donc un intérêt technologique et économique en améliorant et en développant les propriétés sensorielles et nutritionnelles des produits qui en sont issus (**Rezzoug, 2005**).

3.2.9 – Extraction par Détente Instantanée Contrôlée (DIC)

Cette technique d'extraction (DIC) est utilisée en vue d'extraire les arômes et les huiles essentielles à partir de végétaux naturels préalablement séchés.

Ce procédé se distingue par un traitement thermique très localisé, durant un temps réduit (quelques dizaines de secondes). L'auto-vaporisation qui accompagne l'extraction par Détente Instantanée Contrôlée implique la séparation liquide/solide et permet donc l'extraction des composés spécifiques (**Allaf 1994**).

Comparé aux autres procédés traditionnels, la DIC (figure 72), est relativement rapide, et donc nettement flexible. Avec un rendement supérieur, cette technique est comparable à l'extraction par CO₂ subcritique au niveau de la qualité de l'extraction, alors que la consommation énergétique est inférieure à celles de la distillation et par entraînement à la vapeur.

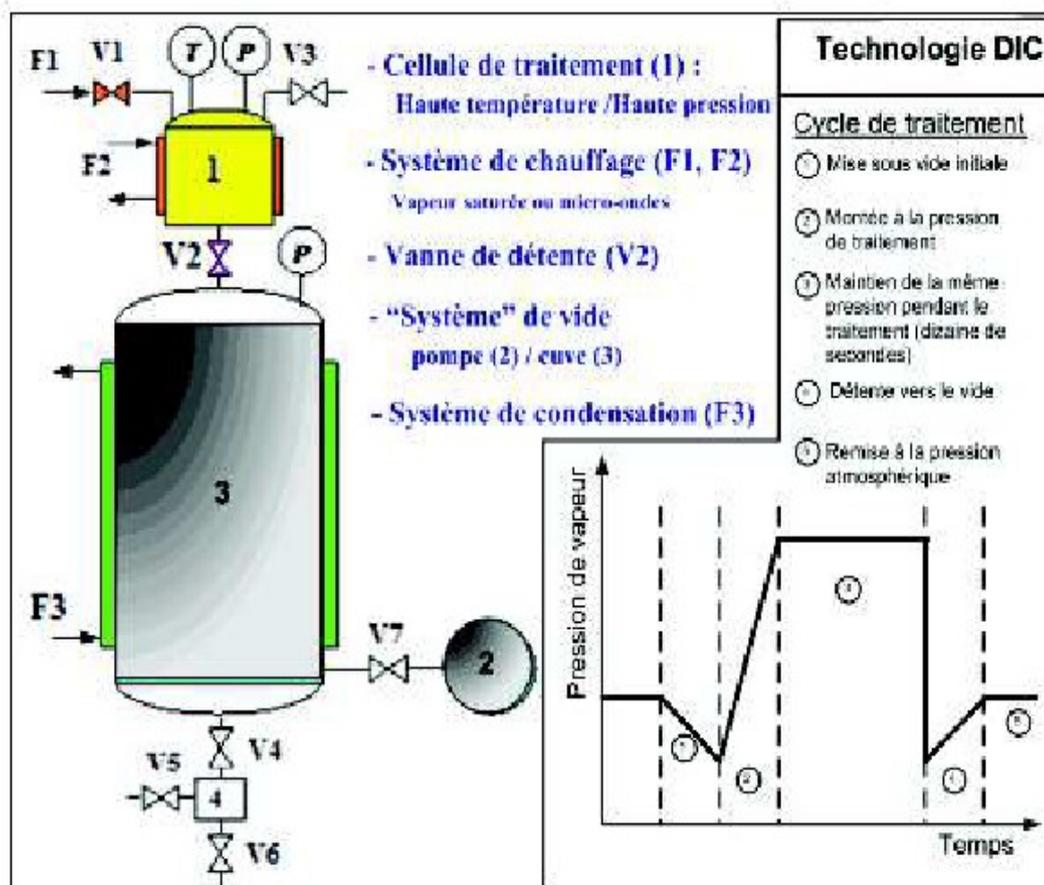


Figure 69 : Schéma de l'extraction par DIC.

La détente instantanée trouve des applications diverses dans le séchage des fruits et légumes, et dans la décontamination microbienne. Elle offre également des avantages économiques (vitesse et coût) et qualitatifs (stérilisation, qualités organoleptiques) (Rezzouget al , 2005).

En 2012, Allaf et al. ont rapporté que l'utilisation séquentielle de DIC (éthanol 80%, m/v: 20:1, 40°C, 60 min, 150W) pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange améliore les rendements en naringine et en hespéridine. En effet, les teneurs des écorces d'orange traitées par DIC sont de $0,825 \pm 1,6 \times 10^{-2}$ g/g bs pour l'hespéridine et $6,45 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ g/g bs pour la naringine par rapport à $0,64 \pm 2,7 \times 10^{-2}$ g/g bs et $5,7 \times 10^{-2} \pm 1,6 \times 10^{-3}$ g/g bs, respectivement dans les échantillons extraits par solvant. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que le traitement DIC conduit à une expansion de la structure cellulaire et permet la modification de leurs structures, provoquant ainsi leurs texturations et facilitant ainsi les opérations de transfert de matière (Allaf et al. 2013).

3.2.10 – Extraction par technique phytonique

Ce nouveau procédé se base sur un solvant **l'hydrofluorocarbone-134a** qui représente une nouvelle technologie pour optimiser ses propriétés remarquables dans l'extraction de matières végétales offrant ainsi des avantages environnementaux significatifs, des prestations de santé et de sécurité par rapport aux procédés traditionnels pour la production d'huiles de haute qualité naturelle parfumées, des arômes et des extraits biologiques.

Les produits principalement extraites par ce processus sont des éléments parfumés d'huiles essentielles et d'extraits biologiques ou phytopharmaceutiques qui peuvent être utilisés directement sans la poursuite du traitement physique ou chimique (**France-Ida J., 1996**).

Les propriétés de la nouvelle génération de fluorocarbones solvants ont été appliquées à l'extraction de matières végétales. Le noyau du solvant est le 1,1,2,2-tétrafluoroéthane, mieux connu sous le nom hydrofluorocarbone-134a (HFC-134a). Ce produit a été développé pour remplacer les chlorofluorocarbures. Le point de ce solvant d'ébullition est de -25 ° C. Il n'est pas inflammable ou toxique. Contrairement aux chlorofluorocarbones, il ne détruit pas la couche d'ozone. Il a une pression de vapeur de 5,6 bar à la température ambiante. Selon la plupart des normes c'est un mauvais solvant. Par exemple, il ne se mélange pas avec les huiles minérales ou de triglycérides et il ne se dissout pas les déchets végétaux.

Le procédé est avantageux en ce que les solvants peuvent être personnalisés: en utilisant des solvants modifiés avec le HFC-134a, le processus peut être très sélectif dans l'extraction d'une classe spécifique de phytoconstituants.

De même, d'autres solvants modifiés peuvent être utilisés pour extraire un spectre plus large de composants. Les produits biologiques fabriqués par ce procédé ont extrêmement faible de solvant résiduel. Les résidus sont invariablement moins de 20 parties par milliard et sont souvent en deçà des niveaux de détection. Ces solvants sont ni acide ni basique et, par conséquent, avoir des effets potentiels de réaction seulement minime sur les matières botaniques. La seule utilité nécessaire pour faire fonctionner ces systèmes est de l'électricité et, même alors, ils ne font aucun consomment beaucoup d'énergie. Il n'y a pas de place pour l'évacuation des solvants. Même si certains solvants ne s'échappent, ils ne contiennent pas de chlore et ne posent donc aucun danger pour la couche d'ozone. La biomasse des déchets de ces plantes est sec et "respectueux de l'environnement" à manipuler (**Collin G.2000**)

4 – Procédés d'extraction des composés phénoliques

Le procédé conventionnel de fabrication d'extraits végétaux riches en polyphénols, à partir de coproduits de l'industrie, consiste en plusieurs étapes successives (figure 73) :

- Un pré-traitement de la matière première (facultatif) a pour objectif d'augmenter les surfaces d'échange pour faciliter les phénomènes de transfert de matière lors de l'étape subséquente d'extraction. Le broyage, précédé par un séchage dans le cas d'une biomasse humide, est couramment utilisé en industrie.
- Une étape de diffusion permet alors le transfert par solubilisation des composés phénoliques du solide vers un liquide « porteur », dit solvant d'extraction. A ce stade, l'extraction n'est pas sélective et d'autres composés (polysaccharides, acides organiques, protéines...) peuvent être solubilisés dans la phase liquide dépendamment de leur affinité pour le solvant.
- Une séparation du solide « appauvri », voire épuisé en composés phénoliques, et du solvant chargé en soluté est alors nécessaire. Cette étape est réalisée par pressage, suivi d'une centrifugation et/ou d'une filtration membranaire. Le résidu solide peut, quant à lui, être utilisé en tant que substrat de méthanisation, épandu ou composté, ou encore séché (tambour rotatif à air chaud) pour être ré-utilisé en tant qu'aliment pour bétail.
- Une purification de la phase liquide permet, par la suite, « d'isoler » les composés phénoliques et d'éliminer la fraction de solutés indésirables extraite lors de l'étape de diffusion. Cette purification peut être réalisée à l'aide de résines d'adsorption, par précipitation, par des procédés membranaires, ou encore par extraction liquide/liquide. Cette étape est optionnelle, dépendamment de la qualité des extraits recherchée. A noter qu'une concentration préalable du solvant peut être requise.
- Le(s) solvant(s) est (sont) ensuite évaporé(s) pour être éventuellement recyclé(s) dans les étapes d'extraction et/ou de purification. La matière sèche de l'extrait doit atteindre environ 15-30 % avant séchage.
- Un séchage de la solution (atomiseur, séchage sous vide, ou éventuellement lyophilisation) permet l'obtention d'un extrait sous forme de poudre. A ce stade, des excipients (dextrines, silice) peuvent être ajoutés pour faciliter l'étape de séchage, éviter la reprise en masse de la poudre et/ou standardiser la teneur en principes actifs.

Si l'ensemble du procédé influence les coûts de production, les 3 premières étapes (pré-traitement, diffusion et séparation solide/liquide) de fabrication sont déterminantes sur les rendements de production et permettent de moduler la qualité des extraits obtenus.

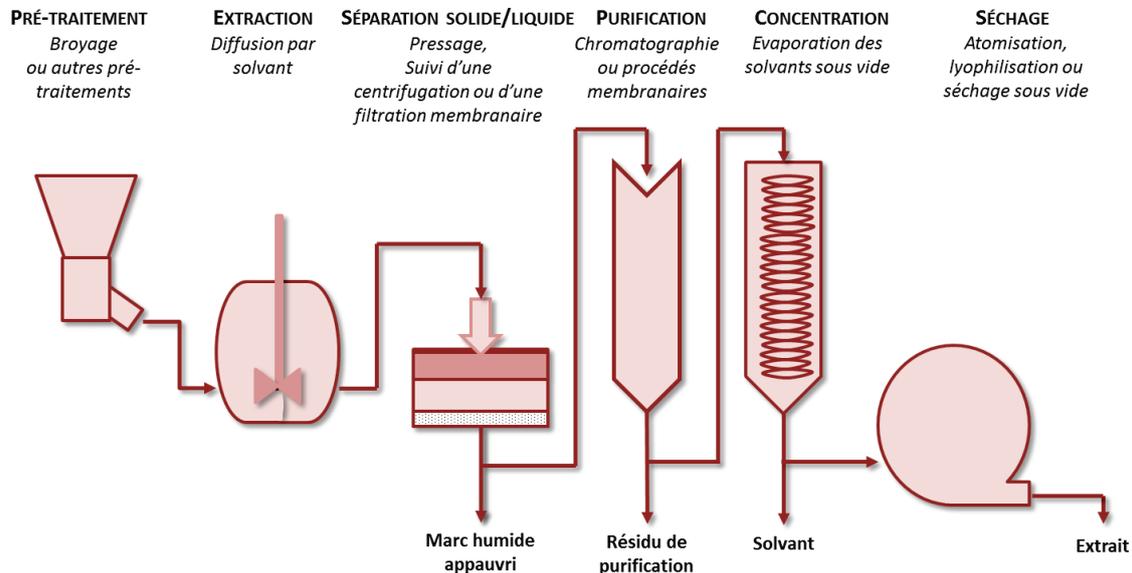


Figure 70 : Représentation schématique du procédé industriel d'extraction de composés végétaux.

4.1 – Pré-traitement mécanique de la matière première : le broyage

Le broyage est la technique de pré-traitement la plus classiquement utilisée industriellement pour améliorer les rendements d'extraction des bio-composés et pour diminuer les temps de diffusion. L'action mécanique induite par le broyage améliore le transfert de matière en augmentant la surface de contact entre solvant et solide et en diminuant la distance de pénétration du solvant dans le solide. En (2007) **Bucić-Kojić et al** ont montré que plus la taille de particules des pépins de raisin était petite (0.16 – 0.125 mm), plus les rendements d'extraction en composés phénoliques étaient intéressants. A noter toutefois que les particules excessivement broyées tendent à s'agglomérer et à réduire le transfert de solvant à l'intérieur de la matrice solide. Lors d'une extraction en continu à partir de pellicules de raisin, ces phénomènes d'agglomération peuvent aussi entraîner des flux préférentiels et des zones mortes au sein de la cellule d'extraction (**Pinelo M. et al., 2005a**). Egalement, la présence de fines particules en suspension dans le solvant peuvent être à l'origine de difficultés lors des étapes subséquentes de la filtration et de purification.

D'autre part, le broyage peut conduire à la surchauffe de la matrice végétale notamment du fait de la libération d'énergie induite par un sur-broyage de la matrice (**Bhattacharya S.,**

2014). Cette surchauffe peut être à l'origine d'une dégradation et/ou d'une perte de fonctionnalité des composés phénoliques thermosensibles (Khanal R.C. *et al.*, 2010). De plus, une étape de séchage préliminaire, également associée à un sur-chauffage de la matrice, est souvent nécessaire pour faciliter le broyage et limiter sa consommation énergétique (Chakkaravarthi A. *et al.*, 1993; Ngamnikom P. *et al.*, 2011; Walde S. *et al.*, 2002). De ce fait, le broyage n'est pas systématiquement utilisé en industrie et reste une étape facultative dans le procédé classique de fabrication des extraits végétaux.

4.2 – Extraction des composés phénoliques par solvant (cas des flavonoïdes et des acides phénoliques)

La littérature montre une diversité de techniques pour une même classe de substances naturelles. En effet Plusieurs revues ont été publiées sur l'analyse des composés phénoliques dans les plantes et dans les aliments à base de plantes (Van Sumere et al. 1978, Harborne 1989, Waterman et Mole 1994, Macheix et al. 1990, Lee et Widmer 1996, Harborne 1998,).

Nous présentons dans ce qui suit un aperçu non exhaustif de quelques techniques d'extraction des flavonoïdes que nous avons trouvé dans des travaux de la littérature.

Herrmann (1976, 1988 et 1989) et Waksmundzka-Hajnos (1998) ont passé en revue l'analyse des acides hydroxycinnamique et hydroxybenzoïque dans les plantes et les aliments à base de plantes. L'analyse des flavonoïdes a été largement revue par Markham (1982, 1989 et 1998), par Harborne (1988, 1994) et par Robards et Antolovich (1997). L'analyse des composés phénoliques dans la matrice alimentaire crue ou transformée commence par l'extraction. Ceci fera l'objet du paragraphe suivant.

4.2.1– Extraction et hydrolyse des Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement des composés stables et peuvent être extraits de matériel végétal avec des solvants froids ou chauds. Les solvants appropriés sont des mélanges aqueux contenant de l'éthanol, méthanol, acétone ou diméthylformamide (Robards et Antolovich 1997).

L'extraction de flavonols a été réalisée par macération de l'échantillon de fruit ou de plante fraîche non séchée dans le solvant d'extraction (Wildanger et Herrmann 1973, Bilyk et Sapers 1986, Treutter et al.1988, Dick et al.1987, Price et coll. 1998a,b et 1999), en extrayant une aliquote d'un échantillon de fruits frais homogénéisé (Amiot et al. 1995, Heinonen et coll. 1998) ou par extraction d'un échantillon lyophilisé (Hertog et al.1992a, b, Crozier et coll. 1997, Justesen et al. 1998, Price et al. 1998, Ewald et al. 1999).

L'analyse quantitative des glycosides de flavonol dans les baies et les fruits est difficile car la plupart des composés de référence ne sont pas disponibles dans le commerce. De plus, plus de 30 flavonols différents des glycosides ont été identifiés dans les fruits (Macheix et al. 1990). L'hydrolyse des glycosides de flavonol pour leurs aglycones correspondants offrent une méthode pratique pour la quantification des flavonols dans les aliments (Hertog 1994, Robards et Antolovich 1997). L'hydrolyse des flavonols avec de l'acide chlorhydrique (HCl) a été décrite par Harborne (1965).

Wildanger et Herrmann (1973) et Bilyk et Sapers (1986) ont étudié les teneurs en flavonols des baies en utilisant une hydrolyse acide mais sans optimisation de la procédure d'extraction. Hertog et coll. (1992a) a optimisé l'extraction dans des conditions d'hydrolyse acide (dans du méthanol aqueux avec HCl) pour l'analyse des flavonols et flavones dans les fruits et légumes lyophilisés (Hertog et al. 1993a,b). L'extraction et l'hydrolyse dans le méthanol aqueux avec HCl a également été appliqué pour les études des aglycones flavonoïdes dans les fruits et légumes par Justesen et al. (1998) et Ewald et al. (1999).

Rommel et coll. (1993a, b, c) a utilisé une hydrolyse alcaline (NaOH 2N) pour étudier les flavonols, les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques dans le jus de framboises. Le taux d'hydrolyse acide / base des glycosides dépend de la force acide / base, nature du fragment sucre et sa position dans le noyau flavonoïde. Les glucuronides résistent à l'acide hydrolyse mieux que les glucosides qui sont rapidement clivés (Hertog 1994, Robards et Antolowich 1997).

L'hydrolyse enzymatique offre une méthode rapide pour le clivage de monosaccharides spécifiques de O-glycosides flavonoïdes. En effet, Manach et al. (1998) et Erlund et al. (1999) ont utilisé l'hydrolyse enzymatique avec la β -gluronidase et la sulfatase pour étudier les flavonols dans le plasma humain.

Sreedevi.E et Rao.J.T, (2000) ont isolé un flavanone glycoside à partir des graines de *Gliricidia maculata*, par extraction du matériel végétal avec EtOH 95% pendant 20h. L'extrait concentré est extrait respectivement par le chloroforme et l'acétone. Le résidu est dissous dans le MeOH et dilué avec Et₂O donnant un précipité (flavanone glycoside).

Moreira et coll (2000), ont pu extraire des flavonoides du *P. lhotzkyanum* successivement dans l'hexane et le méthanol à température ambiante. Les extraits de MeOH ont été évaporés à sec sous vide et dissous dans MeOH/H₂O (70:30) et extraits successivement avec l'hexane, CH₂Cl₂, AcOEt et n-BuOH. L'extrait de CH₂Cl₂ a été fractionné sur colonne de gel de silice et élué avec un gradient de CH₂Cl₂-MeOH.

Parmi les protocoles adaptés pour l'extraction des flavonoïdes, il y a l'exemple de celui de **Magalhaes. F et coll (2000)** qui, à partir des racines sèches de *Lonchocarpus atifolius*, utilise successivement l'éther de pétrole (30-60C), CH₂Cl₂ et MeOH pendant 60 h dans un appareil de Soxhlet. Après évaporation du solvant, l'extrait d'éther obtenu est une huile jaune visqueuse, l'extrait de dichlorométhane et celui de méthanol sont une gomme brune. Une partie de l'extrait d'éther a été soumise à la chromatographie sur gel de silice élué avec l'éther et dont la polarité d'éluant a été graduellement augmentée par l'addition de CH₂Cl₂, AcOEt et MeOH pour fournir 283 fractions réduites à leur tour en 43 fractions. L'analyse a permis d'isoler 12 flavonoides.

En 2000, N. Fonseca et coll ont isolé des flavonoides à partir de *Araucaria angustifolia* au moyen d'éthanol à température ambiante. L'extrait brut est suspendu dans un mélange méthanol/eau (4:1, 300 ml) divisé avec de l'hexane (3x300 ml) et du dichlorométhane (3x300 ml). La fraction de dichlorométhane a été soumise à la chromatographie sur colonne élué avec du (CH₂Cl₂: MeOH) aux polarités croissantes ensuite à la chromatographie sur couche mince pour donner deux composés et leurs isomères.

En **2001, Z. Akdemir et coll** isolèrent deux flavonoides en extrayant le matériel végétal avec MeOH. Après l'évaporation sous vide, le résidu a été divisé entre HCCl₃ et H₂O, la phase aqueuse lyophilisée et analysée par CC (polyamide) élué avec H₂O puis avec un mélange (H₂O-MeOH) de polarité croissante.

En **2002, M. Soliman et coll** isolèrent deux kaempferol acylylé glycoside à partir des fleurs de *Foeniculum vulgare* et *F. Dulce* avec EtOH (95 %) donne un résidu sec. Une masse de 5g de résidu est suspendue dans l'eau (250ml) et divisé respectivement avec de l'éther de pétrole, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et du n-Butanol. Le fractionnement d'extrait acétate d'éthyle a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur colonne en utilisant comme éluant le chloroforme et l'acétate d'éthyle de polarité croissante (5% à 100%). Les deux composés ont été purifiés avec chromatographie sur colonne (CC) après fractionnement.

P. Sauleau et coll (2003) ont isolé trois flavonoides à partir de la partie aérienne du *Tanacetum parthenium* macérée avec de l'acétate éthylique à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration et évaporation du solvant, l'extrait a subi une deuxième macération avec le même solvant. Les extraits ont été dissous dans le MeOH. L'extrait méthanolique a été évaporé sous vide et le résidu a été partagé entre l'eau et le chloroforme. La partie chloroformique est fractionnée élué avec le chloroforme.

En **2003, M. L. Crublet et coll** isolèrent trois Glycosides acylés de flavonol à partir de la feuille de *Planchonia grandis*. Les feuilles ont été macérées à température ambiante dans

de l'éther de pétrole pendant 24 heures. Ces dernières, délipidées, sont bouillies dans un mélange MeOH /H₂O (40:10) pendant 15 heures. Après refroidissement et filtration, l'extrait aqueu-méthanolique est évaporé pour fournir un résidu qui est dissous à son tour dans du MeOH. La solution méthanolique est ajoutée à l'acétone pour donner un précipité, et une partie de l'extrait obtenu est purifiée par VLC. L'extrait est soumis à la CC utilisant un gradient de CH₂Cl₂ / MeOH qui fourni un mélange des flavonoïdes qui sont purifiés par HPLC.

A. Yenesew et coll (2004), ont isolé des flavonoides à partir des tiges d'*E.abbyssinica* par percolation froide avec l'acétate d'éthyle, après évaporation du solvant sous pression réduite. Une portion de l'extrait a été fractionnée par CC élué avec n-hexane par une augmentation de polarité (10%,20%,30%,40%,50%,60%,80%et100%) de dichlorométhane. Une des fractions subit une chromatographie sur gel de silice. Ce dernier, imbibé par l'acide oxalique élué avec 2% d'acétate d'éthyle dans l'hexane et purifié avec PTLC (5% d'acétone dans l'hexane), a donné des composés purs (flavonoides).

Une technique, réalisée par **A. Ponce et coll (2004)** pour l'isolement de quatre flavonoides, utilise un matériel végétal écrasé qui est ensuite extrait avec EtOH 98% à température ambiante pendant 4 jours (1.5 de EtOH pour un gramme de matériel végétal séché). L'extrait d'éthanol obtenu individuellement de tige et des racines de *B. alba* ont été filtré et évaporé, le résidu dissoudre dans l'eau (150ml). Les solutions aqueuses ont été alors extraites successivement avec l'hexane, AcOEt et CH₂Cl₂ (3x50ml). Les fractions organiques obtenues ont été combinées dans l'hexane.

Les fractions d'AcOEt et CH₂Cl₂ sont évaporées à sec et analysées par CCM éluées avec AcOEt-CH₂Cl₂-HCO₂H (8 :12 :1). Les composés d'extrait d'AcOEt ont été séparés par la chromatographie préparatif CCM. Après l'évaporation des fractions organiques combinée, les quatre composés principaux ont été obtenus.

En 2004, **M. Bassomo et coll**, ont isolé et caractérisé neuf flavonoïdes à partir des feuilles de *Ochna afzelii* découpées, séchées à l'air libre puis finement broyées. La poudre obtenue a été extraite au MeOH à froid pendant 48 heures. La pâte verte foncée a été lavée à l'éther éthylique et la partie insoluble a été fractionnée par CC sur gel de silice avec un gradient CH₂Cl₂ / MeOH de polarité croissante.

M. Chacha et coll (2005) ont réalisé une extraction à partir des tiges sèches broyées en poudre de *Erythrima latissima* utilisant un mélange HCCl₃/ MeOH (1:1). Après évaporation du solvant, le résidu de couleur marron a été dissous dans l'eau et divisé successivement entre HCCl₃ et n-BuOH. L'extrait de HCCl₃ subit une chromatographie par

colonne normale en éluant HCCl_3 / EtOAc (6:1). Quatre composés flavonoïdes ont été isolés après une analyse par CCM des résultats de fractionnement].

M. Machado et coll (2005) isolèrent quatre flavonoïdes : chalcone-flavone et biflavone à partir des feuilles de *Aristolochia ridicula* par extraction exhaustive à température ambiante successivement avec de l'hexane, l'acétone et EtOH et, les extraits étaient alors individuellement concentrés. L'extrait acétonique brut a été partiellement dissous dans MeOH/H₂O (40:10) pour donner une solution et un précipité. La fraction soluble a été ajustée sur MeOH-H₂O (3:2) et lavée avec CHCl_3 concentré puis fractionnée sur de Sephadex Lh-20 (MeOH) pour donner quatre produits.

En 2005, T. Ngadjui et coll séparent des chalcones et flavones à partir des tiges du *Dorstenia angusticornis* et *Dorstenia barteri*. Un kilogramme de chaque plante a été successivement macéré dans CH_2Cl_2 / MeOH (1:1) et MeOH respectivement pendant 24 heures et 4 heures à température ambiante. Les extraits ont été combinés et évaporés à sec jusqu'à l'obtention d'un résidu vert foncé. Une partie du résidu est soumise au VLC et éluee avec de l'éther de pétrole /40-60/ acétate d'éthyle (mélange), EtOAc et MeOH pour donner 54 fractions. L'analysé par CCM a permis d'identifier 5 produits purs.

Lapornik B. et al. (2005) ont montré qu'une extraction aqueuse à température ambiante, à partir du marc de raisin, conduisait à l'obtention d'un extrait contenant 340.2 ± 5.6 mg de polyphénols totaux et 78.6 ± 8.6 mg d'anthocyanes par litre de solution, respectivement, après 12h de macération à température ambiante. Dans les mêmes conditions, un mélange éthanol/eau (70:30) a permis de multiplier par 4 la concentration en composés phénoliques totaux (soit 1448.6 ± 5.6 mg/L) et par 12 la concentration en anthocyanes (995.1 ± 9.2 mg/L). Un mélange binaire méthanol/eau (70:30) permet d'accroître les rendements en composés phénoliques totaux (jusqu'à 2025.5 ± 8.6 mg/L après 12h de macération) mais ne permet pas d'améliorer l'extractabilité des anthocyanes (**Lapornik B. et al., 2005**). L'augmentation de la concentration d'alcool d'un mélange hydro-alcoolique réduit la constante diélectrique de ce mélange et augmente la solvation des molécules de polarité inférieure à l'eau, comme c'est le cas pour les polyphénols (**Cacace J. et al., 2003**). D'autre part, le méthanol semble être un meilleur solvant que l'éthanol pour l'extraction des monomères de flavan-3-ols (catéchine, l'épicatéchine et l'épigallocatechine) à partir de pépins de raisins, tandis qu'un mélange acétone/eau (70:30) permettait une récupération maximale des composés phénoliques totaux, et particulièrement des procyanidines (**Kallithraka S. et al., 1995**).

4.2.2 – Extraction et hydrolyse des acides phénoliques

Les solvants les plus couramment utilisés pour l'extraction des acides phénoliques des matrices végétales sont l'éthyle acétate (Azar et al.1987, Fernández de Simón et al.1990, 1992), éther diéthylique (Fernández de Simón et coll. 1990, 1992), du méthanol ou du méthanol aqueux (Kuninori et Nishiyama 1986, Torres et Al. 1987, McRae et al. 1990, Tomás-Lorente 1992).

L'hydrolyse enzymatique avec la glucosidase ou l'hydrocinnamoyl-quinase estérase a été effectuée pour l'analyse des acides phénoliques (**Kanes et al.1993**). Cependant, l'hydrolyse acide et alcaline est la plus couramment utilisée pour la détermination des acides phénoliques dans les plantes (**Lee et Widmer 1996**). L'hydrolyse acide a été effectuée en chauffant l'échantillon avec HCl pendant 2 h (**Kuninori et Nishiyama 1986**).

L'hydrolyse de l'acide benzoïque et des esters d'acide cinnamique avec un alcali peut être effectuée avec NaOH à température ambiante pendant 4 à 24 h (**Seo et Morr 1984, Torres et al. 1987, Peleg et al.1991, Roussef et al. 1992a, b, Rommel et Wrolstad 1993a**) ou pendant 90 min à 60°C sous atmosphère inerte (**Kuninori et Nishiyama 1986**).

Rommel et Wrolstad (1993a) ont testé l'hydrolyse acide par HCl et l'hydrolyse basique par NaOH dans l'analyse de la composition phénolique (acide ellagique, acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, flavonols et flavan-3-ols) de jus de framboise rouge. Le motif phénolique de l'échantillon qui a subi une hydrolyse alcaline était très similaire à celui de l'échantillon hydrolysé à l'acide du même jus. Un seul composé d'acide ellagique a été hydrolysé plus efficacement dans les conditions alcalines que dans les conditions acides (**Rommel et Wrolstad 1993a**).

Hollman et Venema (1993) ont testés l'extraction et l'hydrolyse acide de l'acide ellagique des noix et des baies (fraise, mûre, rouge framboise) en utilisant différentes concentrations de HCl et de méthanol aqueux avec une variation de période d'hydrolyse. Les caractéristiques d'hydrolyse des ellagitanins de noix (optimum 5 M HCl dans 57% de méthanol aqueux pendant 1 h) différaient de ceux des baies (optimum 3,5 M HCl dans 72% aqueux méthanol pendant 4 à 8 h).

En général, l'optimisation des conditions d'extraction et d'hydrolyse est toujours nécessaire lorsque les acides phénoliques sont quantifiés à partir de fruits ou d'autres matières végétales (**Lee et Widmer 1996**).

4.3 – Intensification de l'extraction des composés phénoliques par méthode combinées

Si le procédé classique a été largement étudié et optimisé pour la production d'extraits phénoliques à partir de coproduits viticoles, à l'échelle industrielle, ce dernier peut toutefois être intensifié grâce à l'utilisation de technologies alternatives. Ces technologies incluent :

- Le pré-traitement biologique de la biomasse, par hydrolyse enzymatique des tissus végétaux.
- Les pré-traitements physiques (ultrasons, champs électriques pulsés et décharges électriques haute tension) induisant la dénaturation, voire la rupture, des structures vacuolaires et/ou pariétales des tissus végétaux. Ces traitements peuvent également être utilisés en tant que technologies d'assistance lors de l'extraction solide / liquide et peuvent être réalisés à température constante.
- le traitement (ou pré-traitement) thermique de la biomasse induisant également la déstructuration des structures végétales. On peut notamment citer les microondes et le chauffage ohmique.
- l'extraction assistée par fluides supercritiques dans des conditions de températures et de pressions élevées. Les fluides à l'état supercritique (CO₂ supercritique, eau sous-critique) présentent un certain nombre d'avantages comparativement au solvant liquide, et notamment un coefficient de diffusion élevé, une tension superficielle faible et une viscosité faible, menant à un transfert de masse plus favorable.

Le tableau 16 regroupe quelques études réalisées sur la biomasse viticole pour l'intensification de l'extraction des composés phénoliques pour chacune des technologies citées ci-dessus.

Tableau 16 : Traitements alternatifs pour l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques à partir de la biomasse viticole.

Technologies alternatives pour le traitement de la biomasse viticole	Références
Ultrasons (US)	(Cho.Y <i>et al.</i> , 2006; Corrales M. <i>et al.</i> , 2008; González-Centeno M. <i>et al.</i> , 2015; González-Centeno M.R. <i>et al.</i> , 2014; Nadia P. <i>et al.</i> , 2010; Novak I. <i>et al.</i> , 2008; Zhong Z.S. <i>et al.</i> , 2005)
Décharges électriques haute tension (DEHT)	(Boussetta N. <i>et al.</i> , 2009a; Boussetta N. <i>et al.</i> , 2013b; Boussetta N. <i>et al.</i> , 2014; Boussetta N. <i>et al.</i> , 2011; Boussetta N. <i>et al.</i> , 2012b; Rajha H. <i>et al.</i> , 2015a)
Champs électriques pulsés (CEP)	(Boussetta N. <i>et al.</i> , 2009b; Boussetta N. <i>et al.</i> , 2012b; Corrales M. <i>et al.</i> , 2008; Delsart C. <i>et al.</i> , 2012; Donsi F. <i>et al.</i> , 2010; López N. <i>et al.</i> , 2008a,b et 2009 ; Puértolas E. <i>et al.</i> , 2013; Rajha H. <i>et al.</i> , 2015a) (Mhemdi H. 2013a). Mhemdi H. <i>et al.</i> 2013a).
Chauffage ohmique (CO)	(El Darra N. <i>et al.</i> , 2012)
Microondes	(Dang Y.Y. <i>et al.</i> , 2013; Hong N. <i>et al.</i> , 2001; Li Y. <i>et al.</i> , 2011; Liazid A. <i>et al.</i> , 2011; Pérez-Serradilla J. <i>et al.</i> , 2011; Zhang G. <i>et al.</i> , 2013)
Eau sous-critique	(Aliakbarian B. <i>et al.</i> , 2012; García-Marino M. <i>et al.</i> , 2006; Monrad J.K. <i>et al.</i> , 2012)
CO ₂ supercritique	(Casas L. <i>et al.</i> , 2010; Murga R. <i>et al.</i> , 2000; Pinelo M. <i>et al.</i> , 2007; Vatai T. <i>et al.</i> , 2009)
Traitement enzymatique	(Rajha H. <i>et al.</i> , 2015b; Ratnasooriya C.C. <i>et al.</i> , 2012)

L'extraction des composés phénoliques peut être effectuée en combinant deux ou plusieurs techniques. Cette combinaison permet de tirer des avantages des différentes méthodes d'extraction pour augmenter l'efficacité de l'opération d'extraction (**Shirsatha et al., 2012**). Les approches combinées pourraient être appliquées de manière séquentielle (technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons (DIC-UAE) ou simultanément (extraction enzymatique assistée par ultrasons, extraction par fluide supercritique assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et ultrasons) (**Pico, 2013**).

En (2013), **Allaf** et ses collaborateurs ont rapporté que l'utilisation séquentielle de DIC et UAE pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange améliore les rendements en naringine et en hespéridine. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que le traitement DIC et UAE conduit à une expansion de la structure cellulaire. Quel que soit le type du solvant, l'expansion de la structure peut être considérablement intensifiée par l'amélioration de la diffusivité du solvant à l'intérieur du solide (**Allaf et al. 2012**).

Luengo et al. (2013) ont utilisé séquentiellement le champ électrique pulsé (60 ps, 20 impulsions, 5 kV/cm) pour améliorer l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange (eau, m/v: 40g: 4 ml, 30 min, 5 bars). Les résultats ont montré que le traitement des écorces d'orange par champ électrique pulsé (PEF) à 5 kV/cm augmente la quantité de naringine et d'hespéridine dans l'extrait de 1 à 3,1 mg/100 g de matière végétale humide et de 1,3 à 4,6 mg/100 g de matière végétale humide, respectivement. Les auteurs ont rapporté que PEF induit une perméabilisation des membranes cytoplasmiques, facilitant la libération des composés intracellulaires des cellules, donnant ainsi une augmentation des rendements d'extraction des différents composés (**Luengo et al., 2013**).

5 – Conclusion

L'extraction conventionnelle par solvant des antioxydants naturels d'une matrice végétale permet d'obtenir des rendements assez élevés en antioxydants phénoliques cependant elle provoque la plupart du temps une dégradation des composés thermolabiles des extraits à cause de l'utilisation de températures élevées (70-100°C) et/ou des longues durées d'extraction (1h-24h). Pour améliorer l'extraction de ces composés, d'autres moyens sont appliqués afin d'intensifier la procédure d'extraction tels que l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes ou l'extraction par fluide supercritique la détente flash ...etc.

L'extraction assistée par ultrasons semble être une technique de choix pour les composants thermolabiles car elle utilise des basses températures (30-40°C) pendant un temps d'extraction réduit (10-60 min) et des puissances des ultrasons modérées (30-150 W).

L'extraction assistée par micro-ondes est utilisée pour séparer les antioxydants naturels polaires et non polaires durant un temps d'extraction réduit (49s – 12min). Cette méthode peut être réalisée en utilisant une large gamme de solvants organiques et ne nécessite pas de conditions sélectives pour extraire les composés bioactifs.

L'extraction par CO₂ supercritique peut être appliquée sans solvant ou en utilisant de faible quantité de solvant. Cette méthode permet aussi d'obtenir des molécules d'une grande pureté. Cependant, l'extraction par fluide supercritique, qui utilise exclusivement le CO₂ comme solvant d'extraction est limitée à l'extraction des composés apolaires et l'emploi d'un co-solvant est le plus souvent nécessaire. Les principaux avantages de cette technique se résument à son caractère écologique et la pureté de l'extrait et/ou du composé obtenu.

Des approches combinées pour l'intensification de l'extraction ont été proposées par certains auteurs par l'utilisation de technologies alternatives telles que l'extraction par les champs électriques et la détente instantanée contrôlée (DIC) couplée à l'extraction assistée par ultrasons (DIC-UAE) ou l'extraction enzymatique assistée par ultrasons, ou encore l'extraction par fluide supercritique assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes couplée à l'ultrasons ; et cela dans le but de profiter au maximum des avantages des différentes méthodes d'extraction et limiter leurs inconvénients.

Chapitre IV

Caractérisation des antioxydants naturels par méthodes

Spectroscopiques et Chromatographiques

&

mesure de leurs activités antioxydantes.

1- Introduction

Les produits naturels d'origine végétale - extraits, huiles essentielles, résines - sont de nos jours très recherchés. Ils se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines – voire d'une centaine et plus – de composés en proportions variables. Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. De plus, dans le domaine industriel, les molécules qui peuvent en être isolées, dans la plupart des cas optiquement actives, constituent des substrats intéressants pour l'hémi-synthèse de produits pharmaceutiques, de vitamines, de substances odorantes, etc (Bruneton, 1993).

Le double objectif identification/quantification est difficile à atteindre à cause de la complexité des matrices végétales mais surtout à cause de l'absence de méthodes standardisées car les techniques sont souvent spécifiques en fonction du domaine d'application. Ainsi, même l'identification d'un composé, déjà connu, peut s'avérer délicate en l'absence de comparaison aisée avec des données antérieures (Verpoorte *et al.* 2010).

Le double objectif identification/quantification consiste à déterminer la composition chimique de chaque huile essentielle et extraits par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographiques. De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon différentes voies (Figure 71):

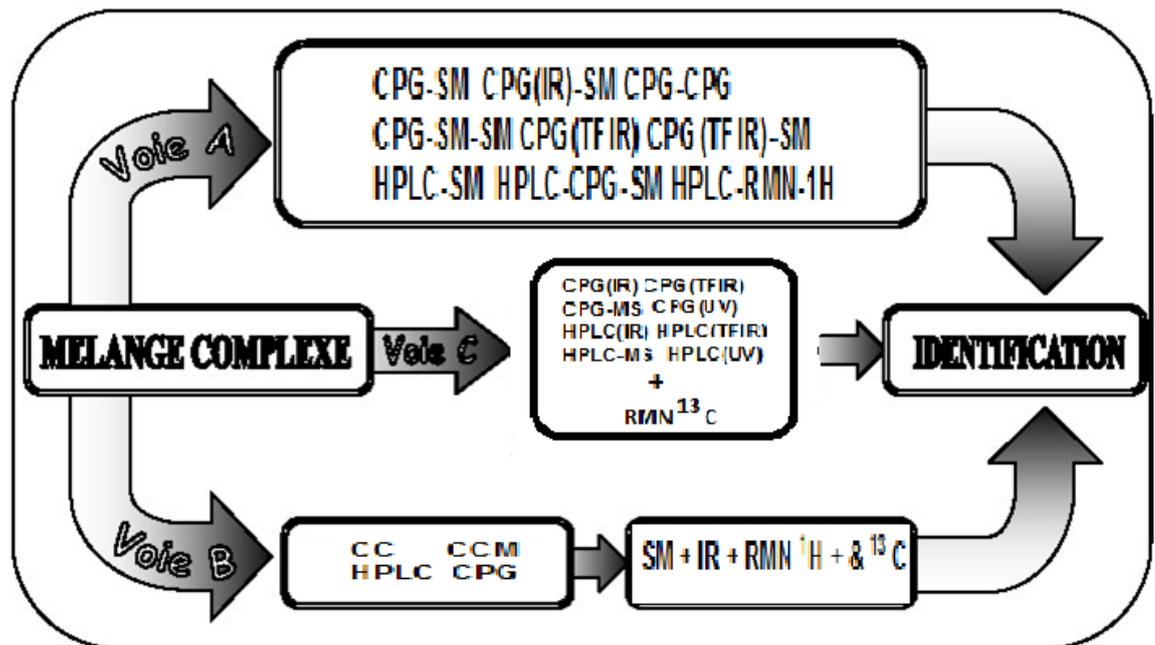


Figure 71 : Les méthodes d'analyses d'un mélange complexe.

La voie A est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine (par exemple, contrôle de la qualité) d'échantillons d'extraits végétaux dont les constituants ont déjà été décrits dans la littérature. Elle permet la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (UV, IRTF, RMN ^1H RMN ^{13}C et SM, ...), qui permet leur identification par combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus.

La voie B s'impose lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures complexes et/ou très proches). Ainsi, le travail d'analyse comporte une étape de purification de tous les composés par différentes techniques chromatographiques (CCM, CC, HPLC, CPG), en vue de leur identification.

L'analyse peut également être menée selon **la voie C (Figure 71)**, plus récente, qui fait intervenir le couplage d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (UV, IRTF, SM ...), qui permet leur identification par combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus.

Dans le but de séparer, d'identifier et de déterminer les structures des molécules, plusieurs techniques d'analyse sont utilisées. Il s'agira dans cette partie de décrire les théories qui accompagnent les techniques spectrométriques et chromatographiques mises en œuvre dans cette étude.

2- Méthodes de caractérisations des antioxydants naturels

2.1- Méthodes spectrométriques

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques : la spectroscopie de masse, la spectrométrie infrarouge, la spectrophotométrie UV-visible et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structurale. Pour rappel, nous décrivons brièvement les techniques les plus utilisés par les phytochimistes.

2.1.1 - Spectroscopie UV- visible

La spectroscopie UV (ultraviolette) visible est une technique de caractérisation de molécules. En effet, elle est basée sur la capacité des composés à absorber un faisceau lumineux (Yadav, 2013). A chaque fonction organique correspond une plage d'absorption de rayonnement lumineux dans le spectre UV-visible. L'intensité de l'absorption est aussi fonction de la nature de liaisons chimiques (liaison σ ou π ...) dans les molécules (Stem and Timmons, 1970).

La spectroscopie UV-visible permet également de déterminer la concentration d'une famille de molécules dans un extrait tel que le dosage des anthocyanes, polyphénol totaux, flavonoïdes totaux (Giusti and Wrolstad, 2001).

Les techniques de spectroscopie U.V- visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée, ce qui permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption U.V-visible permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange par comparaison avec des témoins (Yadav, 2013).

Les spectres U.V-Visible des flavonoïdes sont caractérisés par la présence de deux pics d'absorption maximale. La première dans la gamme 240-285 nm (bande II, principalement due à l'absorption du cycle A) et la deuxième dans la gamme 300-550 nm (bande I, due à l'absorption du cycle B). La position précise et les intensités relatives de ces absorptions maximales fournissent des informations intéressantes concernant la nature du flavonoïde et des positions hydroxylées dans la structure (Giusti and Wrolstad, 2001).

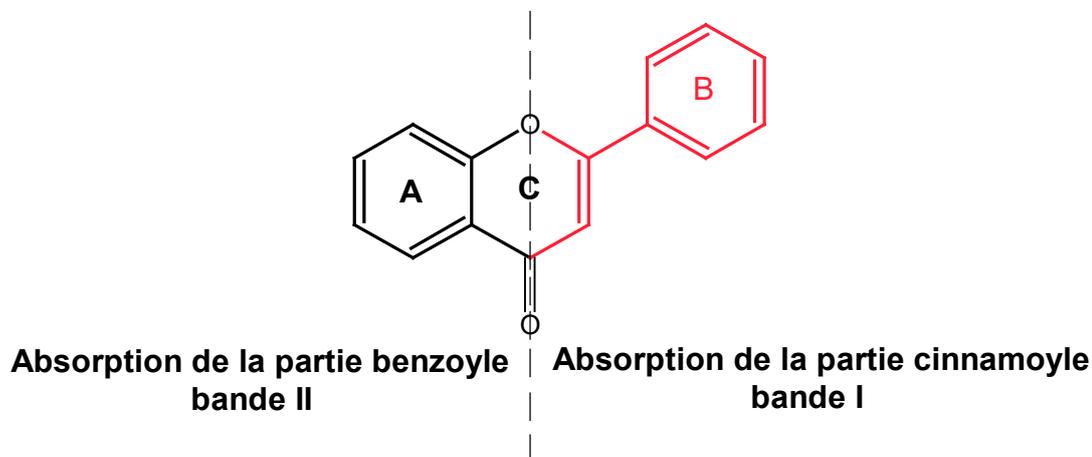


Figure 72 : Les deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

La substitution des flavonoïdes a un effet sur le déplacement de deux bandes (I, II) (le déplacement de la longueur d'onde λ). Pour identifier la substitution structurale de composé flavonoïde par spectrophotométrie UV, on utilise les réactifs de déplacement comme le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), le chlorure d'aluminium acidifié ($AlCl_3/HCl$), le méthoxy de sodium ($MeONa$) et l'acétate de sodium ($AcONa$) (Mabry et al, 1970).

2.1.1 - Spectres U.V- Visible avec addition de réactifs

2.2.1 - Spectre UV- Visible en présence de AlCl_3 et AlCl_3/H^+

L'acide de Lewis forme avec les flavonoïdes contenant un groupement hydroxyle en C5 ou en C3 des complexes stables et des complexes instables avec des flavonoïdes possédant des groupements hydroxyles en position ortho. L'addition de l'acide chlorhydrique décompose le complexe formé avec les groupements hydroxyles en ortho et n'a aucun effet sur les complexes formés avec les groupements OH en C3 ou en C5.

2.2.2 - Spectre UV- Visible en présence de MeONa

MeONa est une base forte qui ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence d'un groupe hydroxyle en position 5.

2.2.3- Spectre UV- Visible en présence de AcONa

L'acétate de sodium AcONa, base faible, ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH. Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en position 7 (**Bacon J.D., et al 1976**).

2.2.4 - Application de La spectroscopie UV-visible à la détection et l'identification des flavonols et des acides phénoliques.

La spectroscopie UV-visible permet également de déterminer la concentration d'une famille de molécules dans un extrait tel que le dosage des anthocyanes, polyphénol totaux, flavonoïdes totaux (Giusti and Wrolstad, 2001).

Les composés phénoliques absorbent dans la région UV et le détecteur le plus couramment utilisé est un détecteur UV ou UV-vis à longueur d'onde variable (Lee et Widmer 1996, Robards et Antolowich 1997) (tableaux 2 et 3). Aucune longueur d'onde n'est idéale pour surveiller toutes les classes de composés phénoliques car ils affichent des maxima d'absorbance à différentes longueurs d'onde (Delage et al. 1991).

La plupart des dérivés de l'acide benzoïque affichent un maximum à 246–262 nm, à l'exception de l'acide gallique et de l'acide syringique qui ont un maximum d'absorption à 271 et 275 nm, respectivement (Torres et al. 1987). Les cides hydroxycinnamiques absorbent dans deux

régions du spectre UV, un maximum se situant dans la plage de 225 à 235 nm et l'autre dans la gamme de 290–330 nm (Ribereau-Gayon 1972). À 320 nm, les dérivés de l'acide cinnamique peuvent être détectés sans aucune interférence avec les dérivés de l'acide benzoïque, qui ont une capacité d'absorption plus élevée à 254 nm. Cependant, la détection à 280 nm est la meilleure alternative pour la détermination des deux classes de composés phénoliques (Pussayanawin et Wetzel 1987).

La plage d'absorption de 350 à 370 nm a été largement utilisée pour les flavonols aglycones et à 280 nm pour les flavan-3-ols et les flavonols glycosides (Robards et Antolowich 1997). L'utilisation intensive de la détection par barrette photo-diode (PDA) dans l'analyse des flavonoïdes et des acides phénoliques peuvent être attribués à la capacité de collecter des spectres en ligne (Hertog et al. 1992a, b, Rommel et Wrolstad 1993a, b, Justesen et al. 1998) sans utiliser de techniques de débit arrêté. Ce a conduit à une amélioration considérable de l'analyse HPLC à des fins d'identification et a démontré l'utilité des informations qualitatives dans l'analyse phénolique basée sur spectre d'absorption (Jaworski et Lee 1987, Mazza et Velioglu 1992, Fernández de Simón et al. 1992). Le PDA présente trois avantages majeurs: la détection de plusieurs longueurs d'onde, l'identification des pics et détermination de la pureté des pics (Lee et Widmer 1996).

La détection UV a l'inconvénient de ne pas être aussi sensible ou sélective que la fluorescence détection et les pics interférents sont plus courants. Cependant, la détection de fluorescence n'a pas été largement appliquée aux composés phénoliques (Lee et Widmer 1996). Dans l'analyse des composés phénoliques dans le jus d'orange, la détection par fluorescence offre des avantages majeurs par rapport à la détection UV en termes de sélectivité améliorée et de sensibilité (Roussef et al. 1992b). La détection de fluorescence a également été appliquée pour l'analyse des acides phénoliques dans les kakis (Gorinstein 1994), l'acide ellagique dans les baies et les fruits à coque (Hollman et Venema 1993) et les flavonols et les isomères du resvératrol dans le plasma (Hollman et al. 1996) (Giachetti et al. 1999).

2.3- Spectrométrie infrarouge IR

La spectroscopie infrarouge traite de l'enregistrement de l'absorption des rayonnements dans la région infrarouge du spectre électromagnétique. La position d'une absorption infrarouge donnée est exprimée en termes de longueur d'onde (en micron μ) ou plus communément en termes de nombre d'onde ν en cm^{-1} puisqu'il est directement proportionnel à l'énergie. La région infrarouge ordinaire 2,5 -15 μ (4000-667 cm^{-1}) est la plus pratique pour les organiciciens. La région 0,8 -2,5 μ (12500 - 4000 cm^{-1}) s'appelle proche infrarouge et la région 15-200 μ (667-50

cm-1) s'appelle l'infrarouge lointain. L'absorption du rayonnement infrarouge par une molécule se produit en raison des changements d'énergie vibratoires et rotatifs quantifiés lorsqu'ils sont soumis à une irradiation infrarouge. Ainsi, les spectres IR sont souvent appelés spectres de rotation vibratoire. Les différentes bandes observées dans un spectre IR correspondent à divers groupes fonctionnels et des liaisons présentes dans la molécule. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est largement utilisée pour la détection de groupes fonctionnels et l'identification de composés organiques (Yadav, 2013).

2.3.1 - Région d'empreinte digitale

Il n'est pas possible pour deux composés différents (excepté les énantiomères) d'avoir exactement le même spectre IR. Par conséquent, le spectre infrarouge d'un composé est appelé son empreinte digitale. La région située au-dessous de 1500 cm^{-1} est appelée région d'empreinte digitale car chaque composé possède un motif d'absorption unique dans cette région.

Cette région contient de nombreuses bandes d'absorption causées par des vibrations de flexion telles que les bandes d'absorption causées par les liaisons carbone-carbone, carbone-oxygène (C-C, C-O) comme dans les alcools, les éthers, les esters, et la liaison carbone-azote (C-N) comme dans les amines, les acides aminés, les amides (Yadav, 2013).

2.3.2 - Applications de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie IR est une méthode utilisée pour la détermination de la structure des composés organiques. En effet, les vibrations moléculaires dépendent des distances interatomiques, des angles de liaison et des forces de liaison plutôt que des propriétés en vrac du composé. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est utilisée en chimie organique pour la détection des groupes fonctionnels, la confirmation de l'identité des composés et le suivi des réactions.

2.3.2.1 - Détection des groupes fonctionnels

Tous les groupes fonctionnels absorbent dans une région de fréquence définie. Ainsi, la présence ou l'absence d'une bande dans une région de fréquence définie montre la présence ou l'absence d'un groupe fonctionnel particulier dans le composé.

2.3.2.2 - Confirmation de l'identité des composés

L'identité d'un composé est souvent établie en comparant son spectre IR à celui d'un échantillon authentique. Si les spectres IR, enregistrés dans les mêmes conditions, sont superposables, ils représentent le même composé. Le nombre de bandes, surtout dans la région

de l'empreinte digitale, est très utile pour l'identification. Les spectres infrarouges d'échantillons impurs sont habituellement flous et ont de nombreuses bandes qui ne peuvent pas être interprétées alors qu'un composé pur donne un spectre IR clair.

2.3.2. 3 - Suivi des réactions

La progression d'une réaction organique peut être suivie à l'aide d'une spectroscopie IR.

Ceci se fait en examinant les spectres IR des portions du mélange réactionnel prélevés à certains intervalles de temps.

2.4- Spectrométrie de résonance magnétique Nucléaire RMN

2.4.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques, principalement la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , et l'azote ^{15}N .

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «spin».

La technique de la RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Différentes techniques peuvent être utilisées (Freeman.R ; 1988) :

2.4.1.1 - RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)

- **RMN proton (^1H)**

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton (Freeman.R ; 1988).

- **RMN carbone (^{13}C)**

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Le DEPT permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires.

On note que la différence majeure entre le DEPT 135° et le Jmod réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT (Freeman.R ; 1988)

2.4.1.2 - RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps à savoir le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage (Freeman.R ; 1988).

2.4.1.2.1. Corrélations homonucléaires

- **La COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$):** fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **La NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) :** permet d'observer dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule (Freeman.R ; 1988).

2.4.1.2. 2 - Corrélations hétéronucléaires

La HSQC (1JH-C) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

La HMBC (2JH-C , 3JH-C) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance 2JH-C , 3JH-C et permet également de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons (Freeman.R ; 1988).

2.5- Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (ou spectroscopie de masse) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, elle permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant et de réaliser des analyses quantitatives.

L'application extensive de la spectroscopie de masse dans la résolution des problèmes de structures des molécules organiques n'a commencé qu'en 1960. Cette technique est basée sur le seul principe de la détermination de la masse d'un ion en phase vapeur. Ainsi, un spectromètre de masse ionise l'échantillon dans un faisceau d'électrons en phase vapeur. Les ions sont séparés selon leurs rapports masse sur charge (valeurs m/e ou m/z) et leurs spectres de masse sont enregistrés sous la forme de raies avec leurs abondances relatives (Yadav, 2013).

En réalité, le m/e est obtenu à partir d'un spectre de masse, mais pour des raisons pratiques, il est égal à la masse m de l'ion, car les ions multichargés sont beaucoup moins abondants que ceux avec une seule charge (e ou $z = 1$). La spectroscopie de masse est utile en analyses chimiques car elle peut :

- donner les masses moléculaires exactes ;
- montrer la présence de certaines unités structurales et leurs points d'attachement dans la molécule ;
- donner une idée de la structure de la molécule (Yadav, 2013).

3.1.1 - Principe de spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse repose sur l'ionisation, généralement dans une enceinte où règne un vide poussé (10^{-4} Pa), d'une très petite quantité d'échantillon, afin de créer des ions ; ces espèces chargées sont alors soumises à l'action du champ électrique et/ou magnétique, suivant les appareils. L'étude des trajectoires suivies permet de déterminer le rapport masse/charge des ions, donc éventuellement leur nature.

La représentation sous forme graphique de l'abondance des ions sur la base de leur rapport masse/charge constitue le spectre de masse. Celui-ci traduit la fragmentation, à l'échelle statistique, du très grand nombre d'espèces individuelles qui composent tout produit soumis à cette analyse, (Jensen and Gross, 1987; Thompson, 2018).

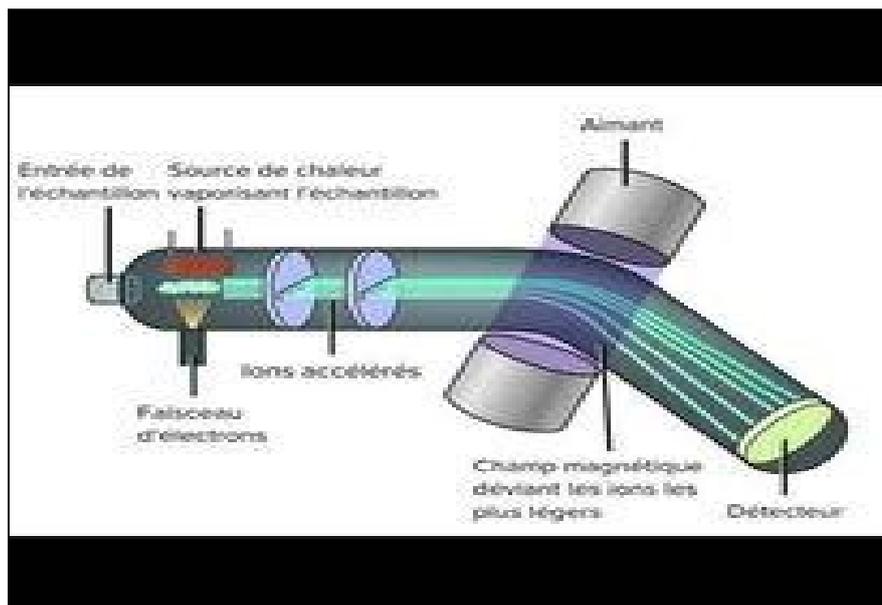


Figure : Schéma de principe de la spectrométrie de masse

3.1.2 - Appareillage de MS

Fondamentalement, un spectromètre de masse contient 5 parties :

3.1.2.1 - Le système d'introduction de l'échantillon

L'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...), (Jensen and Gross, 1987).

3.1.2.2 - La source d'ionisation

Elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe actuellement de nombreuses méthodes d'ionisation, chacune étant adaptée à la nature de l'échantillon et au type d'analyse à effectuer, son choix est donc crucial, (Jensen and Gross, 1987).

L'impact électronique (I.E.)

Il s'agit de la technique d'ionisation la plus ancienne. Elle consiste à obtenir, sous vide, l'interaction d'une molécule M et d'un électron accéléré à quelques dizaines de volts (généralement 70 eV).

L'ionisation chimique (I.C.)

Dans ce cas, la pression du gaz réactant (comme l'ammoniac) dans la source d'ions ($P = 1,1333.101 \text{ Pa}$ à $1,1333.102 \text{ Pa}$) est telle que des interactions entre des ions formés par impact électronique et des molécules neutres ont lieu.

L'electrospray (E.S.I.)

Il s'agit d'une technique qui permet de désolvater et d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique.

Spectrométrie de masse à ions secondaires avec cible liquide (L.S.I.M.S.)

Il s'agit d'une technique de désorption-ionisation par des ions rapides (Cs^+ accélérés à 30 kV) en présence d'une matrice liquide.

Bombardement par atomes rapides (F.A.B.)

Des composés dissous dans une matrice liquide subissent une désorption- ionisation grâce à l'impact d'atomes énergétiques.

Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Un échantillon solide dispersé dans une matrice est irradié de photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. On obtient la désorption de molécules ionisées intactes. On peut observer l'ion M^+ , $(M + H)^+$, $(M + Na)^+$, $(M - H)^-$, des ions multichargés M^{2+} , M^{3+} , M^{3-} , etc...Ainsi que des agrégats $2M^+$, $3M^+$, $2M^-$, etc...Mais peu d'ions fragments.

Désorption plasma (P.D.M.S)

Cette technique utilise les produits de fission de l'isotope radioactif 252 du Californium 252 Cf pour bombarder une cible sur laquelle est déposé l'échantillon à analyser. Le californium se désintègre en émettant des ions multichargés de très grande énergie cinétique (environ 100 MeV), (Thompson, 2018).

3.1.2.3 - L'analyseur

Il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il comporte un système comprenant un secteur magnétique couplé à un secteur électrique qui permet de

terminer le temps de vol (TOF), de chaque ion. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement. . Il existe 4 grands types d'analyseurs utilisant:

- un champ magnétique variable (spectromètre de masse à secteur magnétique)
- un champ magnétique fixe (résonance cyclotronique ionique : FTMS)
- un champ électrique fixe (spectromètre à temps de vol : TOF)
- un champ électrique variable (filtre quadripolaire ; piège à ions).

3.1.2.4 - Le détecteur

Le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement, (Thompson, 2018).

3.1.2.5 - Le système de traitement des données

Les spectromètres de masse sont entièrement pilotés par un ordinateur. Cet ordinateur effectue et contrôle les opérations suivantes:

- Réglage et calibrage du spectromètre.
- Acquisition et stockage des données.
- Traitement des données et recherche dans les banques de spectres, (Jensen et Gross, 1987).

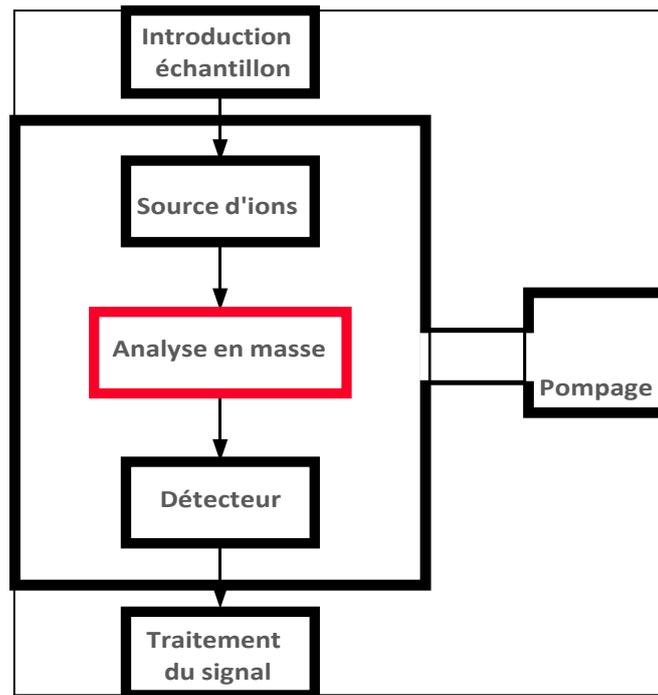


Figure : Schéma de principe d'un spectromètre de masse

3.1.3 - Utilité de la spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse permet de réaliser les fonctions suivantes :

- **Identification des molécules :** un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec le contenu de banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.
- **Analyse structurale :** Les ions moléculaires peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse : dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. Comme les fragmentations respectent des lois précises, l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des molécules ionisées.
- **Quantification :** Un spectromètre de masse possède un détecteur très sensible permettant de faire une quantification fiable des molécules ionisées. (Densité optique ou Intensité relative), (Thompson, 2018).

3.1.4 - Les avantages et les inconvénients de spectre de masse

Les avantages d'un spectre de masse sont :

- Elle est utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des substances chimiques.

- Elle ne se limite pas aux masses moléculaires, elle classe également les isotopes de l'échantillon et nous aide à trouver la structure chimique du composé inconnu.
- Il peut calculer la pureté de l'échantillon.
- Son principal avantage est qu'elle est très sensible par rapport aux autres techniques.
- On peut donc dire que c'est un excellent outil pour identifier ou confirmer la présence de composés inconnus.

Les inconvénients d'un spectre de masse sont :

- Le principal inconvénient de la spectrométrie de masse est que les hydrocarbures qui produisent des ions similaires ne sont pas identifiés.
- Elle n'est pas non plus capable de séparer les isomères optiques et géométriques.
- La spectrométrie de masse ne permet pas non plus de distinguer les hydrocarbures dont les ions se fragmentent de manière similaire, (Jensen and Gross, 1987; Thompson, 2018).

2.5.1. Méthodes d'ionisation

Les méthodes d'ionisation les plus importantes sont :

- l'impact électronique dans laquelle l'échantillon est bombardé en phase vapeur avec un faisceau d'électrons à haute énergie (70 eV) ;
- l'ionisation chimique dans laquelle l'échantillon est introduit dans la chambre d'ionisation à la pression atmosphérique avec un excès d'une substance intermédiaire (méthane, isobutane ou ammoniac) également appelé gaz porteur.

2.5.1.1 - Ions moléculaires et fragments par impact électronique

Le bombardement avec un faisceau d'électrons à haute énergie (70 eV) arrache l'électron ayant le plus petit potentiel d'ionisation dans la molécule pour donner l'ion moléculaire ou ion parent M^+ en phase vapeur. L'ion moléculaire donne la masse moléculaire de l'échantillon car la masse de l'électron perdue de la molécule est négligeable.

L'ordre de l'énergie nécessaire pour éliminer un électron d'une molécule pour donner l'ion moléculaire est : Paire d'électrons < liaison π conjugué < liaison π non conjugué < liaison σ (Jensen and Gross, 1987; Thompson, 2018).

Dans les alcanes, l'élimination d'un électron à partir de liaisons C-C est plus simple que celle des liaisons C-H. L'énergie requise pour éliminer un électron à partir de molécules organiques neutres est d'environ 10-12 eV. En pratique, on utilise une énergie beaucoup plus élevée (70 eV) qui provoque une fragmentation supplémentaire de l'ion moléculaire résultant en un fragment d'autres ions filles (Jensen and Gross, 1987).

2.5.1.2. Spectre de masse et pic de base

Le spectre de masse d'un composé est représenté graphiquement en traçant les valeurs m/e des divers ions (ions moléculaires et ions fragments) par rapport à leurs abondances relatives. Parfois, le pic de l'ion moléculaire lui-même peut être le pic de base. Généralement, les spectres de masse sont représentés sous la forme d'un graphique à barres (Loudon and Maccoll, 1970).

2.5.1.3. Reconnaissance de l'ion moléculaire (parent), pic et détection des isotopes

La reconnaissance du pic de l'ion moléculaire M^+ (pic parent) dans le spectre de masse d'un composé organique est très importante car elle donne la masse moléculaire du composé.

Le pic d'ion moléculaire est le pic du nombre de masse le plus élevé à l'exception des pics isotopiques aux nombres de masse M^{+1} , M^{+2} etc. (M = masse de l'ion moléculaire). Les pics isotopiques (satellites) apparaissent en raison de la présence d'un certain nombre de molécules contenant des isotopes plus lourds que les isotopes communs. Puisque l'abondance naturelle des isotopes plus lourds est généralement beaucoup plus faible que celle de l'isotope le plus léger, les intensités des pics isotopiques sont très faibles par rapport au pic parent. Cependant, pour les composés contenant du chlore, du brome ou du soufre, les pics isotopiques sont importants. Le pic isotopique M^{+2} dû à la présence d'un atome de chlore ou d'un atome de brome est respectivement de 33% et 50% du pic de l'ion moléculaire. Ainsi, dans un composé chloré ou bromé, le rapport d'intensité des pics M^+ et M^{+2} sera respectivement de 3 : 1 ou 1 : 1. Cela est dû à l'abondance naturelle de 37,6% de l'isotope ^{37}Cl par rapport à 75,4% de l'isotope ^{35}Cl et à une abondance presque égale des isotopes ^{79}Br et ^{81}Br (Thompson, 2018).

2.6 - Application de la spectroscopie de masse

La spectroscopie de masse est devenue au fil du temps un outil incontournable dans la chimie organique des substances naturelles. Elle est d'une grande utilité dans la détermination des structures moléculaires. Elle est très souvent couplée à une technique de chromatographie.

Comme exemple le couplage entre la chromatographie capillaire en phase liquide et la spectroscopie de masse a permis de dresser le profil de métabolites secondaire d'Arabidopsis

(Von Roepenack-Lahaye et al., 2004) ; la spectrométrie de masse a été utilisée aussi dans l'identification des flavonoïdes glycosilés (Stobiecki, 2000) ; elle a aussi été utilisée dans la mise en place d'une base de données de métabolome de la tomate en couplage avec la chromatographie liquide (Moco et al., 2006).

2.7 - Identification des métabolites secondaires par les ions parents issus de la fragmentation par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse, très souvent couplée à la chromatographie en phase gazeuse, est utilisée pour identifier les molécules. Plusieurs travaux ont permis de donner des approches de coupures de molécules comme des flavonoïdes (Hvattum and Ekeberg, 2003; Justesen, 2001; Stobiecki, 2000), les alcaloïdes (Takáts et al. 2004) et les terpènes et terpénoides (Bursey et al., 1973; Dass and Stout, 1993; Jensen and Gross, 1987; Korfmacher, 2013; Loudon and Maccoll, 1970; Sastia and Eiichiro, 2015).

Les figures 73 à 77 résument des exemples de coupures des plus souvent rencontrées dans les différentes familles de métabolites secondaires

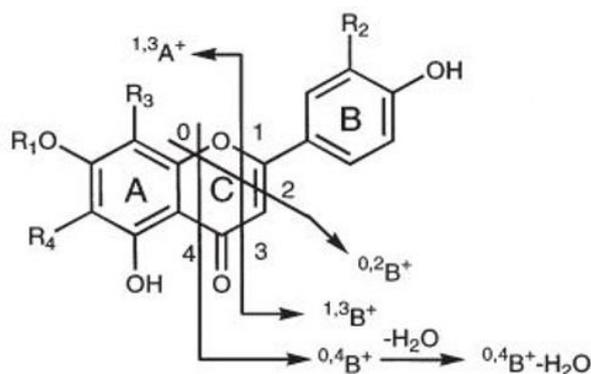


Figure 73: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavones et (Justesen, 2001).

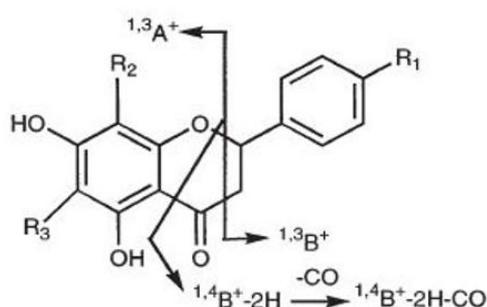


Figure 74: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavanones
(Justesen, 2001).

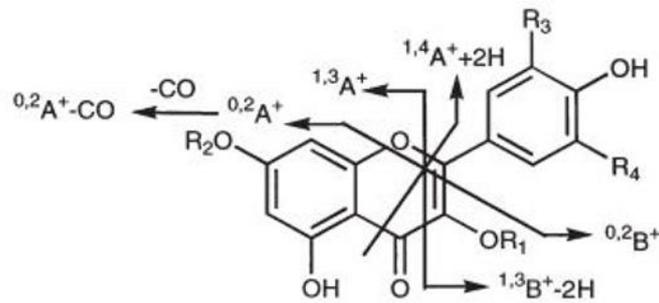


Figure 75: Voies de fragmentations caractéristiques en mode positif des flavonols

Le mode négatif est très utilisé dans l'analyse par MS des flavonoïdes car il est plus sensible que le mode positif et produit un schéma de fragmentation légèrement différent apportant des informations nouvelles et complémentaires (Portet et *al.*, 2008)

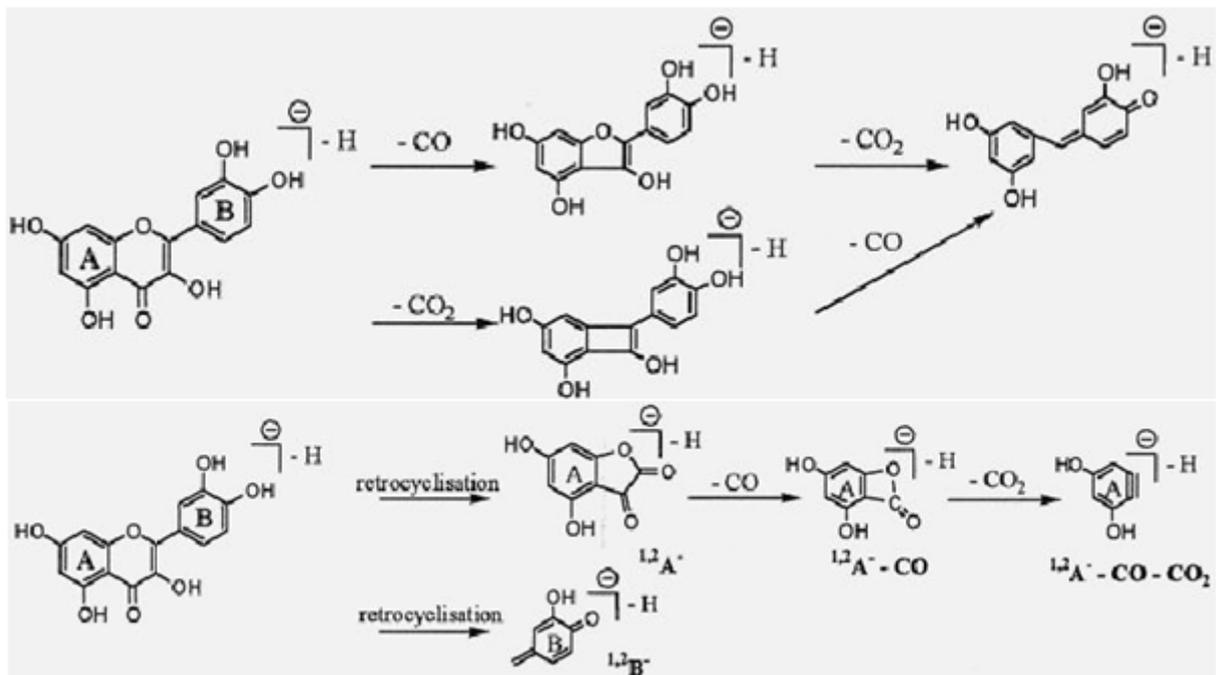


Figure 76: Fragmentation d'un flavonol (quercétine) (Hvattum and Ekeberg, 2003).

Le modèle de base de décomposition, décrit dans les figures 71 à 76, a été énoncé par Domon et Costello en 1988. La figure 75 résume les différentes voies de coupe d'un flavonol (quercétine) (Domon and Costello, 1988).

La fragmentation des molécules en spectrométrie de masse dépend aussi du type d'ionisation du spectromètre. Les figures suivantes résument les différentes fragmentations possibles pour le noyau d'un flavonoïde en fonction du mode ionisation (positif ou négatif).

La figure 77 (ionisation en mode négatif) et (ionisation en mode positif) décrivent ces fragmentations pour une meilleure compréhension. La nomenclature adoptée est celle de Ma et Dougherty (Ma and Dougherty, 1997). Les notations $^{ij}A^-$ et $^{ij}B^-$ sont utilisées pour désigner les ions produits contenant les cycles, respectivement A et B et les notations $i j$ concernent les liaisons qui ont été scindées.

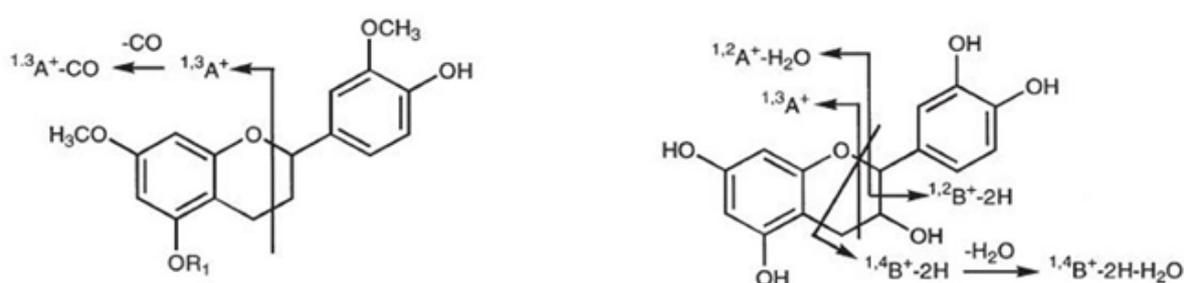


Figure 77 : Nomenclature simplifiée des voies de fragmentation des flavanes et flavanols en mode positif et négatif (Wolfender et al. 2000)

Parmi les outils analytiques actuellement disponibles, la spectrométrie de masse est la meilleure méthode par rapport aux autres méthodes comme IR et RMN en raison de sa sensibilité, de sa sélectivité et de sa capacité à effectuer rapidement des analyses quantitatives et qualitatives.

3 - Techniques chromatographiques

La chromatographie englobe une série de techniques qui ont en commun la séparation des composants d'un mélange. L'échantillon à séparer est entraîné par un courant de phase mobile (gaz ou liquide) le long d'une phase stationnaire (papier ou silice...). La chromatographie analytique est utilisée pour identifier ou doser les composés chimiques d'un mélange. La chromatographie préparative est utilisée pour séparer ou purifier les composantes d'un mélange (Giddings, 2002).

Le mélange à séparer et analyser peut être un gaz, un liquide ou un solide. Le résultat de cette interaction est la distribution différente des composants de l'échantillon entre les deux phases, entraînant la séparation du composant de l'échantillon en zones ou bandes. Le principe qui régit la séparation chromatographique constitue le fondement de la plupart des méthodes

physiques de séparation, par exemple la distillation et l'extraction liquide-liquide (Grob, 2004; Waksmundzka-Hajnos et *al.*, 2008).

La séparation des composants de l'échantillon peut être réalisée par les techniques suivantes : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), chromatographie sur couche mince haute précision (HPTLC), chromatographie liquide haute pression (HPLC) et chromatographie en phase gazeuse (GC). Dans cette partie, nous aborderons la CCM, la HPTLC, la GC et la HPLC.

3.1. Chromatographie sur couche mince (TLC)

Des méthodes de chromatographiques sur papier ont été développées pour les flavonoïdes dans les années 1950 et 1960 (Markham 1982, Robards et Antolowich 1997). Ces techniques ont été remplacées par des chromatographies couches minces (CCM) dans les années 1970, fournissant une technique peu coûteuse et utile pour l'analyse simultanée de plusieurs échantillons (Robards et Antolowich 1997, Harborne 1998).

Le choix d'une phase stationnaire et d'un solvant appropriés dépend de la ou des classes de flavonoïdes à examiner. Les flavonoïdes hydrophiles, tels que les flavonols, peuvent être facilement séparés par CCM sur polyamide ou la cellulose microcristalline (Wildanger et Herrmann 1973, Robards et Antolowich 1997).

TLC est encore couramment utilisé pour les séparations préparatoires (Lee et Widmer 1996) et comme solution rapide à faible coût méthode de criblage pour déterminer les classes de flavonoïdes présentes dans les fruits (Fernández de Simón et al. 1992) et le miel (Sabatier et al. 1992).

Les applications CCM pour l'analyse quantitative des acides phénoliques sont généralement effectuées en utilisant des chromatographie sur des couches de cellulose ou de silice et séparation des composés avec un mélange de supports d'hydrocarbures (toluène, dioxane ou benzène) et modificateurs organiques polaires (acétone, butanol, éthanol ou acide acétique) (Azar et al. 1987, Regnault-Roger et al. 1987, Srisuma et al. 1989, Agbor-Egbe et Rickard 1990).

Les avantages du criblage de l'extrait d'échantillon par CCM avant HPLC sont la détection de contaminants susceptibles d'absorber jusqu'à la phase stationnaire dans la colonne HPLC, ou la détermination des conditions de solvant nécessaires pour une séparation réussie des composés phénoliques (Fernández de Simón et al. 1992, Lee et Widmer 1996).

3.2. Chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC)

Une nouvelle approche de détermination analytique de substances naturelles a été mise

au point avec la HPTLC (Nicoletti et *al.* 2012). La chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) est très utilisée dans les analyses qualitatives (Stahl, 1956). Avec le développement de couches pré-revêtues modernes et l'introduction d'équipements partiellement ou totalement automatisés des analyses quantitatives très précises sont maintenant possibles (Hahn-Deinstrop, 2007).

La HPTLC est largement utilisée pour l'analyse qualitative de composés organiques isolés des composés purs à partir de mélanges à plusieurs composants. De nombreux types de plaques pré-revêtues de CCM et de HPTLC sont commercialisés, par exemple celles avec des couches d'adsorbant inorganiques (silice ou gel de silice et alumine) et organiques (polyamide, cellulose), polaires liées de manière covalente, (diol, cyanopropyle et aminopropyle) et non polaires (RP2, RP8, RP18). Les adsorbants appliqués en HPTLC ont des caractéristiques de surface différentes et, par conséquent, des propriétés physicochimiques différentes. De plus, il existe un large choix de phases mobiles qui peuvent être utilisées pour séparer les composants du mélange. Celles-ci ont des propriétés différentes en tant que donneurs de protons, accepteurs de protons et dipôles. En HPTLC, l'absorption ultraviolette (UV) des solvants de la phase mobile n'influence pas la détection et la quantification des analytes, car la phase mobile est évaporée avant la détection. La viscosité élevée d'un solvant peut être considérée comme une propriété unique limitant son choix en tant qu'éluant. La multitude de types des phases mobiles et fixes donne une abondance de combinaison possible rendant la technique personnalisable aux mélanges complexes d'extraits de plantes.

La HPTLC est également une technique simple pour effectuer des séparations bidimensionnelles. Un seul échantillon est appliqué dans le coin d'une plaque, et la couche est développée dans la première direction avec la phase mobile 1. La phase mobile est séchée par évaporation, et la plaque est ensuite développée avec la phase mobile 2 à un angle droit (perpendiculaire ou direction orthogonale) ; la phase mobile 2 a des caractéristiques de sélectivité différentes par rapport à la phase mobile 1. De cette manière, une séparation complète peut être obtenue de mélanges très complexes tels que les extraits végétaux sur toute la surface de la couche (Waksmundzka-Hajnos et *al.* 2008).

L'une des caractéristiques très utile dans l'interprétation d'un chromatogramme HPTLC est la référence frontale. La référence frontale est le rapport entre le front de solvant, (distance parcourue par l'éluant de la ligne de dépôt jusqu'à la ligne d'arrêt de l'élution), et le front de la tâche (distance entre la tâche du composé et la ligne de dépôt). De part cette définition, la référence frontale est comprise entre 0 et 1. Elle dépend des conditions expérimentales (nature de la phase fixe et de la phase mobile). Lorsque les conditions expérimentales sont conservées, la

référence frontale est une caractéristique du composé et peut être utilisée pour identifier un composé en fonction d'un standard (Litvinova, 2006).

La HPTLC est utilisé pour réaliser l'identification de métabolites secondaires. En effet, elle est souvent couplée avec la spectrométrie de masse et UV dans l'identification de métabolites secondaires des éponges marines (Klöppel et *al.* 2008). L'identification et la quantification de composés dans des poches de perfusion pour de la chimiothérapie a été réalisé en utilisant une HPTLC (Paci et *al.* 2003). Elle sert aussi à réaliser les études phytochimiques sur les terpénoïdes des plantes médicinales (Yamunadevi et *al.* 2011).

3.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance est la plus puissante de toutes les techniques chromatographiques. La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique qui découle de l'application à la chromatographie liquide (LC) des théories et de l'instrumentation développées à l'origine pour la chromatographie en phase gazeuse (GC) (Sandy, 1991).

La chromatographie en phase liquide à haute performance base sa technique sur la pression de la phase mobile (l'éluant). Elle se différencie de la chromatographie sur colonne du fait que l'élution se fait par une pompe qui confère une forte pression agissant sur la séparation des composés (Snyder et *al.* 2011).

La chromatographie liquide permet de séparer les différents composants d'un mélange. L'échantillon est dissous dans un solvant et passé à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Les différents composés dans l'échantillon interagissent de manière différente avec ce matériau et se déplacent à des vitesses différentes, ce qui permet leur séparation.

Après la séparation, les composés sont analysés avec cette technique qui permet d'identifier les composés en mesurant le rapport masse/charge de leurs ions. Les ions sont séparés en fonction de leur masse et de leur charge. Le spectromètre de masse produit alors un spectre qui peut être utilisé pour déterminer la masse moléculaire des composés et pour identifier la structure chimique.

L'analyse des impuretés par couplage est une technique utilisée dans de nombreux domaines, notamment dans l'industrie pharmaceutique. En effet, la combinaison des appareils d'analyse permet une analyse spécifique des mélanges complexes. Ces méthodes sont utilisées pour détecter, identifier et quantifier les impuretés ou les contaminants présents dans un échantillon.

3.3.1 - Principe de la méthode

Les composants d'un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) de base sont représentés de manière simplifiée sur la figure. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant).

Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme, (Sandy, 1991)..

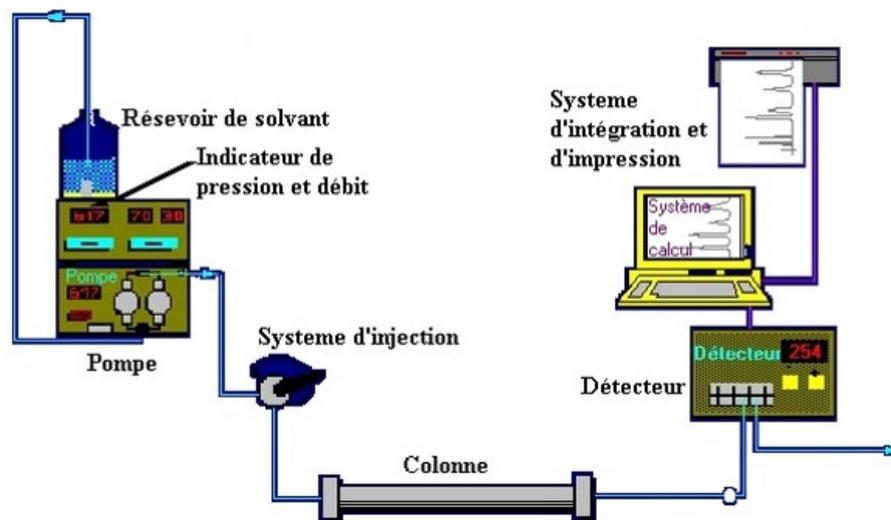


Figure : Système de chromatographie en phase liquide de haute performance.

3.3.2 - Instrumentation de séparation physique (HPLC)

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC) est une technique instrumentale très utilisée dans les laboratoires d'analyse. Elle permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarités différentes afin de les identifier et les quantifier.

C'est une technique d'analyse à la fois qualitative et quantitative, très utilisée en chimie analytique puisqu'elle permet une étude précise et complète d'une espèce chimique. Elle met en œuvre, selon la nature des interactions entre la phase stationnaire, la phase mobile et l'échantillon analysé, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou

d'exclusion, (Snyder et *al.*, 2011).

3.3.2 - Composition d'un HPLC

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulsent l'éluant dans une colonne analytique. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques μL) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données, (Snyder et *al.*, 2011).

3.3.2.1 - Réservoirs de phases mobiles (éluant)

Un appareil HPLC comprend un ou plusieurs réservoirs, en verre ou en acier inoxydable résistants à la corrosion et contenant les solvants. Des gaz ambiants comme l'oxygène, peuvent être dissous dans les solvants, former des bulles dans la colonne et créer des perturbations dans la détection.

De même des poussières en suspension peuvent perturber les séparations et gêner le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs. Il est donc souhaitable de dégazer et de filtrer les solvants. Plusieurs techniques sont utilisées :

- Le dégazage peut être effectuée par une vive agitation, par ultrasons, par barbotage d'hélium ou par réaction catalytique (platine sur alumine) en présence de méthanol (dans la phase mobile) pour transformer l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique.
- Un barbotage d'hélium permet de retirer environ 85% de l'oxygène en ~ 10 min. L'hélium ayant une très faible solubilité dans les solvants ordinaires, après barbotage, les solvants sont exempts d'hélium ; d'où l'intérêt du barbotage. Afin d'éviter la redissolution des gaz, un barbotage constant d'hélium peut être effectuée. De plus, l'utilisation du téflon, qui laisse passer l'air, est évitée dans les systèmes d'introduction du solvant.

3.3.2.2 - Systèmes de pompage

Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe, pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Elle délivre en continu

la phase mobile et provoque un écoulement compatible avec la séparation chromatographique.

Le système de pompage doit:

- Atteindre des pressions élevées : ~200 bars (20 000 kPa) ou plus.
- Être exempt d'impulsions.
- Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10 ml/min.
- Résister à la corrosion et aux solvants.
- Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en gradient d'éluant. L'éluant effectué avec un seul solvant de composition fixe, constante, est appelée "isocratique". La séparation est améliorée par une élution avec programmation de solvants ou "gradient d'éluant". Deux ou plusieurs solvants de polarité différente sont utilisés. Les fractions volumiques des solvants sont modifiées selon un programme préétabli.

3.3.2.3 – Injecteurs

Pour réaliser une injection dans des bonnes conditions, il convient :

- De ne pas surcharger la colonne : si l'échantillon est trop important on aboutit à des pics très larges et des phénomènes de traîne, autant de facteurs qui concourent à diminuer le pouvoir de résolution de la chromatographie.
- D'injecter très rapidement.
- Pour injecter rapidement, on utilise des échantillons de faible volume.

L'injection du soluté se fait à l'aide d'une seringue à travers un septum (cloison séparant 2 cavités). La reproductibilité de cette technique est 2 à 3%.

3.3.2.4 - Vanne à boucle

Très utilisée. Des pressions de 600 bars peuvent être atteintes. Des boucles interchangeables permettent d'injecter des volumes entre 10 et 100 μL . Certaines vannes d'injection ont des volumes de boucle de 0,5 à 5 μL et descendent même à 40 μL . La reproductibilité est bonne si la boucle a été complètement remplie.

L'échantillon introduit dans la boucle déplace la phase mobile qui s'y trouve. Il est nécessaire d'introduire un volume d'échantillon au moins deux fois plus grand que le volume de la boucle afin d'éliminer toute trace d'échantillon dilué qui se crée dès que cet échantillon est introduit. Les connexions de différents ports de la vanne permettent une séparation spatiotemporelle entre le remplissage de la boucle et l'injection dans la colonne. Lors du remplissage, l'échantillon est introduit dans la boucle à faible pression grâce à une seringue

calibrée.

3.3.2.5 – Colonnes

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μm . Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC.

Pour éviter l'obstruction et la détérioration des colonnes par les contaminants, on place habituellement une colonne de garde plus petite et moins dispendieuse au sommet de la colonne principale. Les colonnes de garde doivent être changées régulièrement.

3.3.2.5.1 - Phase stationnaire (normale)

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

3.3.2.5.2 - Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant B polaire (ACN, Me OH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

3.3.2.5.3 - Phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe : - Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale :

Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile

polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales.

Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile, [15].

3.3.2.6 – Détecteurs

Il n'existe pas de détecteur universel comme en chromatographie en phase gaz : détecteurs à ionisation de flamme et à conductivité thermique. En HPLC, les détecteurs sont spécifiques à chaque application.

Le volume de détecteur HPLC doit être le plus faible possible afin de diminuer l'élargissement des bandes. Il existe des détecteurs de propriétés de la phase mobile qui dépendent de la présence d'un soluté : indice de réfraction, constante diélectrique, densité. Et des détecteurs de propriétés du soluté, que ne possèdent pas la phase mobile : absorbance dans l'ultraviolet, fluorescence ou courant de diffusion.

3.3.2.6.1 - Détecteurs d'absorption dans UV-visible

Cette détection est basée sur l'absorption d'une lumière monochromatique. Elle suit la loi de Beer Lambert :

$$A = \varepsilon(\lambda) l C$$

$\varepsilon(\lambda)$: Coefficient d'extinction à une longueur d'onde dans UV-Vis.

l : Trajet de la lumière à travers la solution

C : concentration molaire du soluté en mol. L⁻¹

A : Absorbance du soluté ; sans dimension

Il existe plusieurs types d'appareils :

- A longueur d'onde fixe : $\lambda = 254$ ou 313 ou 365 nm de mercure (Hg) (source à vapeur de mercure dont la raie la plus intense est isolée avec des filtres).
- A longueur d'onde variable : 200 à 700 nm dans des spectrophotomètres à balayage utilisant une source continue et un monochromateur à réseau pour sélectionner la longueur d'onde.

- A barrettes de photodiodes, qui donnent la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre.

3.3.2.6.2 - Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge

Il existe deux types de détecteurs :

- De 2.5 à 14.5 μm (4000 à 690 cm^{-1}).
- A transformée de Fourier.

Ces deux types de détecteurs ont des cellules avec fenêtres en chlorure de sodium ou fluorure de calcium. Toutefois les larges bandes d'absorption de l'eau et des alcools empêchent l'utilisation de ce détecteur infrarouge dans de nombreux cas.

3.3.2.6.3 - Détecteurs de fluorescence

Certains solutés sont fluorescents ou le deviennent suite à des réactions pré ou post colonne. Des détecteurs de fluorescence à laser permettent des détections de 1 à 10 pg et même en dessous.

3.3.2.6.4 - Détecteurs réfractométriques

Ils mesurent la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et la phase mobile avec l'échantillon. Ils nécessitent une température régulée à 0,01°C, car les indices de réfraction varient avec la température.

3.3.2.6.5 - Détecteurs électrochimiques

Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, la colorimétrie et la mesure de conductivité.

3.3.2.6.6 - Détecteurs par spectrométrie de masse

Le couplage HPLC / SM est plus difficile à réaliser qu'avec la CPG car il faut éliminer le solvant d'élution. On peut:

- Réaliser une vaporisation sélective du soluté ;
- Utiliser des micro-colonnes ($L = 10 \text{ cm}$, $d_{\text{int}} = 1 \text{ mm}$) à faible débit (quelques $\mu\text{L}/\text{min}$) et un volume d'injection de $1 \mu\text{L}$ qui permettent d'introduire la totalité de l'effluent chromatographique dans le spectromètre de masse. On peut travailler en nano chromatographie.

3.3.2.7 - Intégrateur-enregistreur

Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC.

3.3.2.8 – Chromatogramme

Un chromatogramme est une représentation de la séparation qui s'est produite chimiquement (par chromatographie) dans le système HPLC. Une série de pics s'élevant à partir d'une ligne de base est tracée sur un axe temporel. Chaque pic représente la réponse du détecteur pour un composé différent. Le chromatogramme est tracé par la station de données informatiques (voir la figure), [18].

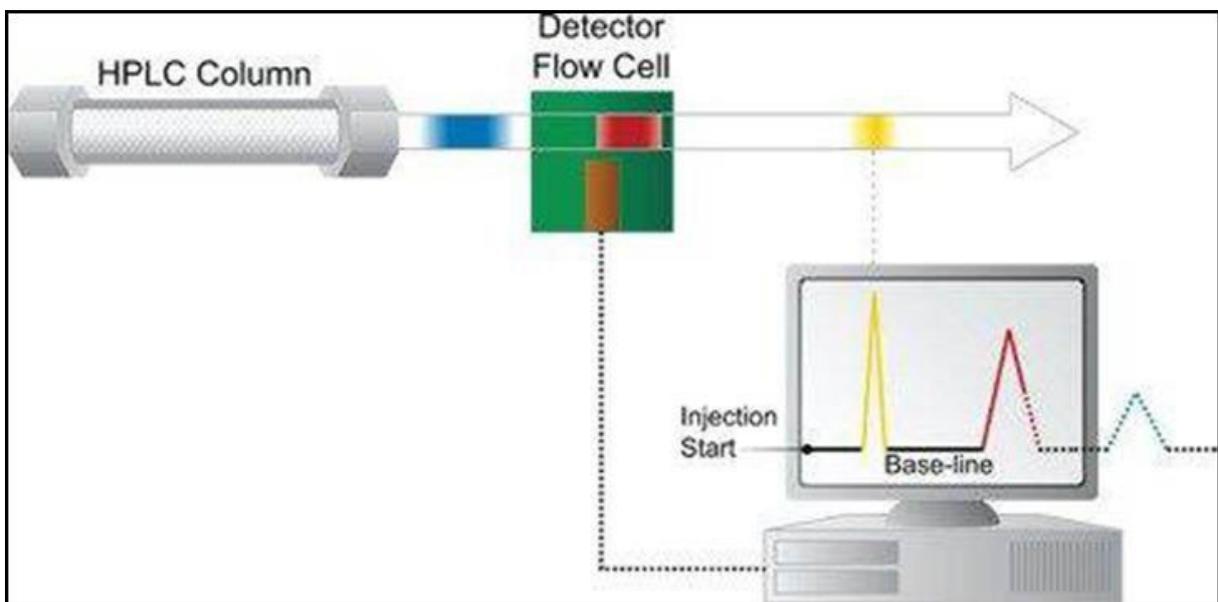


Figure : Schéma descriptif du système de détection et enregistrement des signaux.

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits comme il est indiqué sur la figure suivante.



Figure : Distinction entre le mauvais et le bon chromatogramme

3.4 – Informations requises de la chromatographie

On peut déduire, de la chromatographie, plusieurs paramètres importants. Il s'agit, par

exemple, du temps de rétention (t_R) et le pourcentage de chaque substance du mélange.

3.4.1 – Temps de rétention (t_R)

Le temps de rétention est le temps nécessaire à un composé pour éluer de la colonne et peut être détecté. Conventionnellement, le temps de rétention est déterminé au sommet du pic chromatographique qui correspond généralement à la moitié de l'élution du composé. Un exemple de chromatogramme est présenté ci-dessous.

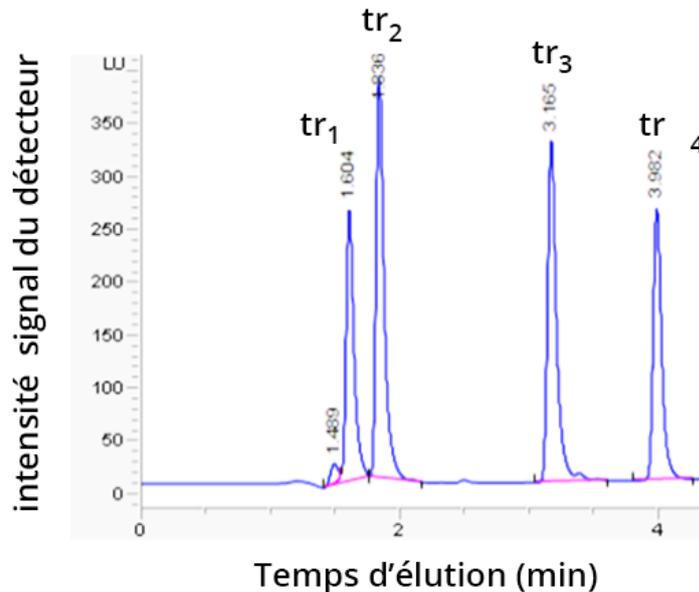


Figure : Présentation du temps de rétention de chaque substance chimique.

3.4.2 – Facteur de rétention (k)

Le facteur de rétention k (anciennement appelé facteur de capacité et noté k') permet d'appréhender la capacité de la colonne à retenir le composé dans les conditions d'élution paramétrées. Pour déterminer le facteur de rétention, il faut pouvoir connaître le temps mort* (t_m) et le temps de rétention du composé concerné ($t_{R,i}$). Le facteur de rétention se détermine avec la formule suivante :

$$k = \frac{t_{R,i} - t_m}{t_m}$$

$t_{R,i}$: Temps de rétention du composé (i)

t_m : Temps mort de la colonne

Si $k \leq 1$, l'élution est trop rapide,

si $k \geq 5$ L'élution est trop lente.

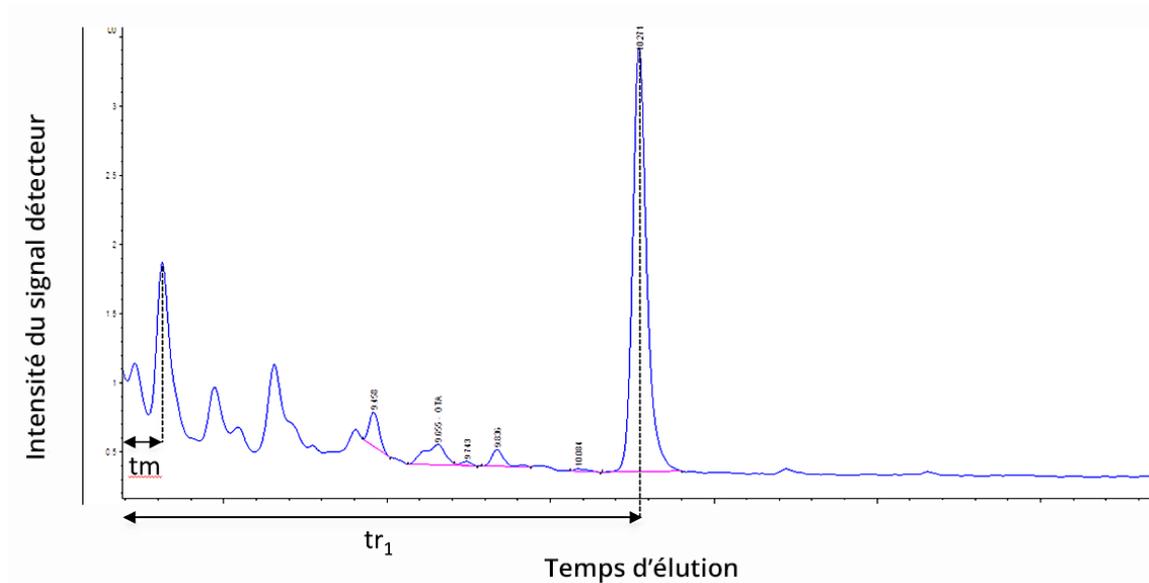


Figure : Présentation de l'intensité du signal en fonction du temps de l'élution.

Nous rappelons que le temps mort est le temps minimum, après injection, nécessaire à un composé pour traverser la colonne et être analysé. Pour déterminer le temps mort de la colonne, il faut utiliser un composé qui n'est pas retenu par la colonne et qui élue avec la phase mobile sans interaction avec la phase stationnaire.

3.4.3 – Efficacité de la colonne (Nombre de plateaux (N))

L'efficacité d'une colonne se détermine généralement par le nombre de plateaux théorique que la colonne aura vis-à-vis du composé considéré. Le nombre de plateaux théorique correspond au nombre de fois qu'un composé sera échangé entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ainsi le passage d'un composé de la phase mobile vers la phase stationnaire puis le retour vers la phase mobile représente un plateau. Le nombre de plateaux théorique peut se déterminer avec la formule suivante :

$$N = 16 \frac{t_{R,i}^2}{I_i}$$

$t_{R,i}$: Temps de rétention du pic i

I_i : Largeur à la base du pic i

Plus le nombre de plateaux est élevé et plus l'efficacité de la colonne est importante et plus le pic du composé sera fin.

3.4.4 – La résolution

La résolution R_S d'une colonne est la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux analytes A et B. Elle se calcule avec la formule suivante :

$$R_S = \frac{2 (t_{R,2} - t_{R,1})}{I_2 + I_1}$$

$t_{R,1}$: Temps de rétention du pic 1

I_1 : Largeur à la base du pic 1

La résolution ne se calcule qu'entre deux pics adjacents. Plus la résolution sera élevée et plus la séparation des deux pics sera bonne.

$R_S \leq 0,75$ Mauvaise séparation

$R_S \approx 1$ Séparation incomplète

$R_S \geq 1,5$ Séparation complète.

3.5 – Application de la technique

La chromatographie liquide à haute performance (pression) est une amélioration de la méthode classique de chromatographie liquide ou de partage. En chromatographie liquide, un soluté (ou des solutés) est partagé entre deux liquides non miscibles. En d'autres termes, la phase mobile et la phase stationnaire sont des liquides.

Les principales applications de l'HPLC sont :

- **Analyse qualitative** : HPLC en tant qu'outil qualitatif a des applications très limitées. Il n'est pas possible par HPLC d'identifier positivement un composé à moins qu'un composé pur ne soit également disponible.

Une petite quantité de l'échantillon pur de la substance, censée être présente dans l'échantillon pour analyse, est ajoutée à l'échantillon. Si l'hypothèse sur la présence de ce composé était correcte, la hauteur du pic dû à ce composé augmentera. et si l'hypothèse était erronée, un nouveau pic apparaîtra sur le chromatogramme. Les composants séparés sont généralement identifiés par spectrométrie de masse ou spectroscopie infrarouge.

- **Analyse quantitative** : L'analyse quantitative est réalisée en mesurant les hauteurs et les aires des pics et en les comparant à une courbe d'étalonnage

Différentes quantités connues d'une substance sont mélangées avec le gaz porteur et

le mélange est passé à travers la chromatographie. La hauteur du pic est dessinée. C'est la courbe d'étalonnage.

Si plusieurs composés sont présents dans le mélange analytique, une courbe d'étalonnage distincte est tracée pour chaque composé. La hauteur du pic est la longueur de la perpendiculaire tirée du sommet du pic à la ligne de base

La concentration peut également être calculée en mesurant l'aire sous la courbe de formation de pic. C'est ce qu'on appelle la zone de pointe. La surface du pic est trouvée en multipliant la hauteur du pic par la moitié de la largeur du pic (la largeur mesurée au milieu de la hauteur de pic).

- **Séparation des mélanges :** La chromatographie liquide à haute performance est une méthode de séparation efficace et hautement sélective. Les petits échantillons peuvent être séparés. La seule condition est qu'une paire de solvants non miscibles appropriée soit disponible. Généralement, la plus polaire des deux devient la phase stationnaire. En HPLC, la séparation est effectuée à température ambiante. Par conséquent, les substances thermiquement instables, qui ne peuvent pas être séparées par GLC, peuvent être séparées. La méthode est également applicable pour la séparation des ions inorganiques, [19].

La HPLC est une méthode qui a beaucoup d'applications surtout au niveau de la chimie des substances naturelles. En effet, la HPLC est également utilisée pour l'identification, la séparation et la quantification de certaines familles de molécules dans les extraits de plantes (Bobzin *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2001).

Parmi les techniques chromatographiques les plus utilisées dans l'analyse des flavonoïdes au cours des 20 dernières années, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) reste donc la méthode la plus utilisée (Harborne 1988, Robardset Antolowich 1997, Merken et Beecher 2000)..

Elle a ajouté une nouvelle dimension à l'étude des flavonoïdes dans les extraits végétaux et alimentaires. Les avantages particuliers sont l'amélioration, la résolution des mélanges de flavonoïdes par rapport à d'autres techniques chromatographiques, la capacité d'obtenir des données quantitatives qualitatives et précises en une seule opération, et la grande vitesse d'analyse (Harborne 1988, Markham 1989).

La chromatographie en phase normale a été utilisée pour la séparation de flavonoïdes (flavone, flavonol et aglycones de flavanone) dans le jus d'orange (Galensa et Herrmann 1980). Les acétates de flavonoïdes ont été séparés et détectés à 312 ou 270 nm sur LiChrosorb Si60 en

utilisant des systèmes de solvants benzène- acétonitrile, benzène-éthanol ou iso-octane-éthanol-acétonitrile. Cependant, pour les systèmes en phase normale, on craint que les matériaux hautement polaires puissent être irrévérablement retenus dans la colonne (vande Castele et al.1983), de sorte que les caractéristiques de séparation pourraient être progressivement modifiées. Ainsi, la chromatographie en phase inversée (RP) a invariablement été la méthode de choix pour la séparation des flavonols et d'autres groupes de flavonoïdes dans les fruits

La méthode normale de séparation utilise une colonne C 18, avec de l'eau phases mobiles et méthanol ou acétonitrile comme modificateur organique. De petites quantités d'acide acétique, de tampons d'acide formique ou de phosphate incorporés dans la phase mobile ont tendance à améliorer nettement séparations de flavonoïdes et d'autres composés phénoliques (Lamuella-Raventós et Waterhouse 1994, Merken et Beecher 2000).

Cependant, comme pour les flavonols, la HPLC et, en particulier, RP-HPLC est la méthode de choix dans l'analyse des acides phénoliques.

Les systèmes de solvants utilisés dans la HPLC analytique comprennent généralement éluions à gradient binaire utilisant des solvants d'acides aqueux acétique, formique ou phosphorique avec du méthanol ou l'acétonitrile comme modificateur organique. Le pH et la force ionique de la phase mobile sont connus pour influencer la rétention des composés phénoliques dans la colonne en fonction de la protonation, de la dissociation ou d'un dissociation (Marko-Varga et Barcelo 1992). Un changement de pH qui augmente l'ionisation d'un échantillon pourrait réduire la rétention dans une séparation en phase inversée. Ainsi, de petites quantités d'acétique (2–5%), l'acide formique, phosphorique ou trifluoroacétique (0,1%) sont inclus dans le système de solvants pour supprimer l'ionisation des groupes phénoliques et carboxyliques et donc améliorer la résolution et la reproductibilité des analyses chromatographiques.

3.6 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation de molécules, basée sur une phase mobile gazeuse. La substance à analyser doit être vaporisable pour être entraînée par le gaz vecteur (Grob, 2004).

3.6.1. Application de la CPG

La chromatographie en phase gazeuse (GC) n'a qu'une applicabilité limitée dans l'analyse des flavonoïdes et autres composés phénoliques en raison de leur volatilité limitée;

le principal inconvénient est une étape supplémentaire nécessaire pour assurer la volatilité des composés phénoliques (Lee et Widmer 1996, Robards et Antolowich 1997).

Dans les années 1980, la GC a été appliquée pour l'analyse des acides phénoliques dans les fruits (Möller et Herrmann 1983, Schuster et Herrmann 1985) et les légumes (Huang et al.1986). Cependant, l'analyse GC avec détection par spectrométrie de masse (MS) a été appliquée pour l'analyse des flavonols dans thé noir (Finger et al.1991) et chou (Nielsen et al.1993). Avantages de l'analyse GC comprennent une séparation améliorée des isomères étroitement liés et un couplage simple aux détecteurs MS pour l'identification par le modèle de fragmentation (Mouly et al. 1993, Schmidt et al. 1994).

Un exemple courant est la détermination des structures des acides gras (lipides) par des méthodes utilisant un couplage chromatographique en phase gazeuse et la spectroscopie de masse (Christie, 1998). Ce couplage est aussi utilisé pour le suivi des réactions, et pour l'oxydation de l'Acide Désoxyribo Nucléique (Dizdaroglu, 1994). La CPG peut aussi être couplée avec un détecteur UV dans le but d'analyser une famille de métabolites bien précise comme l'analyse de terpènes (Qiu et *al.*, 2017)

Elle reste une technique de choix dans l'identification car elle ne nécessite pas une séparation préalable de l'extrait. Cependant, les extraits polaires nécessitent un prétraitement, à savoir des dérivations (méthylation ou silylation) (Christie, 1998).

3.7 Autres techniques

Nous allons décrire dans un premier temps les différents couplages utilisés dans des domaines très divers entre une technique chromatographique et une technique spectroscopique. Cette partie traitera dans un premier temps des différents couplages avec une technique de chromatographie en phase gazeuse et dans un deuxième temps avec une technique de chromatographie en phase liquide.

3.7.1. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

HPLC-MS est une méthode rapide et fiable pour les analyses structurales de composés phénoliques non volatils, puisque de meilleures techniques (systèmes d'interfaçage) ont été développées pour l'élimination des phases mobiles liquides avant ionisation (Careri et al. 1998).

Pietta et coll. (1994) ont montré que chromatographie liquide thermospray (LC) MS est une excellente technique pour l'analyse du flavonol glycosides Flavan-3-ols de plantes médicinales. (Lin et al.1993) et divers groupes de polyphénols y compris les glycosides de flavonol (Kiehne et al.1993) dans le thé ont été étudiés à l'aide de thermospray LC-SP. Bombardement atomique rapide par ions positifs MS et MS tandem ont été utilisés pour étudier les liaisons glycosidiques dans les flavonoïdes diglycosyliques (Li et Claeys 1994). Electrospray et ses plusieurs les variations sont des développements plus récents dans les spectromètres de masse à ionisation à pression atmosphérique (Robards et Antolowich 1997). L'ionisation par électrospray HPLC (ESI) -MS offre des avantages termes de sensibilité et de capacité pour l'analyse de grands composés thermolabiles et hautement polaires. (Robards et Antolowich 1997, Careri et al. 1998).

HPLC-ESI-MS a été utilisé pour étudier les flavonoïdes dans le thé (Poon 1998) et dans la tomate et le plasma (Mauri et al. 1999). La technique d'ionisation Pression Atmosphérique (API) -MS a été appliquée pour l'analyse des flavonoïdes dans les fruits et légumes (Justesen et al. 1998).

Les méthodes de couplage entre les techniques de séparation et de détection sont des outils de spéciation reconnus et indispensables pour évaluer le danger des éléments traces. La large application de la chromatographie liquide (HPLC) associée à la spécificité et la sensibilité de la spectrométrie de masse (MS) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) a rendu leur couplage de plus en plus abouti dans différents domaines tels que l'environnement, l'agroalimentaire et la santé.

3.8. Mesure de l'activité antioxydante

3.8.1. Différentes méthodes de mesure de l'activité antioxydante

À l'heure actuelle, l'activité antioxydante des produits naturels contenant des polyphénols constitue un sujet de recherche très étudié. L'intérêt pour les antioxydants naturels a commencé depuis les années 1990 où on a largement identifié l'influence de plusieurs produits alimentaires et boissons comprenant des fruits, des légumes, du thé, du café et du cacao sur la santé humaine qui s'avère être étroitement associée à l'activité antioxydante des polyphénols. De nos jours, l'activité antioxydante des produits naturels est considérée comme un paramètre distinctif déterminant leur valeur sur le marché. Ce dernier a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer l'activité antioxydante de ces produits (Roginski et Lissi 2005).

Considérant d'une part l'importance nutritionnelle des antioxydants dans la prévention de plusieurs maladies, et d'autre part, leur rôle physiologique potentiel dans la protection des plantes contre les dommages causés par les ERO lors de stress oxydant, il est nécessaire de disposer de méthodes permettant d'évaluer de la manière plus précise possible l'activité antioxydante globale d'un aliment ou d'une plante (de ses tissus ou organes). Bien qu'il existe une grande variété de classifications et des méthodes chimiques pour déterminer l'activité antioxydante des extraits naturels et qu'il n'existe pas un consensus entre les auteurs, presque tous confirment l'importance d'utiliser diverses méthodes afin de déterminer l'activité antioxydante des polyphénols naturels. Cependant, à cause de la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués et la nature diversifiée à la fois des DRO et des antioxydants, il n'existe aucune méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être exprimée d'une façon précise (Frankel et Meyer 2000).

Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer cette activité antioxydante. Leur principe de fonctionnement se base sur la réaction fondamentale d'oxydation-réduction impliquant soit un transfert d'électron soit un transfert d'un atome d'hydrogène (Walker, 2001)..

La structure et la solubilité des antioxydants, jouent aussi un rôle essentiel dans la détermination de mécanisme dominant. Suivant les réactions d'oxydo-réduction impliquées, la majorité des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante peut être divisée en deux catégories (Wright *et al.*, 2001). (Tableau 2.1). La première catégorie est SET (Single Electron Transfer) : ces méthodes sont basées sur le transfert d'électron. Elles mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron non accompagné d'un atome d'hydrogène pour réduire les

ERO (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).. La seconde catégorie est HAT (Hydrogen atom transfer): c'est méthodes basées sur le transfert d'un atome hydrogène. Elles mesurent donc la capacité d'un antioxydant à neutraliser les ERO par le don d'hydrogène (Ishige *et al.* 2001) (Antolovich *et al.*, 2002)..

Les méthodes basées sur le transfert d'électron (SET) mesurent l'activité antioxydante d'un antioxydant (AH) à réduire un oxydant (Ox), qui change de couleur quand il est réduit. Toutefois, les méthodes SET sont très sensibles à l'acide ascorbique et l'acide urique, vu qu'ils cèdent généralement deux électrons (Huang *et al.* 2005). Cependant, les oligoéléments et les contaminants (en particulier métaux) interfèrent avec les méthodes SET et peuvent causer une haute variabilité des résultats (Prior *et al.* 2005).

La réactivité relative des SET est basée sur la déprotonation (lié à l'acidité) et le potentiel d'ionisation du groupe fonctionnel de l'antioxydant et par conséquent elles dépendent du pH (Lemanska *et al.* 2001). L'activité antioxydante mesurée par les SET est calculée à partir du pourcentage d'inhibition du radical en présence de l'antioxydant.

Les méthodes basées sur le transfert d'hydrogène (HAT) mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser un radical libre par don d'un hydrogène. La réactivité relative des HAT est déterminée par l'énergie de dissociation de liaison des groupes de donneurs d'hydrogène des antioxydants. C'est pour cette raison qu'elles sont indépendantes du solvant et du pH utilisé (Wright *et al.*, 2001). La présence d'agents réducteurs telle que les métaux pourrait fausser leurs résultats (Prior *et al.*, 2005). Le calcul de l'activité antioxydante mesurée par les HAT est basé sur des courbes cinétiques (Mukhtar et Ahmad 2000 ; Yang et Landau 2000). Le tableau montre les méthodes les plus employées pour mesurer l'activité antioxydante de composés phénoliques.

Tableau 17 : Les méthodes les plus employées pour mesurer l'activité antioxydante des composés phénoliques in vitro (Huang et al. 2005)

<p>Méthodes basées sur le transfert d'électron (SET)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ▪ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ▪ FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ▪ Copper (II) reduction capacity ▪ Réactif Folin-Ciocalteu
<p>Méthodes basées sur le transfert d'hydrogène (HAT)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) ▪ TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) ▪ Crocin bleaching assay ▪ IOU (Inhibited oxygen uptake) ▪ Inhibition of LDL oxidation

3.8.2. Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron (SET)

3.8.2.1. Méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans (1993) puis améliorée en 1999. Elle est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La solution ABTS est obtenue en mélangeant l'ABTS avec un oxydant qui donne une solution d'une couleur bleu intense.

L'activité antioxydante est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. La réduction de l'ABTS conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 734 nm de la solution (Re *et al.*, 1999). Le radical ABTS^{•+} est formé par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de

l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H•), l'atome d'azote concerné piège un H•, conduisant à l'ABTS⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (figure). Plus l'absorbance finale est faible, plus la valeur TEAC est élevée, c'est à dire plus l'antioxydant est efficace (Schlesier et al. (2002); Miquel-Becker et al., (2004).

Cette méthode a pour avantages sa simplicité à mettre en oeuvre et sa rapidité. De plus, la solution d'ABTS est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affectée par la force ionique, elle peut donc déterminer l'activité antioxydante lipophile et hydrophile (Awika et al., 2003).

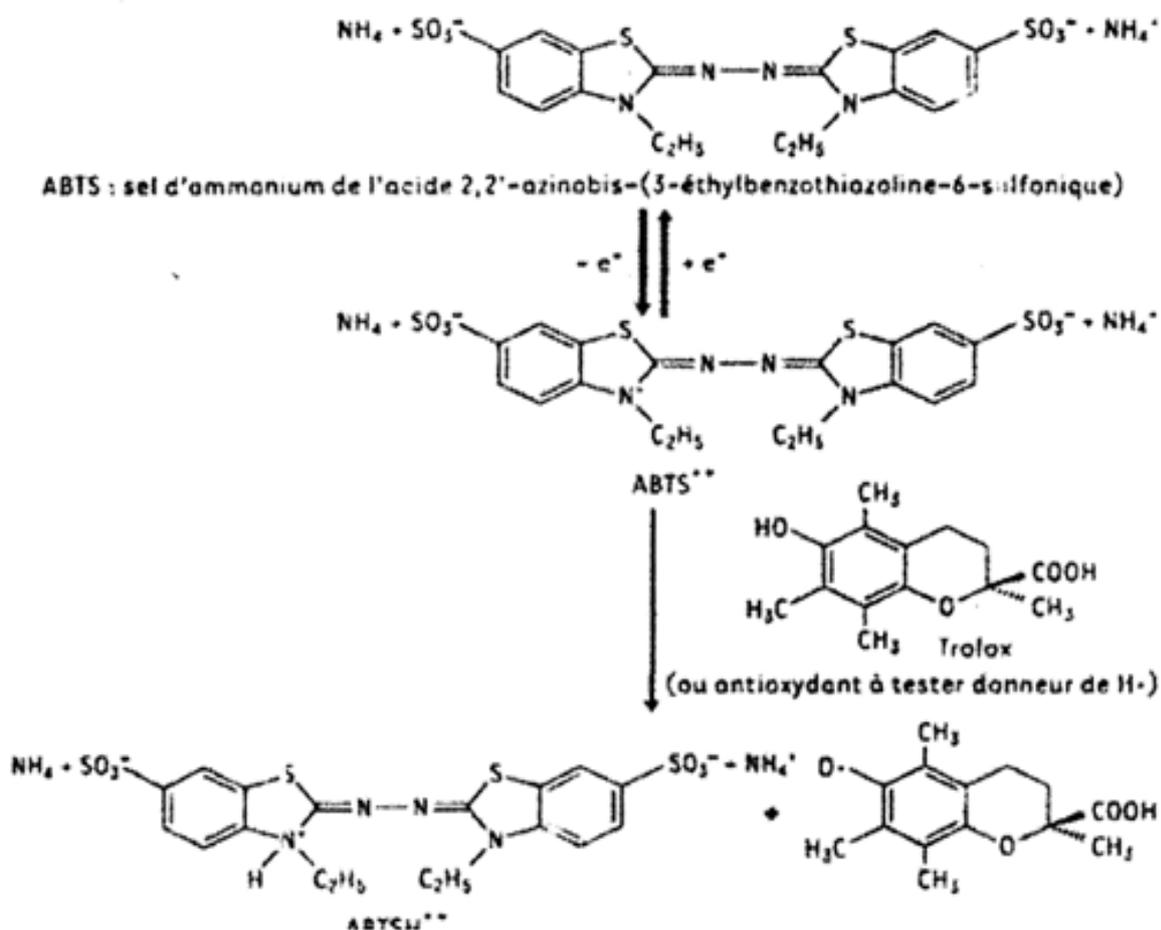


Figure 78 : Transformation de l'ABTS en ABTS⁺ par oxydo-réduction et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H• (Lien EJ et al ,1999).

Cependant, le principal inconvénient de la méthode TEAC avec l'ABTS est que la méthode est basée sur l'hypothèse que les réactions oxydo-réductions se déroulent rapidement, de sorte que toutes les réactions soient terminées entre 4 et 6 minutes. Toutefois, il existe des

réactions oxydo-réductions plus lentes. Donc la méthode n'est pas adéquate pour toutes les réactions, ce qui peut donner des valeurs erronées de l'activité antioxydante si la lecture est faite avant la fin de la réaction (Prior *et al.*, 2005).

Van den Berget et ses collaborateurs (1999) ont conclu que l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante en utilisant la méthode TEAC peut être difficile, voire impossible, mais elle peut être utilisée pour fournir un ordre de classement des antioxydants.

3.8.2.2. Méthode utilisant Le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante des polyphénols peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette (figure 1.12). Celui-ci a été très utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des polyphénols. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des polyphénols d'agir comme piègeur des radicaux libres (free radical scavengers).

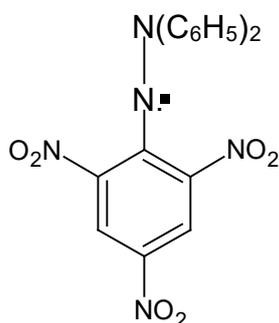


Figure 79 : Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

C'est une méthode colorimétrique basée sur la perte de couleur à 515 nm due à la réduction du DPPH (Figure 2.7). La concentration en antioxydants est proportionnelle à la baisse de l'absorbance due à la diminution de l'intensité de la coloration de la solution DPPH. Cette concentration sera donc calculée en pourcentage :

$$AA\% = 100 - (\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc}) \times 100 / (\text{Abs contrôle}) \text{ (Mensor et al., 2001).}$$

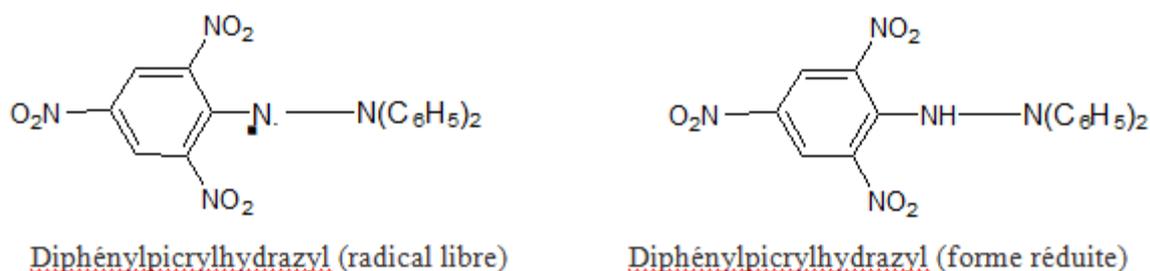


Figure 80 : Diphénylpicrylhydrazyl, radical libre et forme réduite.

La méthode a pour avantages d'être relativement simple et peu coûteuse (prior *et al.*, 2005). Cependant, elle a pour inconvénients que des antioxydants peuvent rester inertes face au DPPH relativement stable (Huang *et al.*, 2005). De plus, certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés, et beaucoup d'antioxydants peuvent réagir plus lentement avec le DPPH (Huang *et al.*, 2005). De même, l'interprétation est compliquée quand d'autres composés ont des absorbances qui se chevauchent avec celles de DPPH à 515 nm, comme les caroténoïdes. En outre, le DPPH n'est soluble que dans des solvants organiques (éthanol, méthanol), ce qui rend la mesure de l'activité antioxydante d'antioxydants hydrophiles difficiles (Amao, 2000). Le dernier inconvénient que pose ce radical est son instabilité à la lumière, c'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH doivent impérativement se faire dans l'obscurité (Ozcelik *et al.*, 2003).

Les polyphénols agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale selon la réaction chimique ci-dessous :



Plus un composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant (Sanchez-Moreno et al 1998). Bien que la méthode DPPH soit généralement classée en SET, ce radical peut en fait être neutralisé soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par des transferts d'atome d'hydrogène (prior *et al.*, 2005).

La méthode du DPPH trouve plusieurs applications, en effet elle a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité. Par exemple, l'activité de la (+)-catéchine, du gallate éthylique, de l'acide ascorbique et du tocophérol en utilisant la méthode DPPH ont été étudiés par RMN ¹³C (Sawai et Moon 2000). La catéchine agissait avec le DPPH

en formant une structure *o*-quinone dans le noyau B. En général, les composés phénoliques sont capables de montrer une forte activité antioxydante avec le DPPH (Silva et al., 2000 ; Amarowicz et al., 2000). L'activité antioxydante des jus de grenade a été évaluée par la méthode du DPPH. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour le thé et le raisin rouge (Gil et al., 2000). Les auteurs ont démontré que les tannins hydrolysables ont été les principaux responsables de la haute efficacité observée.

Rosseau-Richard (1990) et collaborateurs ont employé une méthode cinétique pour quantifier l'activité antioxydante des composés dérivés de l'ellipticine, un agent anticancérigène très puissant, en utilisant le DPPH. Ils ont considéré que la mesure de la constante de vitesse de second ordre de la réaction entre le DPPH et les antioxydants peut constituer une estimation de la mobilité de l'atome H à partir de certains dérivés de l'ellipticine contenant un groupement OH en position 9. Ohashi (1999) et son équipe ont aussi employé une méthode cinétique pour évaluer l'activité antioxydante des six dérivés méthyliques de la quercétine. Les auteurs, travaillant en excès de phénol avec des concentrations vingt fois supérieures à celle du DPPH, ont mesuré la constante de vitesse de pseudo premier ordre de la réaction, réaction qui a été suivie par spectroscopie à 516 nm.

3.8.2.3. La méthode FRAP (Ferrie Reducing Antioxidant Power)

Originellement conçue pour mesurer le potentiel antioxydant du plasma sanguin, la méthode FRAP a pour avantage d'être aussi adéquate pour mesurer le potentiel de composés purs à base de végétaux (Prior *et al.*, 2005).

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur les capacités réductrices des antioxydants testés à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) (pellegrini *et al.*, 2003). À l'origine, cette méthode consiste à ramener l'ion ferrique à l'ion ferreux *in vitro*. À pH 3,6 et à 37°C, les antioxydants réduisent stoechiométriquement le complexe Fe (III)/tripyridyltriazine, en excès, en un complexe bleu de Fe (II), avec une augmentation de l'absorbance à 593 nm. La capacité antioxydante est considérée comme étant la capacité réductrice des antioxydants vis-à-vis du Fe (III). La valeur FRAP est déterminée en rapportant l'absorbance de l'échantillon à l'absorbance de la référence (celle du Fe (II)) durant une réaction de 4 min (Diouf 2003).

Elle consiste à observer après quatre minutes le changement d'absorbance à 593 nm dû à la réduction du complexe Fe³⁺—TPTZ (fer 2, 4,6-tripyridyls- triazine) et l'apparition d'une couleur bleue (Benzie et Strain, 1996; Roginsky et Lissi, 2005) (Figure 2.8).

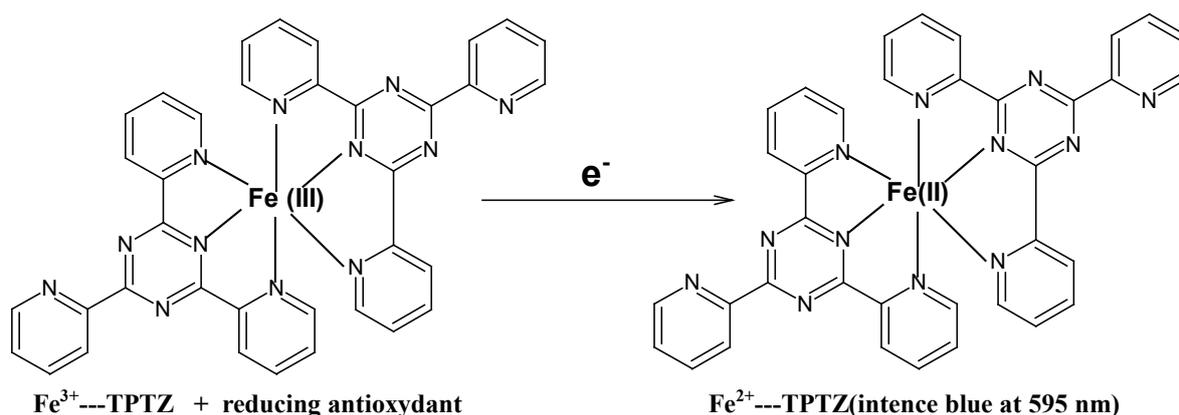


Figure 81 : Passage du complexe Fe^{3+} —TPTZ de la forme ferrique à la forme ferreux Fe^{2+} —TPTZ au cours de la méthode FRAP (prior *et al.*, 2005).

De plus, la méthode FRAP est simple, rapide et peu couteuse. Toutefois, la principale limite de cette méthode réside dans le temps de réaction. En effet, le potentiel de plusieurs molécules ne peut être mesuré par FRAP, comme certains phénols qui réagissent plus lentement et demandent un temps de réaction plus long pour leur détection (30 minutes) (Huang *et al.*, 2005). De plus, elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe sulfhydryle SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène (prior *et al.*, 2005).

3.8.2.4 Folin-Ciocalteu

La méthode de Folin-Ciocalteu a été mise au point en 1927 (Folin et Ciocalteu, 1927) et ensuite revue et améliorée par Singleton et Rossi (1965). Elle est généralement utilisée pour le dosage des polyphénols, mais elle peut être utilisée aussi pour la mesure de l'activité antioxydante puisque son mécanisme de base est une réaction d'oxydoréduction (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

Son principe est simple, lors de l'oxydation des phénols, le réactif Folin constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$), qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène ($\text{M}_{12}\text{O}_{23}$) (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple et peu coûteuse. Cependant, son inconvénient est que le réactif Folin n'est pas spécifique aux polyphénols, et peut réagir avec d'autres composants non-phénoliques notamment les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'ascorbate, l'acide tartrique et les sulfites (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005) en plus de certaines substances inorganiques qui peuvent également réagir avec le réactif de Folin pour donner des concentrations élevées ce qui faussent les résultats (Prior *et al.*, 2005).

3.8.2.5. Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT)

3.8.2.5.1 La méthode ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Cette méthode est basée sur le travail de Ghiselli (1995) et développée par Cao (1998). Elle mesure la capacité d'un antioxydant à prévenir les dommages oxydants d'une molécule cible par des radicaux peroxydes générés par l'AAPH (2,2' azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) (Crichton *et al.*, 2002) (Figure 2.9).

Originellement conçue avec la p-phycoerythrin (B-PE) comme fluorochrome, elle fut par la suite améliorée en remplaçant la B-PE par de la fluorescéine, le rouge pyrogallol (RP), ou encore l'acide linoléique. L'utilisation de ce dernier peut nous donner une idée plus proche des réactions *in vivo* puisque c'est un acide gras très abondant dans les graisses végétales et animales.

Cette méthode consiste à suivre la dégradation de la molécule cible lorsqu'elle est oxydée par les radicaux peroxydes générés à partir du AAPH à 37 °C (Ou *et al.*, 2001).

La présence d'antioxydants qui vont transférer leur hydrogène aux radicaux peroxydes dans un échantillon donné va retarder la dégradation la molécule cible. Donc l'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'intensité de fluorescence ou la baisse d'absorbance du rouge pyrogallol ou encore une hausse d'absorbance due à l'accumulation de produits de la peroxydation de l'acide linoléique en fonction du temps.

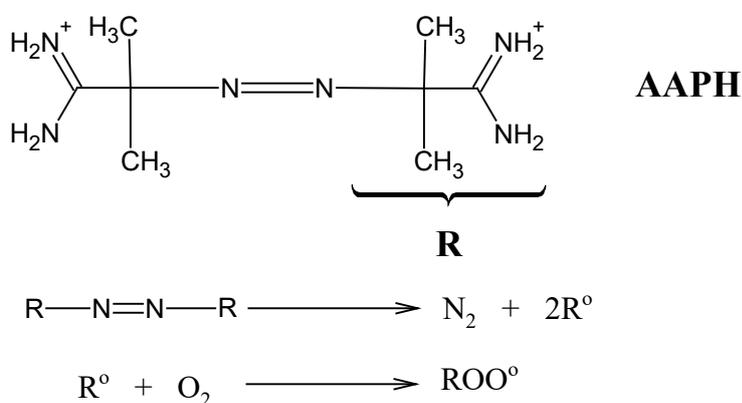


Figure 82 : Génération de radicaux peroxydes à partir de l'AAPH.

La méthode ORAC fait intervenir une mesure cinétique afin de déterminer l'activité antioxydante. Des courbes de la dégradation de la molécule cible en présence ou non d'un antioxydant sont tracées en fonction du temps, et l'aire située entre les deux courbes de décroissance est calculée (Cao, 1998; Cao et Prior, 1999) (Figure 2.10).

La méthode ORAC a pour avantage d'être sensible, standardisée et adaptée aux antioxydants hydrophiles et lipophiles (prior *et al.*, 2005). Elle peut aussi être applicable pour évaluer la l'activité antioxydante des aliments (Cao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996) y compris les extraits de fruits, légumes et les thés (Prior *et al.*, 2003) aussi que les solutions biologiques comme le plasma sanguin (prior *et al.*, 2003).

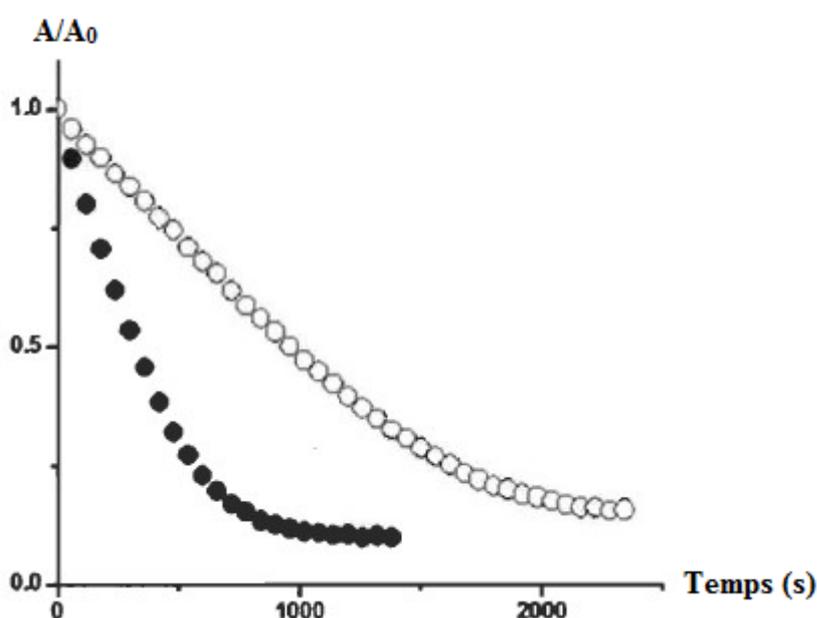


Figure 83 : Exemple de courbes cinétiques de dégradation des protéines R-phycoérythrine et P-phycoérythrine (RP) en présence(o) et en absence (●) de jus de raisin (Alarcon -Lopez *et al.*, 2011).

Cependant, les principaux inconvénients de l'utilisation de la méthode ORAC sont que ces réactions sont sensibles à la température, juste une faible différence de température peut diminuer la reproductibilité de la méthode (phipps *et al.*, 2007). Notons aussi que le temps d'analyse est assez important (prior *et al.*, 2005).

Malgré ces inconvénients, selon Huang et ses collaborateurs (2005) et United States Département of Agriculture USDA (2007), la méthode ORAC est la meilleure pour la mesure de l'activité antioxydante, en raison de sa pertinence biologique aux antioxydants *in vivo*.

Les protéines hautement fluorescentes R-phycoérythrine et P-phycoérythrine ont aussi été utilisées afin de mesurer l'activité antioxydante des polyphénols. Les radicaux peroxyde générés par décomposition thermique de l'amorceur 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH), à 37°C provoquent la perte de fluorescence de ces protéines. L'addition d'un antioxydant réagissant rapidement avec les radicaux peroxydes empêche la perte d'intensité de la fluorescence des protéines proportionnelle à l'activité antioxydante (Antolovich et al., 2002). Cette méthode intègre deux mesures selon la technique de la courbe d'affaiblissement de fluorescence : la première est le degré auquel un échantillon empêche l'action d'un oxydant, donné par la pente de la courbe pendant l'inhibition, et la seconde est la durée de l'inhibition.

Wang et collaborateurs (1996) ont étudié l'activité antioxydante de 12 fruits et 5 jus de fruits par cette méthode. La fraise et le jus de raisin ont eu la plus grande activité ORAC qui est attribuée à la présence de quantités importantes de vitamine C, de vitamine E, de β -carotène, de flavonoïdes et de phénols de petit poids moléculaire.

3.8.2.5.2. TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter)

La méthode TRAP a été développée par Wayner en 1985 et est basée sur la mesure de l'oxygène consommé lors de la réaction de peroxydation. Cette réaction est provoquée par la décomposition thermique de l'AAPH (dichlorhydrate de 2,2'-azobis-2-méthyl-propionamide), qui génère des radicaux peroxyde 235 in situ.

Une électrode à oxygène thermostatée est utilisée pour surveiller la profondeur de l'oxygène. Cependant, l'électrode à oxygène est instable pendant la période de mesure (environ 2 heures par échantillon, de plus, le temps d'analyse est beaucoup plus important que celui d'ORAC (la réaction de TRAP est de 300 min) Par la suite, la méthode TRAP a été améliorée pour tirer parti de l'augmentation de la chimioluminescence provoquée par la réaction des radicaux peroxy avec le luminol. Ce changement améliore la précision de la méthode et automatise la mesure (Prior *et al.*, 2005). Il existe d'autres méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT) comme HORAC (Assay Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity), Chemiluminescence (CL) qui ne seront pas développées dans ce chapitre vue que leur réaction de base est similaire à celle d'ORAC.

3.8.3. Autres méthodes

3.8.3.1. Méthodes mettant en jeu la formation de produits au cours de l'oxydation.

Une des méthodes qui permet de mesurer un des produits primaires d'oxydation est celle de l'indice de peroxyde (PV, peroxide value). Les hydroperoxydes sont des produits primaires formés lors de l'oxydation lipidique en jouant un rôle essentiel dans l'autoxydation des lipides. L'inhibition de leur formation et/ou l'action des antioxydants peut être employée comme indicateur afin d'évaluer l'activité antioxydante (Antolovich et al., 2002). Il s'agit d'une analyse volumétrique de l'iode libérée à partir de l'iodure de potassium par l'oxydation avec des peroxydes à température ambiante et dans un milieu chloroforme/acide acétique. Bandoniene et collaborateurs (2000) ont étudié l'activité antioxydante des extraits de sauge, de l'herbe douce et de la camomille dans l'huile de graine de colza à 40 °C en déterminant l'indice de peroxyde, aussi bien que le temps d'induction (temps auquel le PV a atteint une valeur de 20 mequiv.kg⁻¹) et le facteur de protection (rapport du temps d'induction de l'échantillon avec les extraits au temps d'induction de l'échantillon sans les extraits). Les résultats ont démontré que les extraits de sauge et de l'herbe douce ont eu la plus importante activité antioxydante due principalement à une quantité plus élevée de composés phénoliques.

Une deuxième méthode aussi très employée qui utilise des produits intermédiaires d'oxydation est celle qui détermine les diènes conjugués. Au début de l'oxydation, les lipides subissent l'abstraction d'un atome d'hydrogène, et le produit formé est habituellement stabilisé par un réarrangement moléculaire en générant un diène conjugué. La quantification des diènes conjugués se réalise en calculant l'augmentation de l'absorbance à 234-235 nm par rapport à la masse de l'échantillon dans un temps fixe (Frankel et al., 1996). La mesure de la formation de diènes conjugués présente l'avantage de permettre l'évaluation dans une étape initiale du processus d'oxydation. Cependant, la méthode des diènes conjugués par spectroscopie UV est considérée comme une mesure générique, fournissant peu d'information concernant la nature des composés impliqués. La sélectivité de cette technique peut être améliorée par la séparation des différents diènes conjugués en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (Halliwell et Gutteridge 1999).

3.8.3.2–Méthode utilisant l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric acid reactive substances TBA-RS)

La méthode qui emploie des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric acid reactive substances TBA-RS) est aussi communément utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols. Le test TBA mesure la quantité de dialdéhyde malonique (MDA) qui se forme comme produit d'un endoperoxyde des acides gras insaturés au cours de l'oxydation lipidique (Antolovich 2002). Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner des pigments de coloration rouge. La quantité de pigments peut être mesurée par

spectroscopie à 532-535 nm. Plusieurs substrats ont été utilisés afin de déterminer les TBA-RS, par exemple, certains types de tissus, l'acide linoléique, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et d'autres acides gras (Miyaké et al., 1997 ; Saccini et al., 1992). L'oxydation est inhibée par l'action des antioxydants et par conséquent, on pourra observer une diminution de l'absorbance. L'activité antioxydante est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la formation de MDA.

La décomposition des produits primaires de l'oxydation lipidique produit des mélanges complexes comprenant des époxydes, des cétones, des hydrocarbures et des aldéhydes saturés et insaturés tels que l'hexanal (Halliwell et Gutteridge 1999). C'est ainsi que plusieurs mesures de ces produits finaux d'oxydation ont été utilisées dans le but d'évaluer la capacité antioxydante des polyphénols. Par exemple, l'indice d'anisidine (anisidine value) a été couramment employé pour mesurer la formation de 2-alcène-als au cours de l'oxydation des huiles (Antolovich 2002). Les composés comportant, dans leur structure, des groupements carbonyles en incluant le pentanal, le deca-2,4-diène et l'octa-3,5-diène-2-one semblent être les principaux responsables du mauvais goût associé à la rancidité dans plusieurs produits alimentaires (Heydaneck et MacGorin 1981 ; Corbo et al., 2000). L'hexanal est le produit final le plus abondant, et par conséquent le plus employé comme marqueur de la propagation du processus d'oxydation lipidique (Zwart et al., 1997 ; Koelsch et al., 1991).

Frankel (1985) a fourni une étude détaillée des mécanismes impliqués dans l'autoxydation lipidique et du spectre des produits obtenus dans ce processus. Cette étude a été très utile afin de comprendre le rapport entre les caractéristiques structurales des acides gras, les hydroperoxydes intermédiaires et les métabolites secondaires volatiles qui se produisent au cours de l'oxydation. L'activité antioxydante peut être calculée comme le pourcentage d'inhibition d'un ou plusieurs des produits secondaires d'oxydation par rapport à un échantillon utilisé comme référence (Frankel et al., 1995 ; Hassan et Swet-Fan 2005).

3.8.3.3. Méthodes d'oxydation accélérée

Les essais réalisés afin d'évaluer la résistance des lipides à l'oxydation mettant en jeu des procédés accélérant la détérioration d'un substrat par l'action de la lumière UV ou de températures élevées sont connus comme méthodes d'oxydation accélérée (Antolovich 2002).

Ces essais ont été employés pour l'évaluation des antioxydants phénoliques et leurs résultats sont habituellement exprimés en termes de temps d'induction. Dans certains cas, ils peuvent être un reflet des conditions auxquelles les huiles et les graisses sont soumises lors de leur production, de la fabrication des aliments ou de l'utilisation domestique.

Pour évaluer la résistance des huiles à l'oxydation, on utilise souvent la méthode Rancimat, laquelle utilise un système, à des températures élevées, où les produits volatils de l'oxydation sont détectés par conductimétrie (Diouf 2003). Barrera-Arellano et Estevez (1989) ont utilisé cette méthode afin de mesurer l'activité antioxydante de protecteurs naturels d'une huile de soja. En effet, au cours d'une oxydation accélérée à haute température, le changement soudain de la conductivité de l'huile après quelques heures indique la fin de l'autoprotection de cette huile.

En présence d'antioxydant, l'huile a montré plus de résistance par rapport à l'oxydation en absence d'additifs, et l'activité antioxydante est déterminée par l'augmentation du temps d'induction. Tura (2007) et collaborateurs utilisèrent cette méthode Rancimat pour évaluer l'influence des polyphénols, des tocophérols, des caroténoïdes, de la chlorophylle et du degré d'insaturation des acides gras sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive. Les quantités de polyphénols dans l'huile et le rapport entre les quantités d'acides gras saturés et insaturés ont été les facteurs les plus importants déterminant la stabilité oxydative de cette huile.

La méthode de Rancimat et le test DPPH ont été utilisés afin de déterminer l'activité antioxydante des acides hydroxycinnamiques (Chen et Ho 1997). Les résultats de l'étude ont démontré les différences concernant l'activité antioxydante de différents composés en fonction de l'huile utilisée dans la méthode de Rancimat et des conditions employées dans les deux tests.

3.8.3.4. La méthode AOM (Active Oxygen Method)

La méthode AOM (Active Oxygen Method) permet de faire une prédiction de la stabilité des lipides contre l'oxydation. Cette méthode fait passer de l'air à travers des échantillons en utilisant des conditions spécifiques de débit à 98 °C afin d'accélérer le processus d'oxydation (Velasco et Dobarganes 2002). En suivant certains intervalles, les peroxydes et les hydroperoxydes formés sont déterminés par le titrage avec de l'iode. La valeur AOM est définie comme le nombre d'heures nécessaires pour atteindre une concentration en peroxyde de 100 meq par kg d'échantillon. Plus l'échantillon est stable, plus long sera le temps requis. La méthode a comme inconvénient sa lenteur puisqu'une huile stable peut exiger 48 heures ou plus avant d'atteindre la concentration en peroxyde requise. Malgré la diminution de son emploi, elle s'utilise encore pour déterminer la stabilité des huiles à l'autooxydation.

Nergiz et Unal (1991) ont utilisé cette méthode afin d'évaluer l'efficacité de l'extraction de polyphénols en tenant compte de la stabilité à l'oxydation de l'huile d'olive. Les auteurs ont démontré que la présence des phénols est un facteur très important dans la stabilité de l'huile ;

l'huile ayant la plus grande quantité de phénols est celle qui est la plus stable vis-à-vis de l'oxydation.

3.8.3.5. La méthode du four de Schaal (Schaal oven test)

La méthode du four de Schaal (Schaal oven test) est une autre procédure qui détermine la stabilité des huiles dans des conditions accélérées. Ce test est la plus simple des méthodes accélérées et consiste à chauffer un échantillon dans un récipient fermé à 63 °C. L'échantillon est donc, périodiquement surveillé jusqu'au moment d'avoir une apparence de rancidité, et l'indice de peroxyde peut être déterminé (Velasco et Dobarganes 2002). Parfois, cette méthode requiert de longs intervalles de temps ; elle pourra être substituée par des méthodes plus sophistiquées qui utilisent une surveillance continue des changements de masse et d'enthalpie tels que l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la calorimétrie différentielle (DSC).

3.8.3.6. La méthode faisant intervenir l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la calorimétrie différentielle (DSC).

Les méthodes d'analyse thermique ont été employées dans le but de caractériser l'activité antioxydante à des températures élevées. Kowalski (1991) a utilisé la calorimétrie différentielle pour évaluer la stabilité des huiles végétales en chauffant les échantillons jusqu'à 360 °C. Litwinienko (1997) et son équipe ont aussi examiné la cinétique d'oxydation thermique de l'acide linoléique dans des conditions non isothermiques en utilisant la calorimétrie différentielle (DSC) (50-300 °C). Les auteurs ont constaté la facilité de la méthode qui est relativement simple et rapide permettant d'examiner l'efficacité des antioxydants phénoliques. Cette technique a également été employée afin de mesurer l'efficacité de divers antioxydants commerciaux et de phénols dans le squalène (Breese et al., 2000).

L'analyse thermogravimétrique (TGA), malgré le fait d'être une méthode bien connue permettant d'étudier l'absorption de l'oxygène dans l'industrie des polymères, a suscité une attention limitée pour évaluer la stabilité oxydante. Dans un travail initial, Nieschlag et al (1974) ont estimé la stabilité oxydative d'échantillons d'huiles de crambe par TGA. Les changements de masse sous un environnement d'oxygène, avec une vitesse de chauffe déterminée, ont été continuellement surveillés. L'évaluation de la résistance de l'huile à l'oxydation a été obtenue en mesurant le pourcentage de gain de poids dû au processus d'oxydation. Gennaro et al (1998) ont employé la TGA afin d'estimer l'effet des antioxydants sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge.

L'analyse thermogravimétrique a montré une reproductibilité élevée, s'avérant ainsi être une technique fiable pour évaluer la stabilité à l'oxydation des huiles et des graisses avec ou sans antioxydants. Rudnik et collaborateurs (2001) ont étudié la stabilité oxydative de l'huile de lin par des essais classiques (détermination de l'indice de peroxyde et la méthode Rancimat) et par des méthodes d'analyse thermique. Les résultats obtenus par TGA et DSC ont été en accord avec ceux obtenus par ces méthodes dites classiques. Par conséquent, ils ont conclu que les méthodes d'analyse thermique peuvent être employées pour prédire la stabilité oxydative d'huiles végétales et des acides gras, aussi bien que pour évaluer l'efficacité antioxydante des additifs synthétiques ou des extraits naturels.

3.8.3.7. Méthode utilisant La résonance paramagnétique électronique (RPE)

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une autre technique qui peut spécifiquement détecter les radicaux libres impliqués dans l'autoxydation, et permet d'étudier l'effet des antioxydants phénoliques sur ces radicaux (Antolovich et al., 2002). Elle est intrinsèquement sensible aux radicaux libres stables tels que le DPPH, le nitrosodisulphonate de potassium et le 2,6-di-ter/-butyl-a-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-p-tolyloxy (Miquel-Becker et al., 2004). Cependant, la RPE ne permet pas de détecter des radicaux de courte vie mis en cause dans les processus d'oxydation. D'autres techniques ont été utilisées afin d'améliorer la détection de ces radicaux ; par exemple la radiolyse puisée, la photolyse UV et le spin-trapping. La RPE est une technique relativement nouvelle pour l'étude des antioxydants et de l'oxydation lipidique. Malgré ses limitations actuelles, elle est considérée comme très prometteuse par le fait qu'elle permet la mesure directe des concentrations de radicaux libres formés durant le processus d'oxydation.

3.9. Outil nécessaire pour l'estimation de l'activité antioxydante globale

Comme on vient de le voir dans les paragraphes précédents, il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer l'activité antioxydante, mais aucune de ces méthodes à elle seule n'est suffisante pour exprimer l'activité antioxydante globale des produits à analyser. En effet, une seule méthode ne peut tenir compte de la diversité de la nature des antioxydants (hydrophile, hydrophobe) ainsi que la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués dans les réactions des méthodes (SET et HAT). Bien que de fortes corrélations entre plusieurs méthodes aient été établies, plusieurs chercheurs insistent sur l'importance de caractériser l'activité antioxydante d'un aliment ou d'un produit par l'utilisation de plusieurs méthodes (Pellegrini *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Stratil *et al.*, 2006).

Par conséquent, en raison de l'absence d'un test standard à l'heure actuelle, il est difficile de comparer les résultats rapportés de différentes recherches. L'activité antioxydante d'une variété d'aliments est généralement mesurée par plusieurs méthodes, et les comparaisons sont essentiellement faites à partir des classements (ou rang) des échantillons entre eux (prior *et al.*, 2005). Mais sur quelles bases doit-on choisir les méthodes? Comment fait-on pour dire et démontrer celles qui sont complémentaires ou redondantes? Que fait-on avec les valeurs de l'activité antioxydante provenant des différentes méthodes? Autrement dit, comment combiner ces valeurs quantitativement ?

Par exemple, Pellegrini et ses collaborateurs (2003) ont mesuré l'activité antioxydante de 34 légumes, 30 fruits, 34 breuvages et 6 huiles végétales par trois différentes méthodes, ABTS, TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) et FRAP. Les valeurs de l'activité antioxydante de tisanes, thés et cafés obtenues par différents dosages étaient bien corrélées (TRAP vs FRAP: $R^2 = 0.993$; ABTS vs FRAP : $R^2 = 0.997$, TEAC vs TRAP: $R^2 = 0.993$). Dans cette étude, les différents groupes d'échantillons ont été classés selon chaque méthode à part, sans pouvoir donner un classement combiné.

De même, dans l'étude de Ciz et ses collaborateurs (2010), où l'activité antioxydante d'une variété de légumes a été mesurée par Folin-Ciocalteu, TRAP, ORAC-fluorescéine (ORAC-FL) et HORAC (Assay Hydroxyl radical antioxidant capacity). Leurs résultats démontrent une corrélation significative entre toutes les méthodes où les coefficients de corrélation varient de 0.94 à 0.97. Tout comme l'étude de Pellegrini et ses collaborateurs, ils ont classé également l'activité antioxydante des légumes selon chaque méthode.

L'étude de Seeram et ses collaborateurs (2008) semblent être la plus rationnelle puisqu'ils ont proposé un indice de l'activité antioxydante = (mesure obtenue/meilleur rang) x 100 pour chaque méthode. Ensuite, la moyenne de l'ensemble des indices dénoté « antioxidant potency composite index» correspond à un indice global de CA pour chaque boisson.

Pour ce faire, les activités antioxydantes d'une variété de 34 breuvages commercialisés réputés pour avoir une forte activité antioxydante ont été mesurées par 4 méthodes, soit DPPH, ABTS, FRAP et ORAC-FL.

La méthode Folin-Ciocalteu était utilisée pour estimer la teneur en polyphénols non pour la mesure de l'activité antioxydante. Pour chacune des méthodes, les valeurs de chaque échantillon ont été normalisées par rapport à la valeur la plus élevée de cette méthode, et finalement la moyenne des valeurs normalisées des quatre méthodes a été calculée pour chaque échantillon. Les résultats démontrent que l'ordre de classement de CA calculée selon l'indice est

le même que la teneur totale en phénolique dans les breuvages. Ceci suggère que l'activité antioxydante est fortement liée à la teneur en polyphénols. Toutefois, l'obstacle de leur indice réside dans le fait qu'il dépend des résultats des autres échantillons.

De plus, les méthodes utilisées peuvent être redondantes et fournissent ainsi des valeurs exagérées pour le même échantillon. Pour estimer la redondance (et inversement, la complémentarité) entre les méthodes de dosage de l'activité antioxydante, il est utile de comparer les corrélations établies entre les valeurs de l'activité antioxydante estimées par différentes méthodes dans les études rapportées dans la littérature. Le tableau 18 résume l'information trouvée dans sept études utilisant différents produits. En général, les coefficients de corrélation R sont plutôt élevés (supérieurs à 0,9), quoique certaines études rapportent de faibles corrélations entre les méthodes c'est à dire : Folin-Ciocalteu vs ABTS $R = 0,42$ (Scalzo *et al.*, 2005). Une telle variation pourrait s'expliquer par différents degrés de complémentarité entre les méthodes, ainsi que par la diversité des échantillons utilisés (tisanes, thés et fruits).

Tableau 18 : Quelques études de mesure de l'activité antioxydante d'une variété d'échantillons

Étude	Nombre d'échantillons	Méthodes utilisées	Corrélation
<i>Cai et al.</i> , 2004	Plantes médicinales chinoises n = 112	ABTS Folin-Ciocalteu	Extractions méthanolique/ aqueuses $R^2 = 0.964/0.953$
<i>Atoui et al.</i> , 2005	Variétés de thés tisanes n = 9	Luminol chimiluminiscence(CI) DPPH Folin-Ciocalteu	CI vs DPPH $R^2 = 0.97$ Folin-Ciocalteu vs DPPH $R^2 = 0.58$ Folin-Ciocalteu vs CI $R^2 = 0.53$
<i>Scalzo et al.</i> , 2005	Fraises, pêches et abricot n= 6	ABTS Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu vs ABTS $R^2 = 0.56$ pour les fraises $R^2 = 0.42$ pour les pêches $R^2 = 0.09$ pour les abricots
<i>Katalinic et al.</i> , 2006	Plantes médicinales n= 70	FRAP Folin-Ciocalteu	FRAP vs Folin-Ciocalteu $R^2 = 0.980$
<i>Alarcon et al.</i> , 2008	Thé noir, vert, blanc et tisanes n = 11	ORAC-FL ORAC-RP Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu vs ORAC-FL $R^2 = 0.999$ pour les thés $R^2 = 0.935$ pour les tisanes Folin-Ciocalteu vs ORAC-RP $R^2 = 0.95$ pour les tisanes

Les exemples présentés dans le tableau 18 indiquent donc différents degrés de corrélations entre les valeurs de l'activité antioxydante estimées par différentes méthodes. Ces différences sont intéressantes, car elles peuvent guider le choix des méthodes à utiliser pour estimer les différents aspects de l'activité antioxydante, c'est-à-dire utiliser les méthodes complémentaires et éviter celles qui sont redondantes. Cependant, l'examen des coefficients de

corrélation ne suffit pas pour déterminer le nombre nécessaire de méthodes à utiliser. Et surtout, ces coefficients de corrélation ne suggèrent aucunement comment combiner les valeurs de l'activité antioxydante obtenues par les différentes méthodes pour calculer un indice global de l'activité antioxydante.

4. Conclusion

Les techniques analytiques permettent de connaître la nature et les propriétés des substances chimiques. Elles sont utilisées pour l'identification, la séparation et la quantification de certaines familles de molécules dans les extraits de plantes. L'isolement des composés naturels et leurs purifications sont basés sur l'utilisation de combinaisons de méthodes spectroscopiques et chromatographiques. La détermination structurale est obtenue grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques telles que l'UV-visible, l'I.R, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

Des différents travaux de part le monde ont été réalisés pour isoler et identifier des composés naturels polyphénoliques, plus particulièrement les flavonoides. La spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à leur identification.

Concernant la détermination de l'activité antioxydante, bien qu'il existe une grande variété de classifications et des méthodes chimiques pour déterminer l'activité antioxydante des extraits naturels, Il n'y a pas une règle générale pour étudier l'activité antioxydante des antioxydants naturels et il n'existe pas un consensus entre les auteurs, presque tous confirment l'importance d'utiliser diverses méthodes décrites dans la littérature afin de déterminer l'activité antioxydante des obtenus dans les fruits et légumes.

Partie expérimentale

Matériel

et

méthodes

1^{ERE} PARTIE : SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA FRAISE

1. Matériel végétal

Lors de la réalisation de nos travaux, nous avons utilisé des fraises de la variété *fragaria vesca* de la famille des *Rosaceae*. Cette variété est très répandue dans le nord de l'Algérie notamment à l'Ouest du pays dans la wilaya de Mostaganem et à l'Est du pays dans les wilayas de Skikda et de Jijel comme le montre la figure ci-dessous :

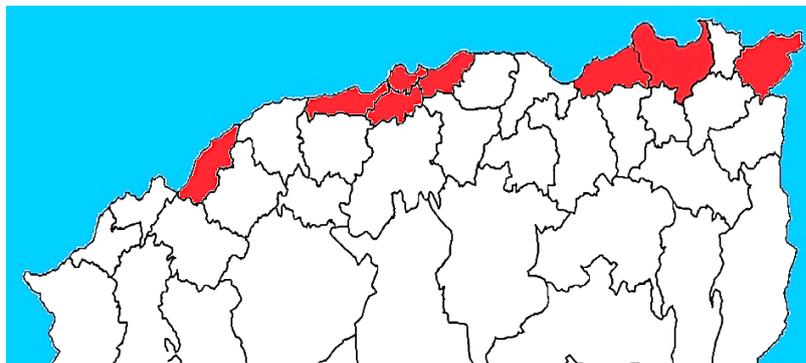


Figure 84 : Répartition de la culture de la fraise en Algérie (MADRP, 2017).

Les fraises ont été achetées au supermarché local de la ville de Mascara (Algérie). Elles ont été transportées le même jour au laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions (GPCS) de l'université de Mascara, afin de réaliser les analyses expérimentales.

Pour réaliser l'objectif de la présente étude et avant d'être utilisées pour les analyses phytochimiques, les fraises ont été immédiatement triées en se basant sur des critères bien établis : fruit complet et sain, en plein maturation, de forme régulière et de couleur uniforme, aucun signe de Botrytis ont été choisies pour nos expériences par contre celles trop petites, trop mures et défectueuses ont été éliminées.



Figure 85 : photographie des fraises utilisées

2. Screening phytochimique

La fraise utilisée dans cette étude est de la variété *fragaria vesca* achetée fraîche au niveau du marché de Mascara et transportée directement au laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions (GPCS) de l'université de Mascara dans des sachets à l'abri de la lumière. 224

L'échantillon représentatif, est divisé en deux lots. Le premier servira pour faire le screening phytochimique et le second pour étudier les paramètres physicochimiques de la fraise à l'état frais.

Le screening phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée.

Des tests en tube sont réalisés sur les extraits de fraises afin de déterminer de manière préliminaire la nature des différents constituants contenus dans le fruit étudiée. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette.

2.1. Les flavonoïdes

À 1 ml de chaque extrait on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré et quelques milligrammes de magnésium (Mg). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange (Azzi R., 2012).

2.2. Les tanins

Pour détecter la présence des tanins, on ajoute à 2 ml de chaque extrait quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condensés) (Karumi *et al.*, 2004) et (Bentabet Lasgaa N.2017).

2.3. Les saponines

À 5ml de chaque extrait on ajoute 10 ml de l'eau distillée, le tout est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Puis, le mélange est laissé au repos pendant 15 min. La persistance de la mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence des saponines (N'Guessan *et al.*, 2009).

2.4. Les quinones libres

Sur un volume de chaque extrait quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyede, 2005) et (Dohou N ; 2015).

2.5. Les terpénoïdes

À 5 ml de chaque extrait on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré, la formation de deux phases et un couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes (Edeoga *et al.*, 2005) et (Yam M.F 2009).

2.6. Les alcaloïdes

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCl 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (Badiaga M. 2011).

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d'HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

2.7. Les oses et holosides

1 ml de chaque extrait et 5 ml d'éthanol donnent un aspect floconneux en présence des mucilages (Niare.A ;2006).

2.8. Les huiles essentielles :

1 g de matériel végétale a été introduit dans 10 ml de dichlorométhane puis l'extrait a été évaporé à sec. Le résidu a été ensuite dissous dans 3 ml d'éthanol. Puis, la solution a été évaporée à sec de nouveau. La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles (Ilboudo S.,2009)

2.9. Composés réducteurs :

Leur détection consiste à introduire 2ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2ml de la liqueur de Fehling sont ajoutés. Ensuite, l'ensemble est porté au bain-marie bouillant durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (Bentabet Lasгаа N.2015)

2.10. Les anthocyanes :

Ce test repose sur le changement de la couleur de l'extrait à 10% avec un changement du pH. On ajoute à l'extrait quelques gouttes de HCl pur, On observe un changement de couleur. On ajoute quelques gouttes de NH₄OH, le changement de la couleur une deuxième fois indique la présence des anthocyanes (Awor et Samseny R-R2003).

3. Analyses physicochimiques

3.1. Détermination de la teneur en eau (Taux d'humidité)

Principe

La perte de masse d'un produit lorsqu'il est soumis à une dessiccation renseigne sur sa teneur en eau (Doymaz *et al*, 2004). Le séchage dans une étuve à 103-105°C pendant 3 heures d'une quantité déterminée de produit, jusqu'à une masse constante donne sa teneur en eau.

Mode opératoire

La teneur en eau a été déterminée selon le protocole décrit par Doymaz *et al*, 2004. Une quantité de 5g d'échantillon sont séchés dans une étuve ventilée à 103°C ±2°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Les résultats de l'extrait sec total exprimés en pourcentage, sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(P_f - P_s) / (P_f - P_0)] \cdot 100$$

P_0 : poids de creuset vide (g).

P_f : poids de creuset contenant l'échantillon, avant étuvage (g).

P_s : poids de creuset contenant l'échantillon, après étuvage (g).

3.2. Potentiel d'Hydrogène (pH)

Principe

Le pH est une mesure quantitative de l'acidité ou de la basicité d'une solution, c'est un paramètre qui permet de mesurer la concentration en ions H^+ dans une solution. Il s'agit d'une grandeur sans unité (**Dutta et al, 2006**).

Mode opératoire

La mesure du pH consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans l'échantillon après réglage de la température d'étalonnage. La lecture se fait directement sur le pH-mètre

Une prise d'essai de 5g bien broyée est mélangée avec 50 ml de l'eau distillée. Après une agitation de 20minutes, l'ensemble est filtré et placé au pH-mètre, et la valeur du pH est indiquée sur l'afficheur (**Benamara, 2017**).

3.3 Acidité titrable

Principe

L'analyse de l'acidité titrable mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, qu'ils soient dissociés, c'est-à-dire ionisés, ou non. Le principe de la méthode consiste à un titrage de l'acidité avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

Mode opératoire

L'acidité de la fraise est déterminée selon la méthode décrite par (**Verma, 2000**). Une prise d'essai de 5g est mélangée avec 20 ml d'eau distillée à pH neutre. L'ensemble est mis sous agitation sur une plaque agitatrice chauffante, pendant 15 minutes, suivi d'une filtration. Le filtrat ainsi récupéré subi une titration, à température ambiante, avec une solution d'Hydroxyde de sodium NaOH (0.01N), sous agitation en même temps la sonde du pH-mètre est plongée dans la solution. Le titrage est arrêté lors d'une valeur du pH =7.

La teneur en acidité titrable est exprimée en g d'équivalent d'acide citrique dans 100g de d'échantillon, est calculée selon la formule qui suit :

$$\text{Acidité (E.A.C./100g)} = N_b \cdot V_b \cdot M / V_a \cdot P$$

M: Masse molaire de l'acide citrique (192,13 g/mol).

V_a: Volume en millilitres de la prise d'essai.

V_b: Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé.

N_b: Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé (0,01 N).

P : Nombre de protons (égale à 3).

3.4. Cendres totaux

Principe

Le dosage des cendres est basé sur la destruction de toute matière organique sous l'effet de température élevée (900 ± 25 °C).

Mode opératoire

Le taux des cendres est évalué selon la méthode décrite par (Leterme et al, 2006).

Une prise d'essai de 400g de chaque échantillon est incinérée dans un four à moufle pendant 5h à 900° C, à la sortie du four les creusets sont mis dans un dessiccateur pour le refroidissement. On réchauffe les creusets à nouveau pendant une demi-heure ou plus, cette opération est répétée jusqu'à ce que le poids devienne constant (de couleur blanche ou blanc grisâtre) (Doukani et Tabak , 2015). Le taux de cendres est calculé par la formule suivante en mg/100g de fruit :

$$\text{Teneur en cendres} = P_{ech} - P_v / P_0$$

P_{ech} : Poids des creusets avec l'échantillon.

P_v : Poids des creusets vide.

P₀: prise d'essai.

3.5. Teneur en sucres totaux

Principe

Les teneurs en sucres totaux sont déterminées par la méthode de Dubois et al. (1956). Les glucides, à chaud et en présence d'acide fort, se déshydratent et forment des dérivés furaniques (furfural dans le cas des pentoses et hydroxymethyl-furfural dans le cas des hexoses), qui se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune-orangé qui présente un maximum d'absorption entre 480 et 490 nm.

Mode opératoire

Une prise d'essai de 2g de la fraise est mélangée avec 50ml de méthanol 80% et laissée sous une agitation pendant 1h30 à température ambiante.

Un volume de 3ml de sels CAREZ I et CAREZ II est additionné au mélange, suivi d'une filtration. Pour un volume de 1 ml du filtrat sont ajoutés respectivement, 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ (1N), le mélange est mis à l'abri de la lumière pendant une heure à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 485nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc.

La teneur en sucre totaux des différents échantillons est exprimée en g équivalent de glucose /100g de fruit, en se référant à une courbe d'étalonnage (fig...)

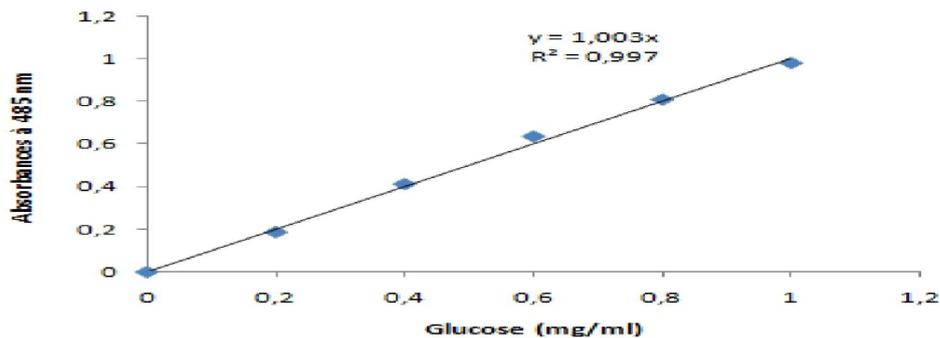


Figure 86 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux en utilisant le glucose.

3.6. Teneur en sucres réducteurs

La teneur en sucres réducteurs de la fraise est déterminée selon la méthode décrite par (Zerrad et al., 2008).

Une prise d'essai de 1g de fruit est mélangée avec 50 ml d'eau distillé. Le mélange agité pendant 45 min à température ambiante est filtré.

Un volume 200µl d'extrait est alors additionné de 300 µl du réactif DNS, et subi un chauffage à un bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Après chauffage, 1.5 ml d'eau distillé, est ajouté au mélange qui sera laissé à l'abri de la lumière pendant 15 min, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La teneur en sucres réducteurs, exprimée en équivalent de glucose, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires (fig...)

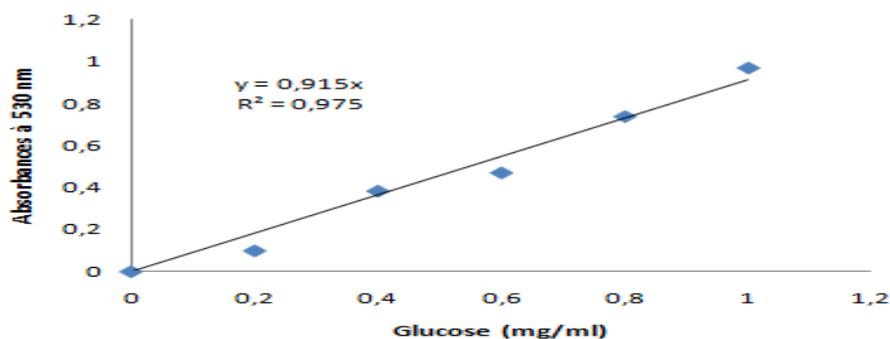


Figure 87 : Courbe étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs en utilisant le glucose.

2^{EME} PARTIE : ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE EN ANTIOXYDANTS NATURELS POLYPHENOLIQUES CHEZ LA FRAISE ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE

1. Matériel végétal

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé des fraises de la variété *Fragaria Vesca* de la famille des *Rosaceae*. Cette variété est très répandue au nord de l'Algérie.

Une fois les fraises achetées du marché de la ville de Mascara, elles étaient transportées le même jour au laboratoire. Avant d'être utilisés pour les bio-essais, les fraises ont été immédiatement triés ; seulement celles à formes régulières sans aucun signe de Botrytis ont été choisies pour nos expériences par contre celles trop petites, défectueuses, trop mures ont été éliminées.

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions (GPCS) de l'université de Mascara, pendant une période de quatre mois durant laquelle seules des fraises mures et intactes ont été sélectionnées et conservées à -4°C .

2. Equipements et matériel utilisé

Agitateur (Heidolph MR 3001 K)	Montage à reflux
Balance (Electronic scale ; 200g/0.001g)	Montage de soxhlet
Balance précision	Réfrigérateur s
Ballons	Rota-vapeur
Baro magnétique	Sonicateur (130 KHZ/15 min)
Bécher (100ml-500ml)	Spectrophotomètre UV mini-1240
Chauffe ballon	(SHIMADZU)
Eprouvettes	Tubes à essai
Fioles (100ml-500ml)	Papier aluminium
Micropipettes (50 μl -100 μl -200 μl -1000 μl)	Papier filtre

3. Produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés lors des différentes analyses sont repris dans le tableau ci dessous:

Tableau 19 : Produits chimiques et réactifs utilisés

Produit	Formule
Méthanol	CH ₃ OH
Ethanol	CH ₃ CH ₂ OH
Acétone	CH ₃ COCH ₃
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃
Réactif de folin-ciocalteu	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀) / H ₃ PMO ₁₂ O ₄₀
Acide gallique	CHO
Nitrite de sodium	NaNO ₂
Chlorure d'aluminium	AlCl ₃
Hydroxyde de sodium	NaOH
Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃
Acide chlorhydrique	HCl
Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Chlorure de fer(III)	FeCl ₃
Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆
DPPH	CHNO

4.Objectif de l'étude :

L'objectif de cette présente étude réalisée au sein du laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions est de déterminer les teneurs en antioxydants naturels tels que polyphénols totaux, flavonoïdes tannins et vitamine C. Pour cela, notre étude est réalisée comme suit :

- Préparation des extraits de fraises dans des solvants mixtes tels que : eau/méthanol, eau/éthanol, eau/acétone et eau/acétate d'éthyle dans divers ratio.
- Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins et vitamine C.

5. Description des Méthodes utilisées

5.1. Extraction par macération

La méthode de séparation est physique, où le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et l'eau sont utilisés comme solvants d'extraction à différents rapports afin d'avoir de très bon rendements d'extraction et d'observer le degré de sélectivité de ces solvants par rapport aux antioxydants naturels contenus dans les fraises (voir tableau 4).

La fraise algérienne *fragaria vesca* disponible dans le commerce est utilisée comme matériau d'extraction. Cette matière première est lavée puis broyée. Une certaine masse de purée de fraise est transférée dans un Erlenmeyer et les volumes appropriés de solvants d'extraction (solvant-eau) sont ajoutés pour enrichir le rapport solide / solvants. Ainsi, 100 ml de solvants sont utilisés pour 30 g de fraise. Le mélange est agité pendant 48 h à 25°C, puis filtré sous vide. Le filtrat est transféré quantitativement dans un ballon rodé de 100 ml et complété avec le mélange des solvants.

Tableau 20 : Les solvants utilisés pour l'extraction par macération à différents rapports:

<u>1^{ere} série</u>	<u>2^{eme} série</u>	<u>3^{eme} série</u>
EtOH 80/ eau 20	EtOH 70 / eau 30	EtOH 50 / eau 50
MeOH 80/ eau 20	MeOH 70 / eau 30	MeOH 50/ eau 50
(CH ₃) ₂ CO 80/ eau 20	(CH ₃) ₂ CO 70 / eau 30	(CH ₃) ₂ CO 50/ eau 50
AcOEt 80/ eau 20	AcOEt 70 / eau 30	AcOEt 50/ eau 50
<u>4^{eme} série</u>	<u>5^{eme} série</u>	
EtOH 30 / eau 70	EtOH 20 / eau 80	
MeOH 30/ eau 70	MeOH 20 / eau 80	
(CH ₃) ₂ CO 30/ eau 70	(CH ₃) ₂ CO 20 / eau 80	
AcOEt 30 / eau 70	AcOEt 20 / eau 80	

Nous présentons le dispositif du processus d'extraction solide – liquide par simple macération comme indiqué dans la figure 88.



Figure 88 : dispositif d'extraction solide – liquide par simple macération

5.2. Préparation des extraits de fraise par macération

Une prise d'essai de 30 g de fraise a été introduite dans un ballon contenant 100mL de solvants binaires. L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 48 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 45°C.

Les essais ont été réalisés en triple. Les extraits bruts obtenus ont été pesés puis conservés dans un flacon stérile hermétiquement fermé.

5.2.1. Préparation de l'extrait méthanol-eau

La méthode consiste à placer 30g de matière végétale (fraise broyée) dans un flacon avec 100 ml de solvant binaire (Méthanol-eau) à différents rapports : [(20 /80) ; (30/70) ; (50/50) ; (70/30) ; (80/20)].

Après Agitation pendant 48heurs et filtration de la solution suivi de l'évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota vapeur (45°C), On Récupère l'extrait brut sous forme de liquide de couleur marron clair.

5.2.2. Préparation de l'extrait éthanol-eau

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait méthanol-eau en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Le mode opératoire est réalisé comme suit :

30g de fraise broyée sont ajoutés à 100 ml de solvant binaire Éthanol –eau à différents rapports [(20 /80) ; (30/70) ; (50/50) ; (70/30) ; (80/20)].

Après agitation pendant 48heurs et filtration de la solution suivi de l'évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota vapeur (45°C), on récupère l'extrait sous forme liquide de couleur marron clair.

5.2.3. Préparation de l'extrait acétone-eau

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait méthanol-eau en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction à la place du méthanol, cela est réalise comme suit :

30g de fraise broyée sont ajoutés à 100 ml de solvant binaire Acétone –eau à différents rapports [(20 /80) ; (30/70) ; (50/50) ; (70/30) ; (80/20)].

Après agitation pendant 48heurs et filtration de la solution suivi de l'évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota vapeur (45°C), on récupère l'extrait sous forme liquide de couleur marron clair.

5.2.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle – eau

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait méthanol-eau en utilisant l'acétate d'éthyle à la place du méthanol, cela est réalise comme suit :

30g de fraise broyée sont ajoutés à 100 ml de solvant binaire Acétate d'éthyle – eau à différents rapports [(20 /80) ; (30/70) ; (50/50) ; (70/30) ; (80/20)].

Après agitation pendant 48heurs et filtration de la solution suivi de l'évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota vapeur (45°C), on récupère l'extrait sous forme liquide de couleur marron clair.

5.3.Calcul des rendements des extraits bruts des fraises

Nous pouvons déterminer les rendements des extraits bruts des fraise de *fragaria vesca* pour les différentes méthodes d'extraction et avec les différents mélanges de solvants utilisés (méthanol- eau ; éthanol- eau ; acétone- eau ; acétate d'éthyle- eau) en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt}(\%) = (P_1 - P_2) / P_3 \cdot 100$$

P₁ : poids du ballon après évaporation du solvant.

P₂ : poids du ballon avant évaporation (ballon vide).

P₃ : poids de la matière végétale (fraise) de départ.

5.4.Choix de la méthode d'extraction

Les méthodes d'extraction des antioxydants naturels que nous avons utilisées au laboratoire sont :

- Extraction par reflux
- Extraction par soxhlet.
- Extraction par ultrasons (sonication)

Ces méthodes sont simples, efficaces et peu coûteuses et facilement réalisables au niveau du laboratoire. Elles sont reproductibles, faciles à mettre en œuvre et elles permettent d'utiliser une large gamme de solvant afin d'extraire différents composés naturels. De plus la méthode d'extraction par sonication possède plusieurs avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. (Kiriamiti, 2003 ; Chemat F. et al , 2008 ; Draye et *al.*, 2009).

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les antioxydants naturels particulièrement sensibles à toute dégradation éventuelle, en particulier en les protégeant de la lumière. De ce fait, chaque ballon d'extraction a été entièrement recouvert d'une feuille d'aluminium.

Les antioxydants naturels en particulier les antioxydants polyphénoliques étant surtout sensibles à l'oxydation et à la température, tous les échantillons ont été extraits et évaporés à température de 45°C et conservés à basse température (- 4°C) et à l'abri de la lumière avant chaque analyse.

La figure ci-dessous décrit les différentes étapes suivies pour l'extraction des antioxydants naturels polyphénoliques contenus dans la fraise.

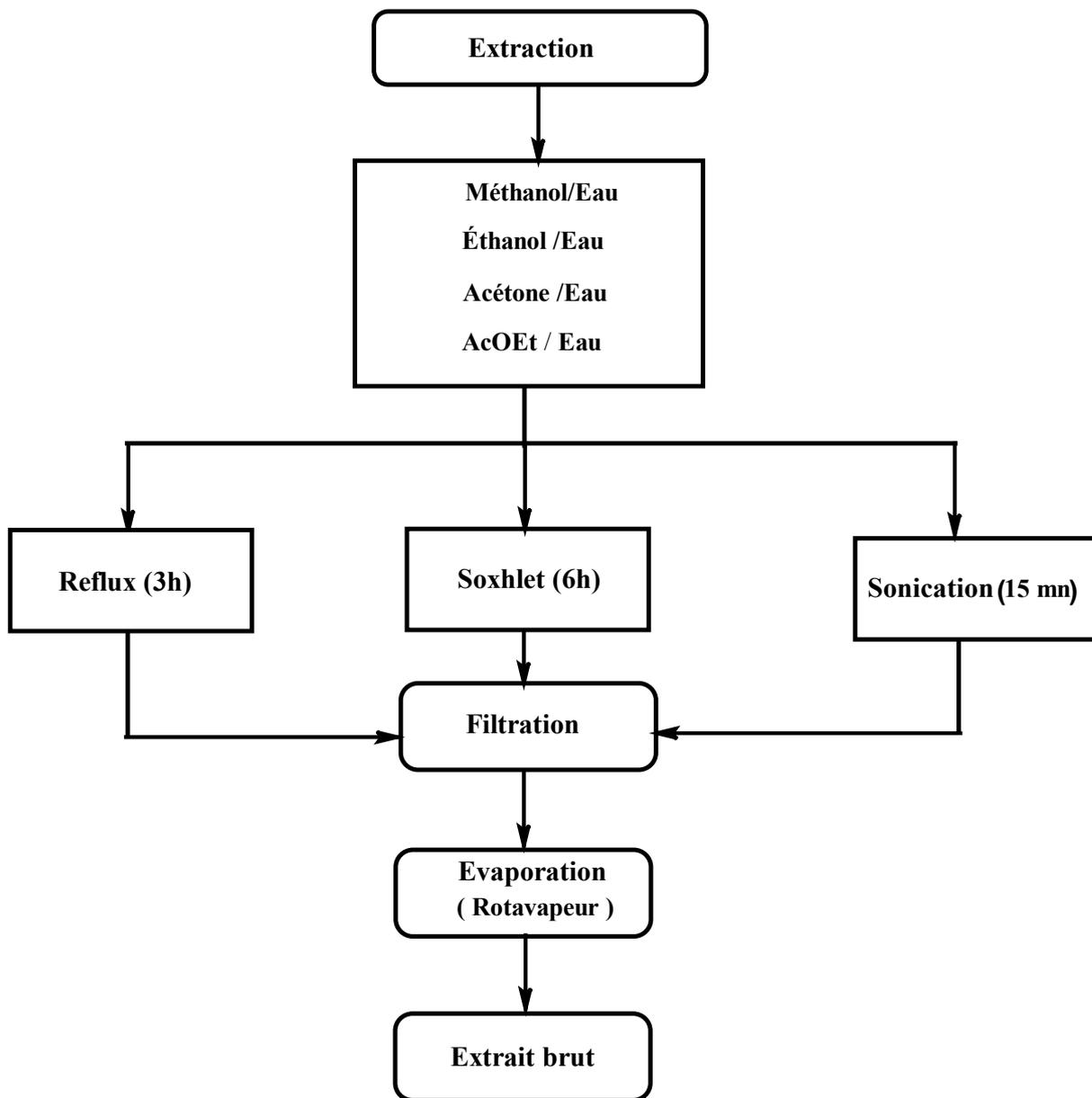


Figure 89 : Les étapes de l'extraction des composés polyphénoliques contenus dans les fraises

5.5 – Choix des solvants

Les antioxydants naturels, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont le méthanol (5.1), l'éthanol (4.3), l'acétone et l'acétate d'éthyle qui présentent une polarité moyenne, et l'eau dont la polarité est la plus élevée (9.0). Nous avons utilisé des mélanges de solvants, tels que méthanol/eau (80/20, v/v), éthanol/eau (80/20, v/v), acétone/eau (80/20, v/v) et ACOEt/eau (80/20, v/v), dont la polarité sera qualifiée d'intermédiaire (Bassène E. 2012 ; Wang, B. 2016 ;Brazinha C. *et al.*, 2014; Yilmaz Y. *et al.*, 2006)..

6 – Préparation des extraits

6.1 – Extraction par chauffage à reflux :

6.1.1 – Préparation de l'extrait méthanol-eau (ME)

- Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 30g de chair de fraises broyée en présence de 100 ml de mélange eau-méthanol (80/20) (figure 90) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (figure 91) ;
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron clair (Gao et Mazza, 1995))

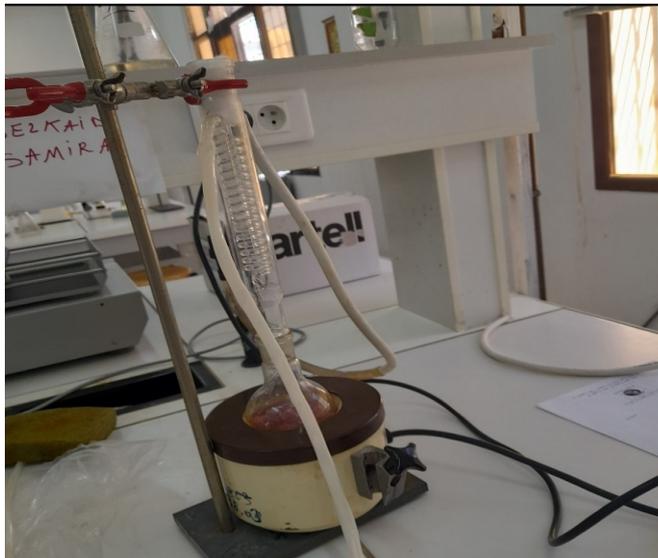


Figure 90 : Extraction sous reflux des extraits de fraise



Figure 91 : évaporation à sec au rotavapor des extraits de fraise

6.1.2. Préparation de l'extrait éthanol-eau- (EE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'éthanol à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 30g de chair de fraises broyée en présence de 100 ml de mélange éthanol-eau (80/20) (**figure 90**) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**) ;

Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron clair (**Mané C, et al, 2007 ; Brazinha C, et al, 2014**).

6.1.3. Préparation de l'extrait acétone-eau (AE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétone à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 30g de chair de fraises broyée en présence de 100 ml de mélange acétone-eau (80/20) (**figure 90**) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**);
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron clair (**Kallithraka S, et al, 1995**).

6.1.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle-eau (ACE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétate d'éthyle à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 30g de chair de fraises broyée en présence de 100 ml de mélange acétate d'éthyle-eau (80/20) (**figure 90**) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**);
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron clair (**Kallithraka S, et al, 1995**).

6.2. Extraction par Soxhlet

6.2.1. Préparation de l'extrait méthanol-eau- (ME)

La méthode consiste à placer 30g de matière végétale (fraise broyée) dans une cartouche avec 300ml de mélange de solvant **méthanol-eau** (80/20, v/v) dans un ballon (**figure 92**) :

- Passage au Soxhlet pendant 6h.
- Filtration de la solution obtenue.
- Evaporation au rota-vapeur (45°C). (**figure 91**)

- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron foncé (Grigonis et al, 2005).



Figure 92 : Extraction par Soxhlet des extraits de la fraise

6.2.2. Préparation de l'extrait éthanol-eau- (EE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'éthanol à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction au soxhlet pendant 6h heures de 30g de fraises broyées en présence de 300 ml de mélange éthanol-eau (80/20) (figure 92) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (figure 91) ;
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron foncé (Toth et al, 2003).

6.2.3. Préparation de l'extrait acétone-eau- (AE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'éthanol à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction au soxhlet pendant 6h heures de 30g de fraises broyées en présence de 300 ml de mélange acétone-eau (80/20) (figure 92) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (figure 91) ;
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron foncé (Sterbova et al, 2004).

6.2.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle-eau- (ACE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétate d'éthyle à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Extraction au soxhlet pendant 6h heures de 30g de fraises broyées en présence de 300 ml de mélange acétate d'éthyle-eau (80/20) (**figure 92**) ;
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**) ;
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron foncé (**Toth et al, 2003**).

6.3. Extraction assistée par ultrasons (Sonication)

La méthode dite extraction par sonication (ultrasons) consiste à placer la matière végétale (fraise broyée) 30g avec 100 ml de mélange de solvant/eau (80/20, v/v) dans un ballon, et à le soniquer dans un bac à ultrasons à 25 KHz pendant 15min (**Tab.21, Fig. 93**).

Les extraits bruts sont récupérés après centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 min, le contenu est ensuite filtré puis passé au rota-vapeur (évaporation). Le marc est alors récupéré puis extrait à nouveau à trois reprises selon le procédé décrit ci-dessous (**figure 94**) :



Figure 93 : Montage de dispositif de l'extraction par sonication

Tableau 21 : Description de l'appareil de sonication (bac à ultrason 3L)

Caractéristiques du bac à ultrasons de 3L

- Un réacteur aux ultrasons PEX3 (R.E.U.S., Contes, France) ;
- Un bac en inox 23-13,7cm en dimensions interne d'une capacité maximale de 3L;
- Un transducteur d'une surface de 25 cm² ;
- Une double enveloppe, qui contrôle de la température du milieu, avec un système de refroidissement et chauffage ;
- Une fréquence de 25 kHz et une puissance de 150 W (sortie du générateur) ;
- La puissance dissipée dans le milieu est 60W, telle qu'elle est mesurée par
- Calorimétrie

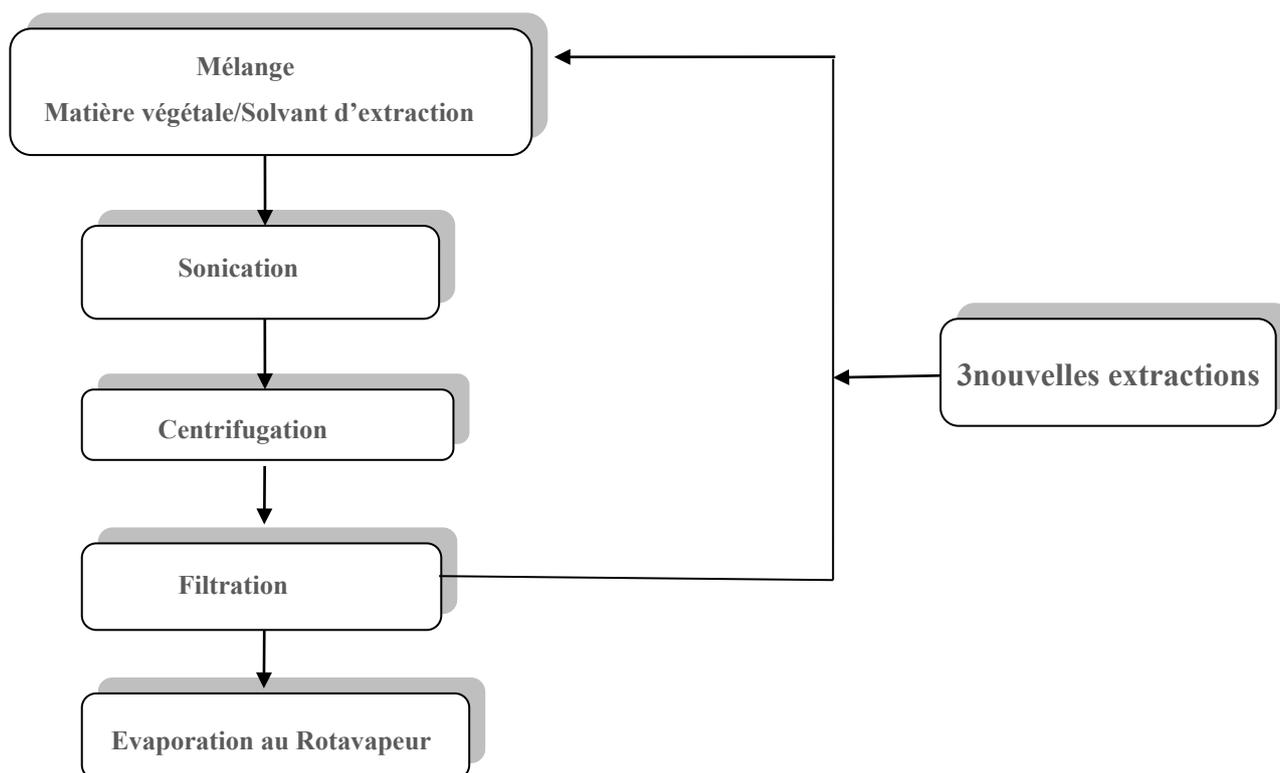


Figure 94 : Etapes d'extraction par sonication des antioxydants naturels de la fraise.

6.3.1. Préparation de l'extrait méthanol-eau- (ME)

L'extraction consiste à placer la matière végétale (fraise broyée) 30g avec 100ml de mélange de solvant méthanol-eau (80/20, v/v) dans un ballon,

- Passage au bain sonicateur pendant 15 mn (**figure 94**)
- Filtration de la solution obtenue.
- Evaporation au rota-vapeur (45°C) (**figure 91**)
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur rose.

6.3.2. Préparation de l'extrait éthanol-eau- (EE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'éthanol à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Mettre 30g de fraises broyées en présence de 100 ml de mélange acétate d'éthyle-eau (80/20) au bain sonicateur pendant 15 mn (**figure 94**)
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**);
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur rose (**Caniova, 2001**).

6.3.3. Préparation de l'extrait acétone-eau- (AE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétone à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Mettre 30g de fraises broyées en présence de 100 ml de mélange acétone-eau (80/20) au bain sonicateur pendant 15 mn (**figure 5**)
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**);
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur rose (**Wang et al, 2004**).

6.3.4. Préparation de l'extrait acétate d'éthyle -eau- (ACE)

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétate d'éthyle à la place du méthanol, cela est réalisé comme suit :

- Mettre 30g de fraises broyées en présence de 100 ml de mélange acétate d'éthyle-eau (80/20) au bain sonicateur pendant 15 mn (**figure 94**)
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) (**figure 91**);
- Récupération de l'extrait brut sous forme liquide de couleur rose (**Pékid et al, 1998**).

7 – Calcul des rendements des extraits bruts des fraises

Nous pouvons déterminer les rendements des extraits bruts des fraises de *fragaria vesca* pour les différentes méthodes d'extraction et avec les différents mélanges de solvants utilisés (méthanol-eau ; éthanol-eau ; acétone-eau ; acétate d'éthyle-eau) en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1-P2) / P3 . 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation du solvant ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale (fraise) de départ.

8 – Dosage des composés polyphénoliques

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et leur teneur sont

extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux (Crozier A, 2003).

8.1 – Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Les premiers travaux effectués sur le dosage des polyphénols totaux ont été réalisés selon la méthode décrite par Singleton et Ross, 1965, en utilisant le folin-ciocalteu comme réactif. Ce réactif est formé d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Ces composés présentent un maximum d'absorption à 765 nm, l'intensité étant proportionnelle à la quantité de polyphénols totaux présents dans nos échantillon (Bruneton J, 1999 ; Sarni-Manchado P, et Cheynier V, 2006).

- **Mode opératoire**

Les polyphénols totaux ont été dosés par le réactif folin-ciocalteu selon la méthode décrite par Vermerris et Nicholson, (2006).

Un volume de 0.1ml de chaque extrait de fraise a été mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 20% fraîchement préparée le tout est agité par vortex et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Après L'ajout de 100 μ l de réactif de folin-ciocalteu 0.2N, le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30minutes.

La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 760nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (0.05, 0.1, 0.2,.....1mg/ml) (voir annexe 1). La concentration des polyphénols totaux présents dans nos extraits exprimés en mg. eq d'acide gallique par mg d'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols totaux}] = a \times f / b$$

- **a** : concentration des polyphénols en μ g/ml déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.
- **f** : facteur de dilution (x10).
- **b** : concentration initiale des extraits (1mg /ml).

8.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} . Les complexes formés sont de couleur jaune et absorbent dans le visible à 510 nm (Alyafi Alazhari, 2007).

Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes des nos extraits de fraises est estimée par la méthode décrite par Kim et ses collaborateurs, (2003).

Un volume de 400 μl de chaque extrait convenablement dilué dans l'éthanol (étalon ou l'éthanol pour le témoin) est ajouté à 120 μl de NaNO_2 à 5%. Après 5 min, on ajoute 120 μl d' AlCl_3 à 10%. Ensuite, après 6 min, on ajoute 800 μl de NaOH (1M). La solution est bien homogénéisée et l'absorbance a été mesurée immédiatement à 510nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations : (0.05 ,0.1, 0.21mg /ml) (voir annexe 1).

La concentration des flavonoïdes en $\mu\text{g.eq}$ catéchine ou quercétine par mg d'extrait présents dans nos échantillons est alors calculée à l'aide de la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a \times f / b$$

- **a** : concentration des flavonoïdes en $\mu\text{g/ml}$ déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.
- **f** : facteur de dilution (x10).
- **b** : concentration initiale des extraits (1mg/ml).

8.3. Dosage des tannins

8.3.1 Dosage des tannins hydrolysables

Mode opératoire

La méthode rappelée dans cette partie afin d'effectuer le dosage des tanins hydrolysables a été décrite par Bate et Smith, (1978) et consiste à prendre 1ml de filtrat et lui ajouter 3.5ml

d'une solution préparée à base de FeCl_3 (10^{-2} M) dans l'acide chlorhydrique (HCL) 10^{-3} M et après 15 secondes de l'ajout de ce réactif on procède à la lecture des résultats au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm.

Les résultats sont exprimés en (mg) des tannins par (ml) en se référant à une courbe d'étalonnage que nous avons dressé à partir d'une gamme d'étalon d'acide gallique ou tannique dans les mêmes conditions de concentrations allant de 0.1 à 0.8g/ml. (voir annexe 1)

8.3.2. Dosage des tannins condensés

Mode opératoire

La méthode par la quelle nous avons réalisé le dosage des tanins condensés est décrite par **Julkunen-Titto, (1985)**.

La teneur en tannins condensés a été déterminée par la méthode à la vanilline et se distingue par l'ajout d'un volume de 50 μ l de chaque extrait à 1500 μ l d'une solution de vanilline dans le méthanol à 4%, puis le tout a été mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μ l d'acide chlorhydrique (HCl) concentré a été additionné. Le mélange obtenue est laissé réagir à température ambiante pendant 20min. L'absorbance est mesurée à 550nm contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 μ g/ml préparées à partir de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage (voir annexe 1).

Les teneurs des tannins hydrolysables et condensés présents dans nos extraits exprimés en μ g.eq de (acide gallique/catéchine) par mg d'extrait sont calculées selon la formule suivante :

$$[\text{Tannins (hydrolysables/condensés)}] = a \times f / b$$

- **a** : concentration des tannins (hydrolysables/condensés) en μ g/ml déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.
- **f** : facteur de dilution (x10).
- **b** : concentration initiale des extraits (1mg/ml).

9 – Evaluation de l'activité antioxydante

9.1 – Evaluation de l'activité antioxydante dans les extraits bruts de fraise

Beaucoup de tests sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Notre étude s'est basée sur le test utilisant le réactif (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), et le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP), cependant des modifications ont été apportées, afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

9.1.1 – Méthode utilisant le réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

L'activité anti-radicalaire des composés phénoliques contenus dans nos extraits de fraises est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (Kordali et al. 2005).

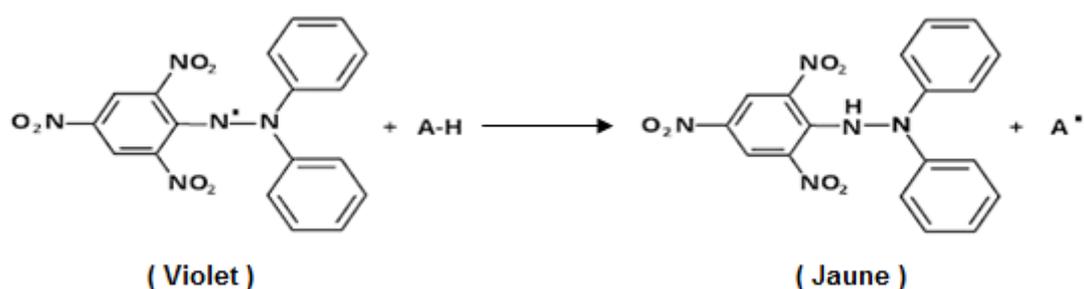


Figure 95 : Changement de couleur du radical libre DPPH lors de la réalisation de l'activité anti-radicalaire

- **Mode opératoire**

Le test effectué au laboratoire est basé sur celui décrit par **Atoui et al, 2005** en y apportant quelques modifications.

A 2 ml de la solution de DPPH à 0.1mM (0.4mg DPPH dans 100ml de méthanol) on ajoute 50µl de chaque extrait à différentes concentrations (100, 200, 3001000mg/ml).

Pour le contrôle négatif, on mélange 50µl de méthanol avec 2ml de DPPH.

Le méthanol constitue le blanc de l'appareil.

- Incubation 30min à température ambiante.
- La lecture se fait à 517nm, comparée au standard qui contient l'acide ascorbique à différentes concentrations (100, 200, 400,2000 mg/ml) (voir annexe 1).

9.1.2 – Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage de réduction de DPPH est donné par la formule suivante (Yen et al, 1994).

$$\%PR \text{ du DPPH} = \frac{(DO \text{ control à } t_0) - (DO \text{ échantillon à } t_{30min})}{(DO \text{ control à } t_0)} \times 100$$

- **%PR du DPPH** : pourcentage de réduction ou inhibition du DPPH.
- **DO controle à t_0** : densité optique du DPPH à t_0 .
- **DO controle à t_{30}** : densité optique à 30min après avoir ajouté l'extrait.

Par la suite, en utilisant les valeurs des pourcentages d'inhibition, les courbes % PR=f(C) ont été tracées respectivement pour les extraits bruts hydro-méthanolique, extrait hydro-éthanolique, extrait hydro-acétonique, et hydro-Acétate d'Ethyle, avec la prise en considération de l'acide ascorbique comme étant le contrôle positif. Afin de pouvoir déterminer l'effet antioxydant de nos extraits, la IC50 de chacun a été calculée et comparée à celle de l'acide ascorbique.

9.1.3 – Calcul des concentrations inhibitrices (IC50)

Par définition la valeur IC50 est la concentration de l'acide ascorbique ou de l'extrait qui peut réduire 50 % du DPPH, cette dernière est déterminée graphiquement [Sánchez., 1998]. Les IC50 sont calculées graphiquement par la formule de la régression des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés de nos fraises.

9.1.4 - Les dilutions de l'extrait au cours de l'évaluation de l'activité antioxydante :

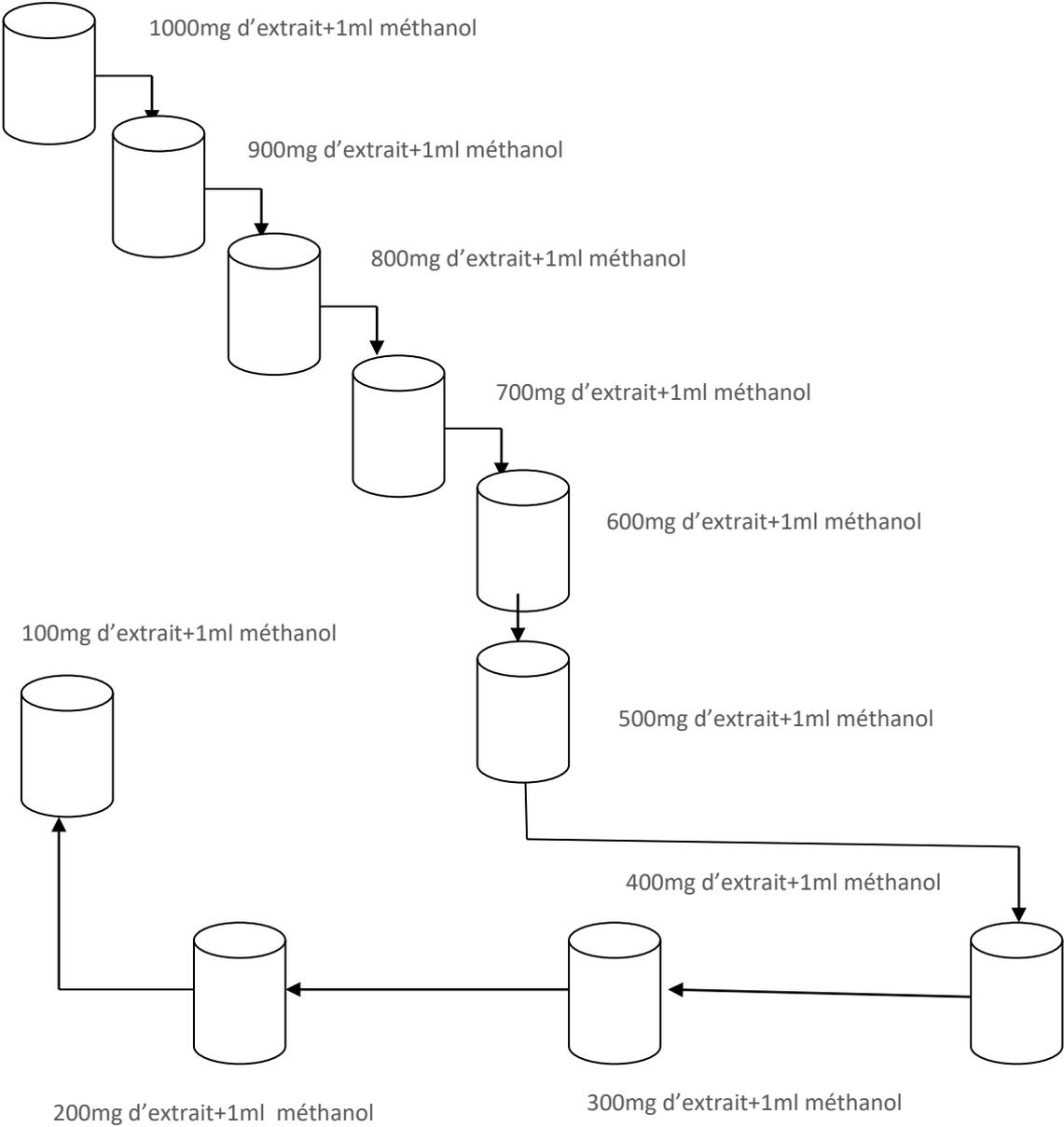


Figure 96 : Diagramme des dilutions de l'extrait lors de la réalisation l'activité antioxydante

9.1.5 - Evaluation de l'activité antioxydante



Figure 97 : diagramme de l'activité antioxydante des extraits de fraise

9.1.6 – Dilution de la vitamine C au cours de l'évaluation de l'activité antioxydante

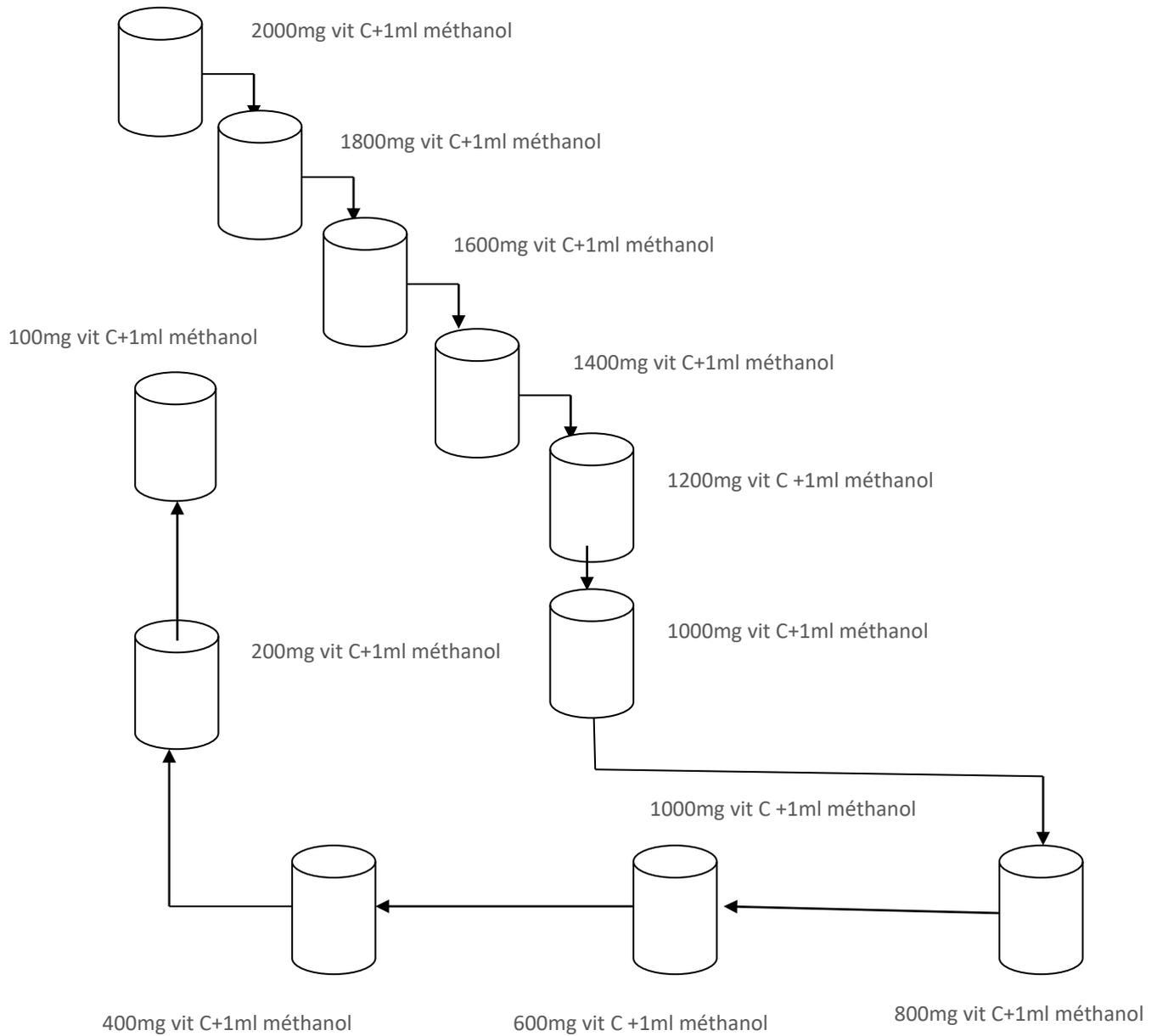


Figure 98: diagramme de la dilution de vitamine C.

9.1.7 – Evaluation de l'activité antioxydante de la vitamine C:

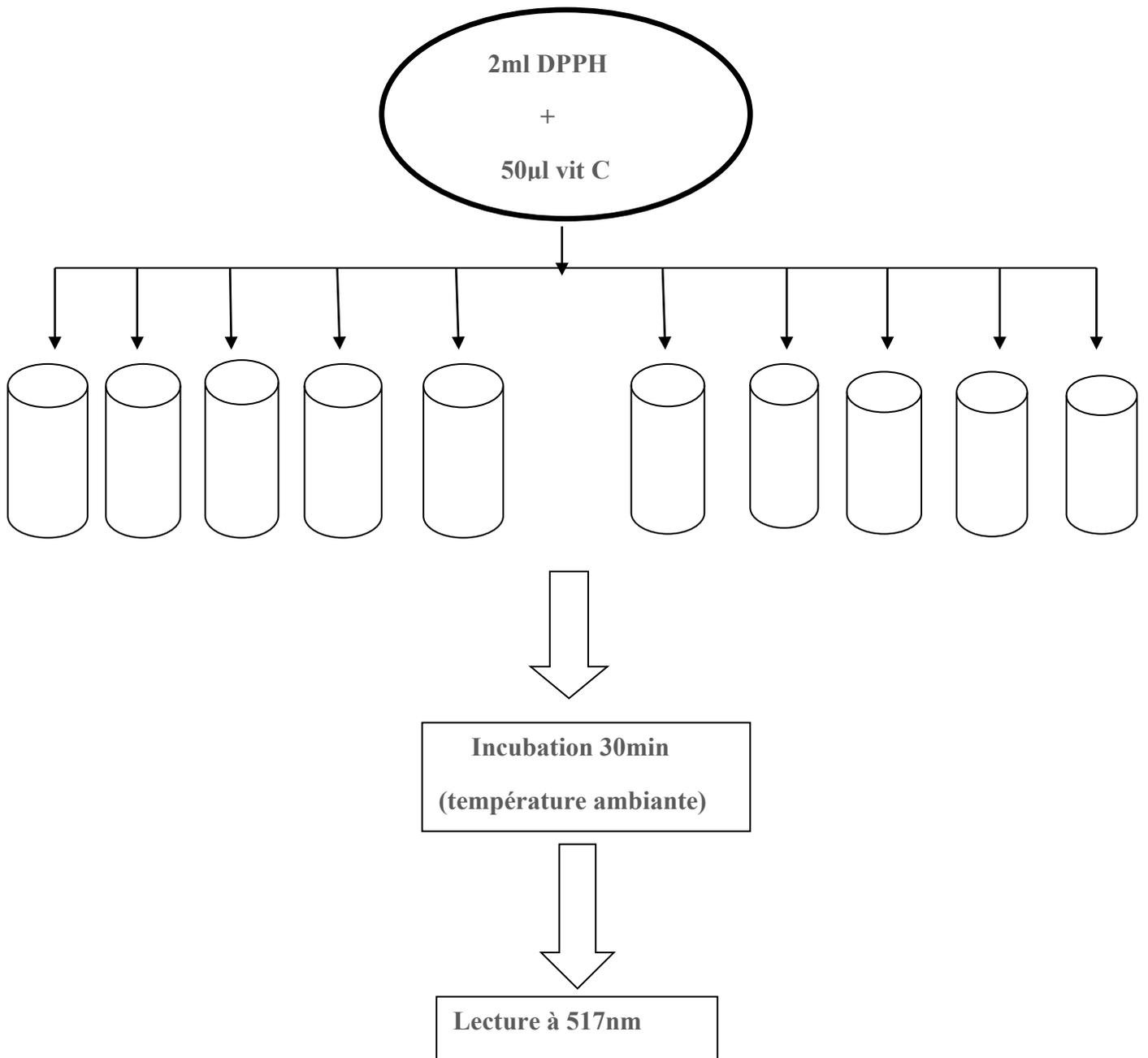


Figure 99: diagramme de l'évaluation de l'activité antioxydante de la vitamine C.

9.2 – Méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP) dans la chair des fraises

- **Principe**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Karagozler et al, 2008). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert ; 2006)

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode de karagozler et al. (2008) 1ml de l'échantillon à différentes concentration dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 200 μ l d'une solution tampon phosphate (0.2M. pH = 6,6) et du 500 μ l d'un solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1% puis incube les tube à 50°C pendant 20minutes après refroidissement, on ajoute 500 μ ld'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction. Les tubes centrifugés à 3000tours /min pendant 10min. on prélève 500 μ ldu surnageant et on ajoute 500 μ l d'eau distillée, on ajoute au mélange 100 μ ld'une solution de chlorure de ($FeCl_3$) à 1% et les absorbances sont lues contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un contrôle positif a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires à partir d'une solution étalon d'acide ascorbique, préparée à différentes concentrations.

9.2.1 – Méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP) dans les différents extraits de fraise

Le même mode opératoire concernat la détermination de l'activité antioxydante par la méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP) utilisé pour la chair de fraise est appliqué pour les quatre extraits hydro-alcooliques, hydro-cétoniques et pour l'extrait à l'acétate d'éthyle.

3^{EME} PARTIE : DOSAGE DE LA CATECHINE ET DE LA VITAMINE C PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE ET IDENTIFICATION DES MINERAUX PAR METHODE X-RAY-FLUORESCENCE (XRF) DANS LA FRAISE

1.Objectif

L'objectif de cette étude est doser la catéchine et la vitamine C dans les différents extraits de la fraise, afin de connaître la longueur d'onde maximale absorbée par ces antioxydants naturels.

2.Méthode d'analyse et préparation de solutions

2.1.Méthode d'analyse par spectrophotométrie d'absorption UV– Vis

La méthode d'analyse utilisée est la spectrophotométrie d'absorption UV– Vis utilisant le dispositif suivant : Spectrophotomètre UV – Vis-NIR SHIMADZU 3600i. Les mesures spectroscopiques sont effectuées sur tout le trajet ultraviolet et visible comme indiqué dans la figure... .



Figure 100 : Spectrophotomètre d'absorption UV-Visible

2.2. Préparation de la solution de référence

Pour effectuer la caractérisation optique de la catéchine, nous avons dissous 20 mg dans 50 ml de méthanol (C_0). Des dilutions, à la moitié, ont été réalisées au cours de l'analyse pour détecter l'évolution spectrale à différentes concentration en absorption et en émission de cet antioxydant. Une Analyse spectrale différentielle est effectuée pour éliminer l'effet d'absorption du solvant.

Les expériences sont réalisées à l'aide d'une cuve en quartz. Ainsi, quatre spectres sont acquis à des rapports différents de solvants binaires pour l'absorption UV– Visible. Les résultats et les discussions seront présentés ultérieurement.

2.3 – Méthode de séparation de l'extrait de fraise

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les antioxydants naturels particulièrement sensibles à toute dégradation éventuelle, en particulier

la lumière. De ce fait, chaque ballon d'extraction a été entièrement recouvert avec une feuille d'aluminium.

Un procédé de séparation sera exposé pour récupérer l'extrait de fraise et pour effectuer l'analyse spectrale. Une procédure d'analyse de tous les extraits de fraise sera présentée à la fin de cette partie d'étude.

La méthode d'extraction assistée aux ultrasons consiste à mélanger, dans un ballon de 200 ml, la chair des fraises (30 g) avec 100 ml de solvant mixte éthanol-eau (80/20). Ensuite le contenu est placé dans un bain thermostaté. La sonde du sonicateur est introduite dans le mélange à une fréquence stable de 25 kHz. L'opération de l'extraction a duré 10 min. Ensuite le contenu est mis sous centrifugation (500 tr/min pendant 10 min.) afin de récupérer un extrait brut prêt à être filtré.

Le procédé d'extraction pratiqué (opération du sonication + centrifugation + filtration) est répété quatre fois de reprises avant de mettre le contenu liquide sous l'opération d'évaporation des solvants organiques à l'aide d'un rotavapeur. L'extrait final est prêt pour analyse. Nous rappelons que les antioxydants naturels étant surtout sensibles à l'oxydation et à la température, et pour ces raisons nous avons mis notre extrait à l'abri de la lumière à basse température.

3. Dosage des antioxydants naturels (Catéchine et Vitamine C)

3.1. Dosage de la Catéchine

Dans cette partie, nous allons étudier la possibilité de doser rapidement la catéchine de l'extrait de fraise par spectrophotométrie dans l'UV-VIS, tout en reformulant la loi de Beer-Lambert sous une nouvelle forme où le coefficient d'extinction ne dépendait pas seulement de la nature chimique du soluté et du solvant mais aussi de la longueur d'onde d'excitation. Une solution de catéchine-méthanol est prise comme référence pour étudier la variation spectrale due aux diverses dilutions de la solution et la détermination d'une concentration limite (C_L) où la longueur d'onde d'excitation devient constante (203 nm).

3.1.1. Procédure de dosage de la catéchine de l'extrait de fraise

Pour procéder au dosage de la catéchine dans l'extrait de fraise, nous devons effectuer des mesures spectrales au niveau du pic d'absorption le plus élevé, malgré son déplacement spectral. La procédure de dosage est présentée comme suivant :

- Après application du protocole d'extraction, on procède par la suite à une filtration pour avoir un extrait liquide homogène.

- On prend 1 ml de l'extrait et on le dilue 10 fois, en ajoutant 9 ml de solvant employé dans l'extraction.
- On procède à une analyse par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Vis à double faisceau afin de déterminer la longueur d'onde du pic le plus sensible à l'absorption (λ_{\max}), ainsi que son absorbance (A).
- On vérifie si la longueur d'onde détectée est entre 222 nm et 203 nm.
- On utilise la relation empirique ci-dessous, pour calculer la concentration de l'échantillon diluée.

$$A = (0,23 + 2,22 \cdot 10^{+19} e^{-0,2164\lambda}) \cdot C$$

- On multiplie la concentration calculée par un facteur de dix pour avoir la concentration de la catéchine dans l'extrait de fraise analysé.

3.2. Dosage de la vitamine C

3.2.1. Dosage de la vitamine C dans la chair de fraise

La teneur en vitamine C de la fraise, est évaluée selon la méthode décrite par **(Toledo Benassis et Antunes, 1988)**, où le solvant d'extraction utilisé est l'acide oxalique à 1%. Une quantité de 5g de fraise est mélangée avec 25 ml de solvant, et l'ensemble est laissé sous agitation pendant 15min à l'abri de la lumière et de l'air. Par la suite, le mélange subit une filtration. L'extraction est refaite pour le retentât dans les mêmes conditions. Puis les deux filtrats sont alors additionnés et centrifugés à 16000 g pendant 20 min à 4°C. Par la suite 500 μ l de filtrat, sont ajoutés à 2.5 ml du réactif 2.6-dichlorophenol indophénol (DCPIP) qui permet d'oxyder la vitamine C en milieu acide. La solution de DCPIP, de couleur bleue, devient rose après réduction ; l'absorbance est mesurée à 515nm et la teneur en vitamine C des extraits, exprimée en mg/100g de fraise, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions avec l'acide L-ascorbique (figure 101 et voir annexe 1).

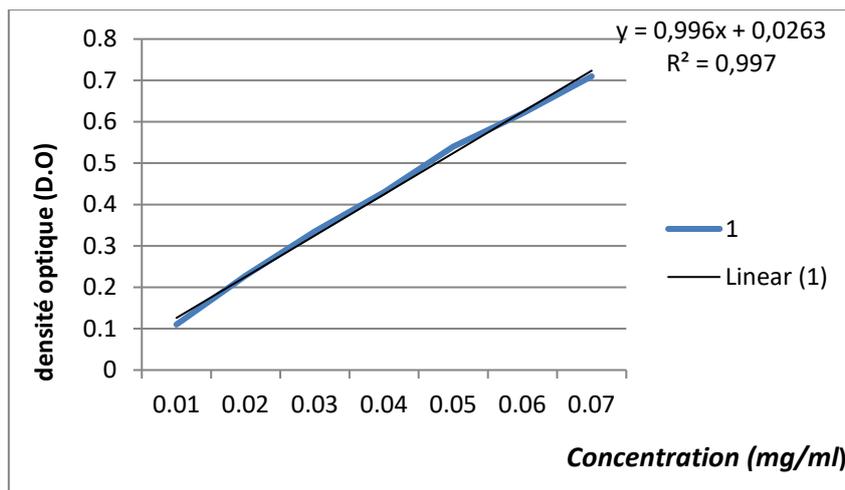


Figure 101: courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

3.2.2. Dosage de la vitamine C dans les différents extraits de fraise

Le mode opératoire appliqué dans cette partie est similaire à celui utilisé pour le dosage de la vitamine C dans la chair de fraise.

4. Dosage des minéraux contenus dans la fraise

Cette étude a été entreprise au laboratoire de Chimie Physique des Macromoléculaires et Interfaces Biologiques (LCPMIB) de la faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV) dans le but de l'identification de certains métaux contenus dans la fraise, un fruit très consommé par la population algérienne mais qui a une capacité d'accumulation des métaux lourds qui pourrait nuire à la santé humaine. Les éléments visés par notre étude concerne les métaux alcalains, alcalinoterreux et métaux lourds : Pb, Zn, Fe, As, Cd, Cr, Ni, Cu et Mn, Mg, K, Par ailleurs, toutes les analyses que nous avons entreprises, ont été réalisées après une phase de calibrage de l'appareillage.

4.1. Les produits chimiques utilisés

Les produits chimiques que nous avons utilisés pour la réalisation de cette étude étaient disponibles au laboratoire LCPMIB de la faculté SNV siège des mesures de XRF. Nous avons utilisé les produits suivants :

KCl, KBr et des composés utiles comme l'Acide borique (H_3BO_3) et le Glucose. D'autres produits comme les solvants, tels que l'eau distillée et déminéralisée, l'éthanol ont été utilisés pour le nettoyage des outils de manipulation.

4.2. Préparation de la pastille

La préparation de pastille nécessite un additif liant (sel de KBr ou de KCl, la cire et la cellulose microcristallineetc.), finement broyé et déshydraté, dans lequel on mélange

environ 1% de l'échantillon à analyser (finement broyé également) Cette opération s'effectue, à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'obtenir des particules de dimensions réduites.

L'acide acétylsalicylique sert de lubrifiant comme l'acide borique qui assure la tenue mécanique de la pastille. Dans notre travail nous avons utilisée le KCl, la cellulose, l'acide borique tous sous forme solide.

Ensuite, à l'aide d'un moule à pastille et d'une presse, la poudre est soumise à une pression d'environ 25 tonnes pendant quelques secondes. Sous l'effet de la pression, on obtient une pastille homogène et translucide de 13 mm de diamètre et de 2 à 3 mm d'épaisseur environ que l'on pourra analyser directement.

Une prise d'essai de 100 g de fraise est incinérée dans un four à moufle à 500° C pendant 5h. A la fin de l'expérience on a obtenu 1.2g de cendres. On mélange environ 0.6 g de cendres avec 5g de bromure de potassium (KBr) comme liant, jusqu'à obtenir une poudre fine et très homogène ; puis on prépare la pastille en utilisant une presse en comprimant la poudre à 90 kN (9 tonnes) pendant 5mn (figure...).



Figure 102: Schéma du dispositif de compression

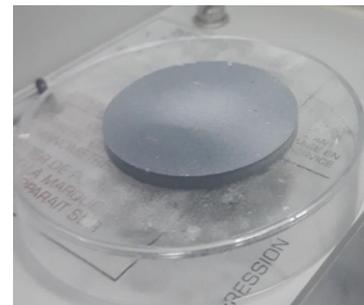


Figure 103: pastille obtenue après compression

Pour l'analyse, la pastille compacte obtenue est placée dans un passeur du spectromètre X-Ray-Fluorescence (XRF) de marque (Rigaku). On ouvre la fenêtre de mesures analyse dans le logiciel QuantEZ, programme d'analyse de l'échantillon par le logiciel NEX QC+ QuantEZ.

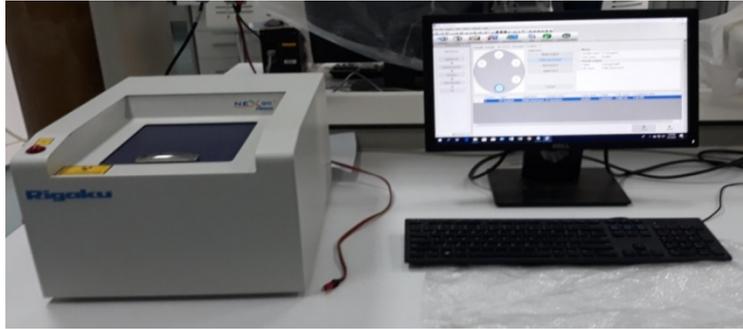


Figure 104 : Schéma du spectrophotomètre X-Ray-Fluorescence.

L'appareil XRF nécessite un calibrage. Ceci peut se faire par Calibration **MCA**. Le calibrage MCA est une fonction permettant d'ajuster correctement les canaux de données spectrales et l'énergie des rayons X fluorescents. Il utilise un échantillon d'étalonnage spéciale MCA que le constructeur Rigaku fournit pour chaque instrument. Si ce calibrage n'est pas effectué pendant une longue période, les positions des pics des rayons X fluorescents se déplaceront à cotés des bonnes positions sur un diagramme de spectre et les valeurs d'identification et d'analyse qui en résulteront seront erronées. La procédure est simple et se fait en plaçant l'échantillon d'étalonnage MCA (qui se présente sous forme d'une pastille jaune qu'on appelle perle) dans le passeur d'échantillons comme illustré sur la figure suivante :



Figure 105 : Perle jaune (échantillon d'étalonnage spécial MCA)

**4^{EME} PARTIE : INDENTIFICATION DES ANTIOXYDANTS
NATURELS DE LA FRAISE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR
COUCHE MINCE (C.C.M) ET PAR HPLC/MS**

1 – Essai d'indentification des antioxydants naturels dans les extraits de fraise par chromatographie sur couche mince C.C.M

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative. Dans le présent travail, nous avons opté pour la chromatographie sur couche mince (CCM), qui est rapide et simple. Cette technique, repose sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui migre le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque d'aluminium rigide. L'éluant migre à travers la phase stationnaire essentiellement par capillarité. Chaque composant migre à sa propre vitesse qui dépend de sa nature et de celle du solvant (Hennebelle, 2006).

Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées avec des plaques de Silica gel 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck& Co., Inc., White house Station, Germany) et celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles, dont l'atmosphère aura préalablement été saturée en vapeurs de la phase mobile. Les quantités déposées sur les plaques sont normalement de 100 µg pour les extraits et de 10 µg pour les produits purs. Après développement, les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 366 nm, et la révélation de ces plaques a été faite en utilisant les réactifs suivants :

- Solution ethanolique de phosphomolybdène à 1% : 1 g d'acide phosphomolybdique dans 100 ml EtOH.
- Solution ethanolique de vanilline à 1% : 1g de vanilline dans 100 ml EtOH.

La phase mobile ou l'éluant est un système de solvant (mélange de solvant organique). Nous avons utilisé six systèmes de solvants (S1, S2, S3, S4, S5, S6) de différentes polarités Les cuves contenant ainsi la phase mobile sont fermées pour la saturation de la cuve par les vapeurs des solvants (Tableau : 22).

Après développement dans des cuves en verre (*Camag*), l'observation des plaques a été effectuée en lumière visible ou sous UV (254 et 366 nm)

Tableau 22 : les différents systèmes d'élution utilisés pour la CCM

Systèmes	Solvants	Proportion (ml)
Systeme1	MeOH/Acétate d'éthyle/CHCl ₃ /Eau	(35/35/30/0.1)
Systeme2	CHCl ₃ / MeOH/ Acétate d'éthyle/ Eau	(20/50/30/0.2)
Système 3	CHCl ₃ / MeOH/ Acétate d'éthyle/ Eau	(30 /50/20/0.2)
Systeme 4	Acétated'éthyle/CHCl ₃ /Méthanol	(80/23.5/20)
Systeme 5	Acétate d'éthyle/ CHCl ₃ /Acide formique	(40/50/10)
Systeme 6	Acétate d'éthyle/ CHCl ₃ /MeOH/Acide formique	(20/70/10/0.1)

2 – Essai d'indentification des antioxydants naturels dans les extraits de fraise par HPLC-MS

Une des techniques les plus utilisées pour l'analyse des composés chimiques est le couplage en ligne d'une séparation par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) avec une détection par spectrométrie de masse (LC-MS). Cette technique est en train de se généraliser dans de nombreux laboratoires car elle permet de répondre aux impératifs environnementaux, industriels et réglementaires, notamment en termes de performances analytiques.

La spectrométrie de masse est une technique analytique qualitative de choix pour les composés organiques. Elle permet de recueillir des informations en vue d'élucider la structure des espèces présentes même en faible quantité dans un échantillon. Nous disposons d'un spectromètre de masse TQ 8050 couplé à un chromatographe en phase liquide (HPLC/MS) fonctionnant en routine, depuis 2017. Les analyses sont réalisées par Impact Electronique (EI). La durée moyenne d'une analyse est de trente minutes. Cet appareil peut également analyser des composés non volatiles par introduction directe au niveau de la source, sans passage par le chromatographe.

2.1 – Echantillonnage analysé par LC-MS

Deux extraits différents selon la méthode d'extraction appliquée ont été filtrés et analysés sur un système LC-MS de la série Shimadzu TQ 8050 (Chromatographe liquide couplé au spectromètre de masse LC/MS), équipé d'un échantillonneur automatique, un

détecteur optique à balayage ((UV–Visible avec scan de longueurs d’ondes) (figure :106).



Fig 106 : Chromatographe liquide couplé au spectromètre de masse (LC/MS)

Les extraits ont été séparés sur une colonne (Discovery® C18 (5 µm) de dimensions L. 25 cm × D. 4.6 mm,) remplie de 25 cm avec des phases mobiles composées d’eau ultra-pure et d’acétonitrile (2/98 v/v). La colonne a été autorisée à équilibrer 6 min entre les injections. Le débit de solvant était 0,25 ml / min et la température de la colonne était de 40 °C.

**5^{ème} PARTIE : ETUDE DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE
ET DE L'EMBALLAGE SUR LES TENEURS EN
ANTIOXYDANTS NATURELS DE LA FRAISE
(POLYPHENOLS TOTAUENX, FLAVONOIDES, TANNINS,
ANTHOCYANES ET EN VIT C).**

1-Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude concernant l'effet de la température et de l'emballage sur les antioxydants naturels de nos échantillons de fraise est d'étudier :

- L'effet de la température sur les fraises au cours du stockage.
- L'influence de l'emballage sur la conservation de la fraise.
- La variation des teneurs des antioxydants naturels (polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins, anthocyanes et vit C) contenus dans la fraise au cours du stockage.

2 – Lieu et période d'étude :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions de la faculté des sciences et technologie de l'université de Mascara. Nos expériences ont été menées durant une période d'étude qui s'étend sur quatre mois

3 – Matériel et méthodes :

3.1-Conditions expérimentales :

Nous décrivons dans cette partie le matériel et les méthodes utilisées lors de la réalisation des protocoles expérimentaux. Dans cette partie nous essayons de décrire les conditions dans lesquelles nos expériences ont eu lieu et nous présentons les différentes méthodes d'analyses spectrophotométriques utilisées lors de la réalisation de nos expériences.

3.2-Matière végétale :

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé des fraises de la variété *Fragaria Vesca* de la famille des *Rosaceae*. Cette variété est très répandue en nord de l'Algérie.

Une fois les fraises achetées du marché de la ville de Mascara, elles étaient transportées le même jour au laboratoire. Avant d'être utilisés pour les bio-essais, les fraises ont été

immédiatement triés ; seulement celles à formes régulières aucun signe de Botrytis ont été choisies pour nos expériences par contre celles trop petites, défectueuses, trop mures ont été éliminées.

3.3- Le stockage :

Les fraises une fois choisies, elles ont été divisées dans des paniers en plastique ouverts et troués. Elles ont ensuite été stockées à -20°C, +5°C et à la température ambiante et chaque fois avec ou sans emballage. Ce traitement a été réalisé de façon à ce que nous avons obtenu toutes les modalités suivantes (voir annexe 2)

- FTA (fraise à température ambiante)
- FTAE (fraise à température ambiante avec emballage)
- FR5 (fraise stockée à +5°C au réfrigérateur)
- FR5E (fraise stockée à +5°C avec emballage au réfrigérateur)
- FC20 (fraise stockée à -20°C au congélateur)
- FC20E (fraise stockée à -20°C avec emballage au congélateur)

3.4- L'emballage

Les paniers ont été couverts d'un film en cylophane au cours du stockage aux différentes températures déjà citées : Température ambiante, réfrigération (+4°C) et congélation (-20°C).

3.5-Produits chimiques utilisés

Méthanol (CH₃OH 80%), Peroxide d'Hydrogène (H₂O₂ solution à 30%), l'Acide Ascorbique, Carbonate de Sodium Anhydride Na₂CO₃, Acide Chlorhydrique (HCl), Folin Ciocalteu (2N), Ethanol (EtOH 75%), Acide Formique (HCOOH) et l'Acide Acétique (CH₃COOH).

3.6-Analyses quantitatives

3.6.1-Dosages Dosage des antioxydants naturels de la fraise :

Nous avons effectué le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, des tannins , des anthocyanes et de la Vitamine C à des intervalles qui dépendaient des conditions de stockage. Lorsque les fraises étaient stockées à des températures positives, le dosage était fait presque chaque jour pour une semaine (8 jours). A froid négatif, le dosage était étalé sur environ 4 mois. Les fraises qui avaient perdues leur aspect attractif et commercial n'ont pas été analysées. Pour chacun des dosages que nous avons effectués, nous avons prélevé un échantillon de (45 à 50g) de fraises provenant de chaque modalité. Puis nous avons broyé et homogénéisé cet échantillon à l'aide d'un broyeur homogénéiseur. Il est à noter que les fraises

congelées ont été décongelées avant le broyage et avant l'extraction des antioxydants, de plus toutes les fraises ont été lavées avec de l'eau distillée avant chaque test.

3.6.1.1-Analyse des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué suivant la méthode décrite par **Häkkinen et al (1998 ; 1999a, b)**

Le dosage des polyphénols a été effectué avec le réactif Folin Ciocalteu à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux de type SHIMADZU UV-2401PC, la technique à double faisceau à l'avantage de donner directement l'absorbance de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats sont fiables, le dosage de chaque composé phénolique a été réalisé en deux essais, après on a calculé la moyenne des absorbances mesurées.

3.6.1.1.1-Extraction des polyphénols

Un volume de **25 mL** de méthanol est ajouté à **0,5 g** de purée de fraise dans un flacon (**100 mL**). L'acide ascorbique (**80 mg**) a été dissout dans **15 mL** d'eau distillée et ajouté au flacon. Ensuite de l'acide chlorhydrique (**10 mL ; 6 M**) a été ajouté au mélange. Les flacons étaient bien agités et mis à l'obscurité (**35° C**). Après **16 h**, l'extrait était filtré sur du papier filtre et prêt pour le dosage (figure 106).

Extraction des polyphénols totaux (Häkkinen et Auriola, 1998)

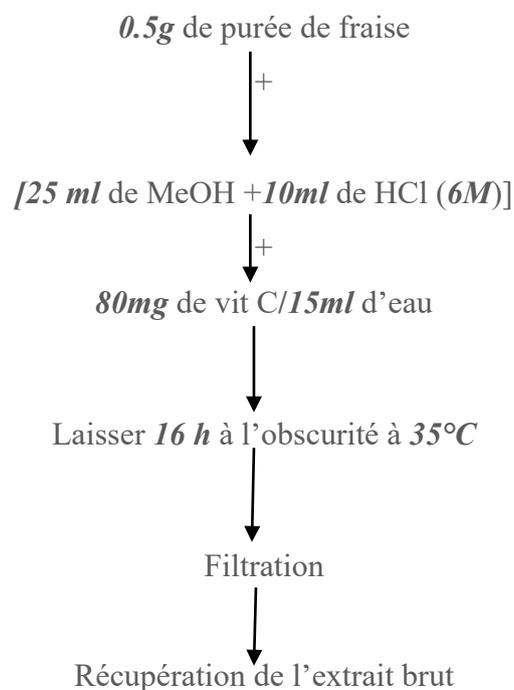


Figure 106 : Organigramme de l'extraction des polyphénols totaux dans la fraise

3.6.1.1.2-Dosage des polyphénols par Folin Ciocalteu

- **Principe :**

En présence de phénols, le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) est réduit en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) que l'on détermine par colorimétrie.

- **Protocole :**

Pour le dosage des polyphénols totaux, la méthode consiste à prendre un volume de **0,1 mL** de l'extrait la veille et laissé **16 h** à l'obscurité (**à 35° C**).l'extrait a été filtré et prélevé dans une fiole jaugée de **10 mL**. L'extrait était dilué avec **0,1 mL** d'eau distillée. Un volume de **0,5mL** du réactif Folin-Ciocalteu était ajouté. Après **3 min**, un volume de **4mL** de Na_2CO_3 (**1M**) a été versé sur la solution et de l'eau distillée était ajoutée jusqu'au trait de jauge. Pour la mesure au spectrophotomètre, un blanc est préparé avec **0,5 mL** du réactif Folin- Ciocalteu et de **4 mL** de Na_2CO_3 (**1M**). Les tubes étaient placés à l'obscurité. Après les **15min** à **45° C** ou les **90 min** à la température ambiante, les résultats étaient lus sur spectrophotomètre à **765 nm** (figure 107).

Dosage des polyphénols totaux (Folin-Ciocalteu)

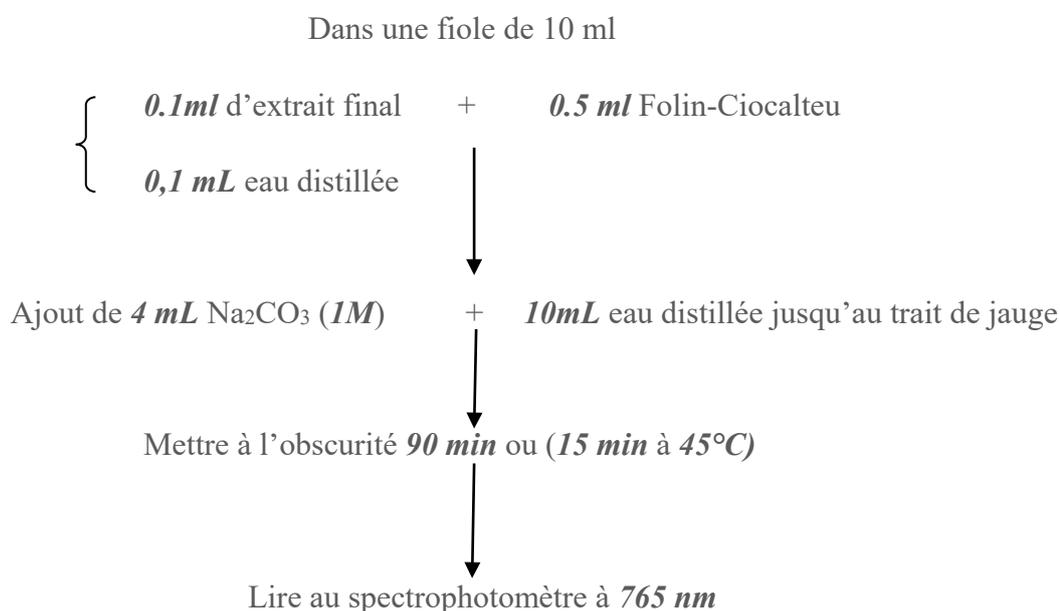


Figure107 : Organigramme du dosage des polyphénols totaux dans la fraise

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (0.05, 0.1. 0.2,.....1mg/ml) (**Huang, 2007**) (figure 108).

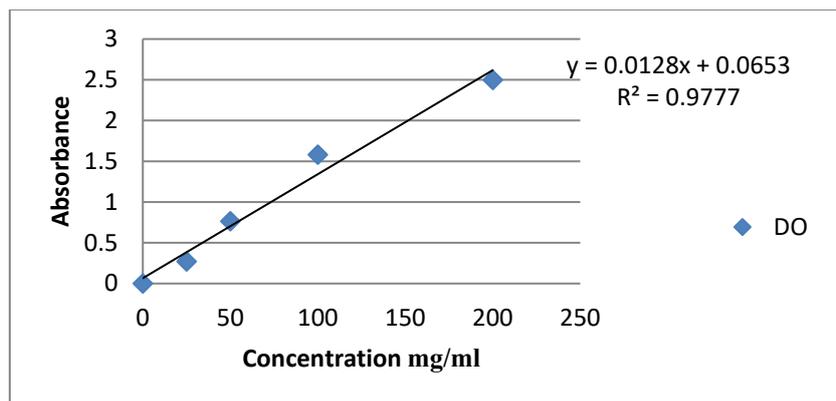


Figure 108 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

3.6.1.1.3 Extraction et dosage des flavonoïdes

3.6.1.1.3.1 Extraction des flavonoïdes (Bruneton. J, 1999)

Un volume de 20ml de solution (MeOH / eau) (V/V) (70 :30) ml est ajouté à 1g de purée de fraise dans un Erlen (100ml). Ensuite, on a chauffé notre préparation au bain marie à 70° C pendant 5 minutes et puis après 24h l'extrait était filtré sur du papier filtre et passe, au rota vapeur pour évaporer le solvant ; en fin on a récupéré l'extrait sec contenant les flavonoïdes (figure 109).

Extraction des flavonoïdes (Bruneton. J, 1999)

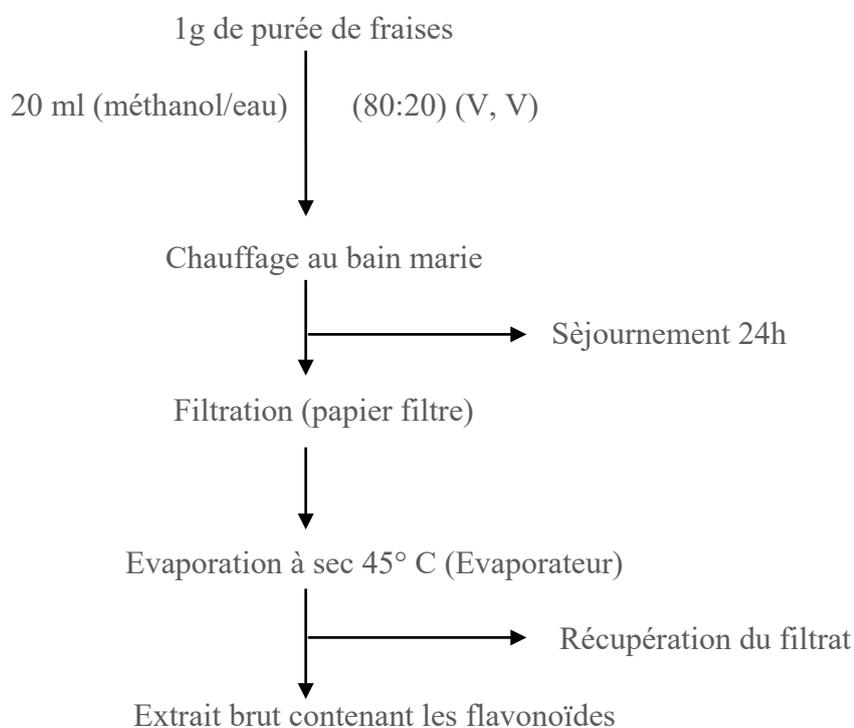


Figure 109 : Protocole d'extraction des flavonoïdes dans la fraise

3.6.1.1.3.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué suivant la méthode décrite par **Lamaison et carnet (1990)**, et puis adaptée par **Haung et al (2004)**. La méthode consiste à prendre un volume de 1 ml de l'extrait et on ajoute 1 ml de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2%. Ensuite, après une agitation rapide pendant une minute à 1700 tr on laisse notre préparation à l'incubation durant 15 min à température ambiante, les résultats sont lus sur spectrophotomètre à 367nm (**figure 110**).

Dosage des flavonoïdes : (méthode décrite par **Lamaison et carnat (1990)** ; **Hung (2004)**)

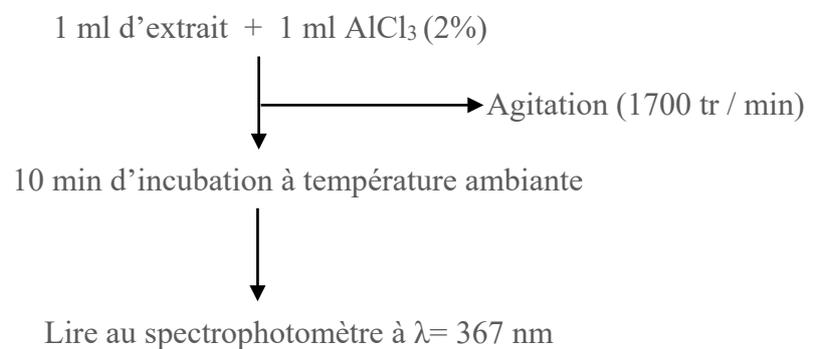


Figure 110 : Protocole du dosage des flavonoïdes dans la fraise

Les différentes concentrations des flavonoïdes ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une série de solutions étalons de quercétine ayant des concentrations allant de 0.01 à 0.06 mg/ml (figure 111).

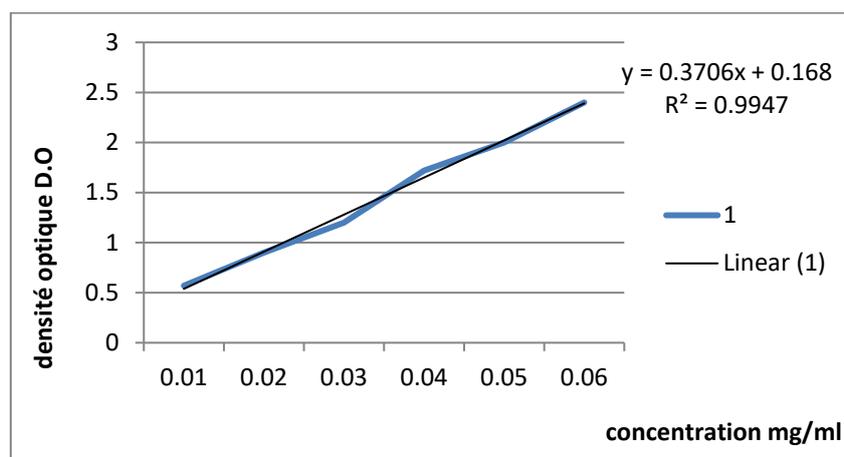


Figure 111 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

3.6.1.1.4 *Extraction* et dosage des tannins :

3.6.1.1.4.1 *Extraction des tanins (Bate et Smith, 1978)*

Un volume de 100 ml d'un mélange a été préparé avec 99 ml de méthanol et 1 ml d'HCl concentré, ce volume a été ajouté à une masse de 5 g de fraises et puis le laisser pendant 24 h (Macération) et après la filtration on récupère l'extrait brut par évaporation du solvant au rotavapeur (figure 112).

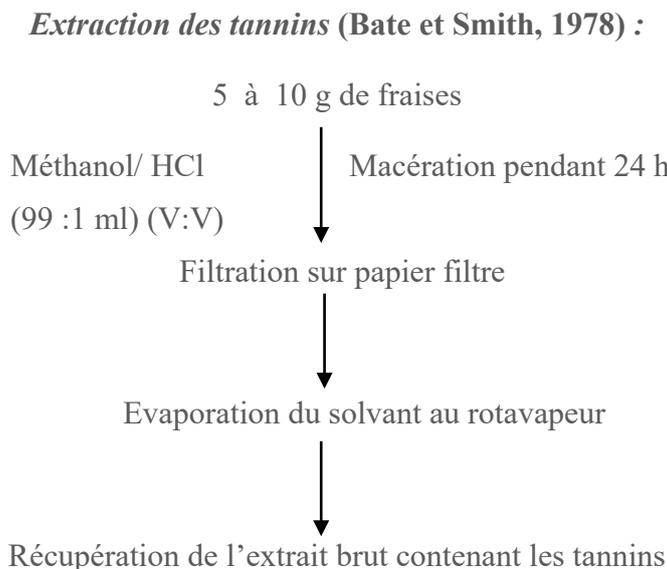


Figure 112: Organigramme du protocole d'extraction des tannins

3.6.1.1.4.2 *Dosage des tannins*

3.6.1.1.4.2.1 *Dosage des tannins hydrolysables (Bate et Smith, 1978)*

La méthode rappelée dans cette partie afin d'effectuer le dosage des tanins hydrolysables a été décrite par **Bate et Smith, (1978)** et consiste à prendre 1 ml de filtrat et lui ajouter 3.5 ml d'une solution préparée à base de FeCl_3 10^{-2} M dans l'acide chlorhydrique (HCl) 10^{-3} M et après 15 s de l'ajout de ce réactif on procède à la lecture des résultats au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 660\text{nm}$ (figure : 113)

Dosage des tannins hydrolysables : méthode décrite par Bate et Smith, (1978)

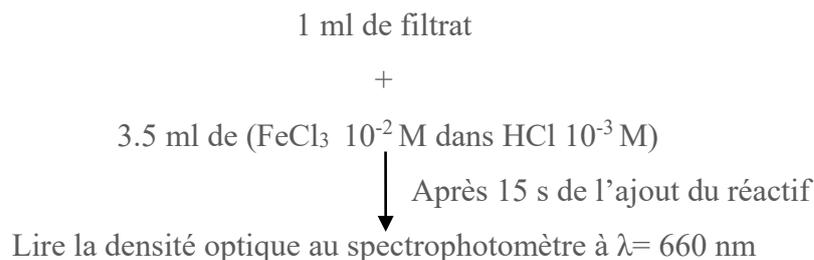


Figure 113: Organigramme du protocole de dosage des tanins hydrolysables.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) de tannins par millilitre (ml) en se référant à une courbe d'étalonnage que nous avons dressé à partir d'une gamme étalon d'acide tannique dans les mêmes conditions de concentrations allant de 0.1 à 1 g/ml(**figure114**).

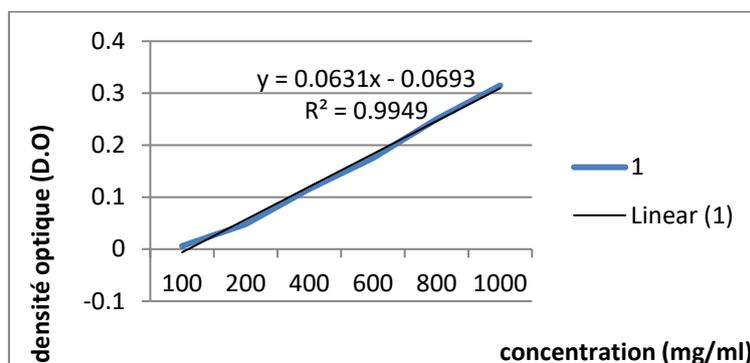


Figure 114 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins hydrolysables

3.6.1.1.4.2.2 Dosage des tannins condensés (Price et al, 1977):

La méthode par la quelle on va réaliser le dosage des tannins condensés est décrite par **Price et al, (1977)** et se distingue par l'ajout d'un volume de 1 ml de l'extrait de fraise à 2 ml d'une solution préparée à base de vanilline (1%) dans l'acide sulfurique H₂SO₄ (70%). L'ensemble du mélange est chauffé au bain marie durant 15min à 20° C à l'abri de la lumière, et les résultats sont lus au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 500\text{nm}$ (**figure 115**).

Dosage des tannins condensés : méthode décrite par Price et al, (1977):

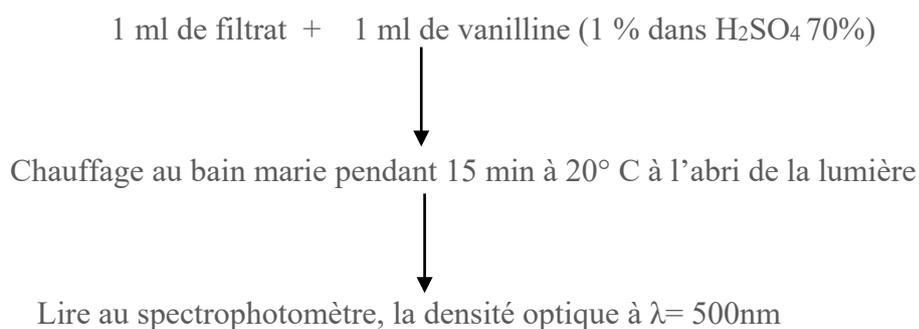


Figure 115: Organigramme du protocole de dosage des tannins condensés.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) de tannins par millilitre (ml) en se référant à une courbe d'étalonnage que nous avons dressé à partir d'une gamme étalon d'acide tannique dans les mêmes conditions de concentrations allant de 0.1 à 0.8 g/ml (figure 116).

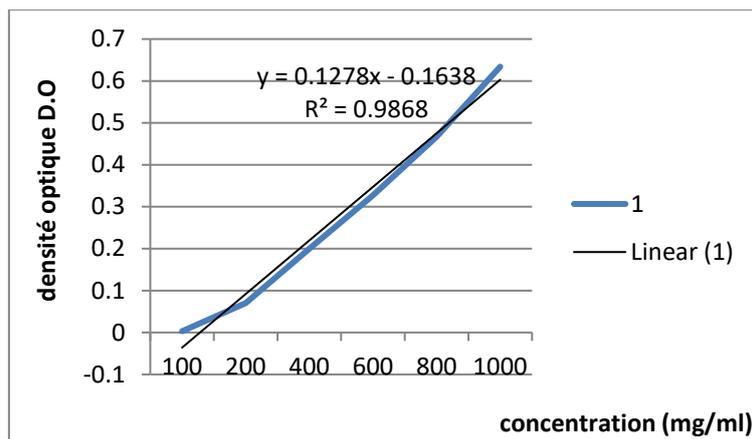


Figure 116 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins condensés

3.6.1.4-Dosage des anthocyanes :

Le dosage des anthocyanes a été effectué suivant la méthode adoptée par **Swain et Hillis, (1959)**.

3.6.1.4.1-Extraction des anthocyanes :

Dix millilitres d'éthanol (80 %) ont été ajoutés à un gramme de purée de fraise et le tout a été bien agité. Ensuite l'extrait a été centrifugé pour **15 min à 1700tr** (figure 117).

- **Protocole :**

Trois millilitres (**3ml**) d'acide chlorhydrique (HCl) dans du méthanol aqueux (HCl **0,5 N** ; CH₃OH **80-85 % v/v**) sont placés dans chacun des deux tubes. La solution dans le premier tube est diluée avec **1 mL** de l'acide chlorhydrique méthanolique (**3 N ; 1:5 v/v**), et **1 mL** de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est ajouté au second tube (blanc). Les tubes sont alors laissés **15 min** à l'obscurité et l'absorbance de la solution dans le second tube mesurée à **525 nm** considérant le premier tube blanc (figure 117).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'anthocyanes par millilitre (ml) en se référant à la courbe d'étalonnage ci-dessous (figure 118) (**Kalt w.,1999**) et (**Lopes-da-silva f.,2002**).

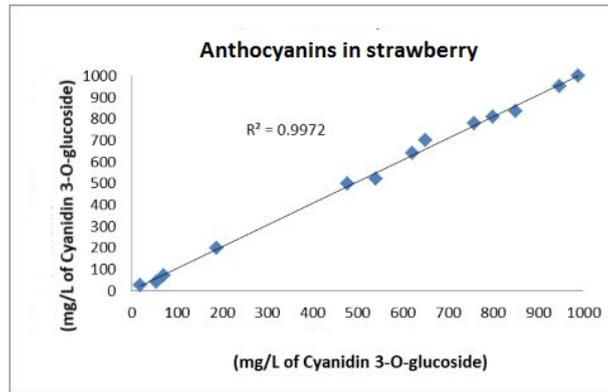


Figure 117 : Courbe d'étalonnage de la cyanidine 3-O-glucoside pour le dosage des anthocyanes totaux

La courbe de corrélation confirme une excellente linéarité. Les quantités d'anthocyanes obtenues sont calculées grâce à la courbe étalon, et à partir des absorbances de chaque extrait étudié à une concentration fixe.

Extraction des anthocyanes (Swain et al, 1958)

1g de purée de fraise + 10mL EtOH (80 %)



Centrifuger (1700 tours) – 15 min

Préparation des solutions

- A: HCl 0,5 N
- B: HCl 3N
- C: A + MeOH (80 % v/v)
- D : MeOH + B (5 mL – 1 mL de B)
- E : 1 mL H2O2

Dosage des anthocyanes

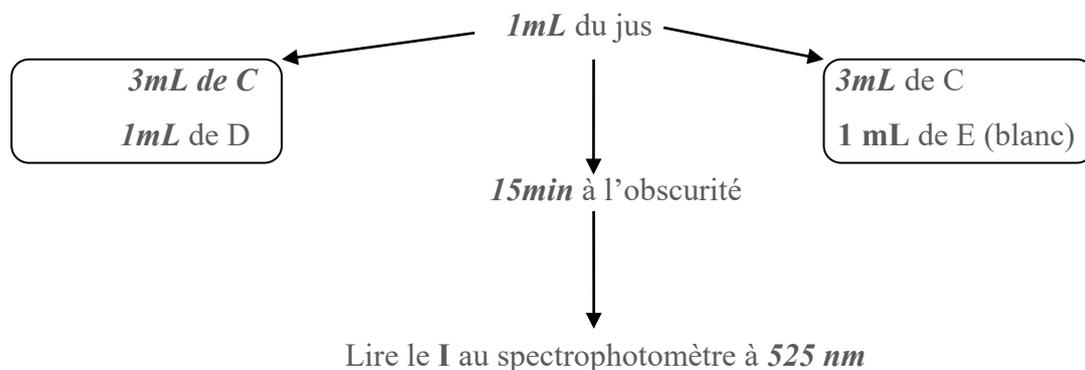
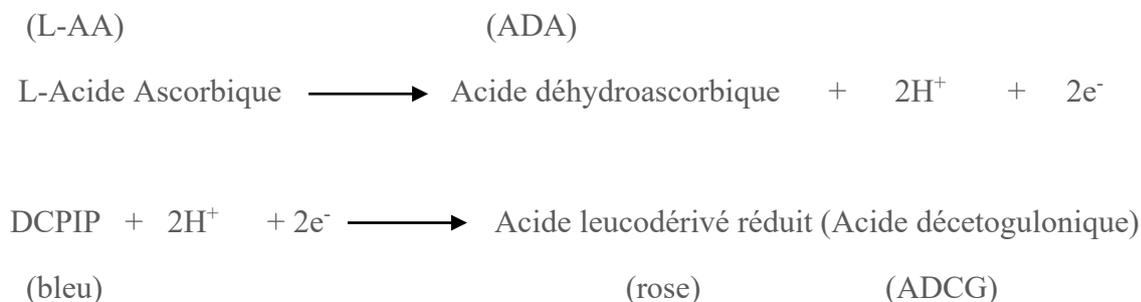


Figure117 : Organigramme de l'extraction et du dosage des anthocyanes dans

3.6.1.5 Dosage de la vitamine C :

Principe du dosage de la vitamine C :

Le L-AA est oxydé (réaction réversible) en Acide déhydroascorbique puis en Acide dicétogulonique (ADCG) (réaction réversible) selon le bilan des réactions suivantes :



Réaction bilan :



Le composé colorant DCPIP réagit seulement avec le L-AA pour former un composé incolore. Dans ce cas, le L-AA peut être dosé dans un extrait d'échantillon à l'aide d'une solution de DCPIP. La fin de la réaction est évaluée par l'apparition d'une coloration rose-violet due à l'excès de colorant (DCPIP) (**Katsaboxakies et Papanicolaou, 1996**).

La vitamine C étant très oxydable, nous avons donc utilisé durant la réalisation de nos expériences un stabilisant, l'acide métaphosphorique (HPO_3) qui ralentit son oxydation à l'air.

Le dosage de l'AA est réalisé à partir de jus de fraises (Extrait broyé). Une fois homogénéisé, deux grammes de purée de fraise ont été prélevés de chaque échantillon et ensuite 5 ml de l'acide métaphosphorique (HPO_3 3%) ont été ajoutés. Le tout a été mélangé puis centrifugé pendant 15 min à 1700tr.

3.6.1.5.1 Dosage colorimétrique de la vitamine C par DCPIP :

Un volume de 1 ml du surnageant a été ajouté au 5 ml de HPO_3 (3%) et à 15 ml d'eau distillée (bouillie et refroidie à l'abri de l'air). le mélange est dosé par le 2,6-DCPIP placé dans la burette jusqu'au virage de la couleur : rose –violet persistant (**Figure 119**).

3.6.1.5.2 Etalonnage de la solution de 2,6-DCPIP par préparation d'une solution de vitamine C :

On a préparé une solution de vitamine C en pesant environ 0,120g d'acide ascorbique, la recouvrir immédiatement d'une solution d'acide métaphosphorique (HPO_3) à 3% , puis la

transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml et ajuster avec de l'acide métaphosphorique (HPO_3) à 3%.

On prépare 50 ml d'une dilution au 1/5 de la solution étalon. Soit F cette solution (solution fille).

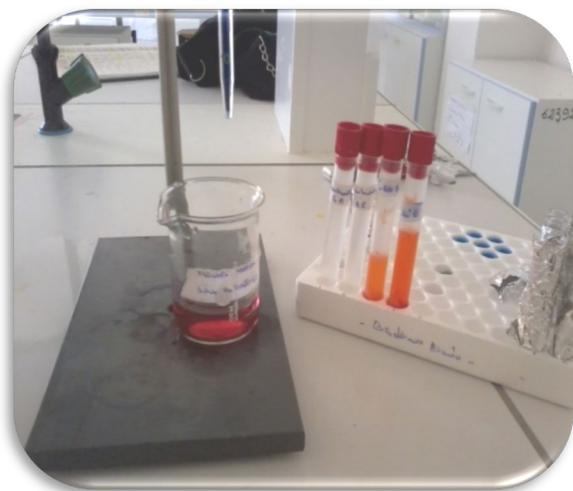
Dans un Erlen, on introduit :

- 5 ml de solution F
- 15 ml d'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air.
- On verse la solution de 2,6-DCPIP dans la burette et on dose jusqu'au virage rose persistant au moins 30 s

A la fin du dosage, nous avons obtenu un volume de DCPIP à l'équivalence égale à 8.4ml.



Avant l'équivalence



A l'équivalence

Figure 119 : Changement de la couleur lors du dosage de la vitamine C par DCPIP

La concentration molaire du DCPIP a été déterminée en utilisant la formule suivante:

$$[\text{DCPIP}] = \frac{(m_{\text{vitC}} \times V_{\text{sol F}} \times \text{dilution})}{(M(\text{VitC}) \times V_{\text{fiole sol.F}} \times V_{\text{DCPIP}})}$$

Les différentes concentrations de la vitamine C dans nos échantillons de Fraises ont été déterminées en utilisant la formule ci-dessous:

$$[\text{VitC}] = [\text{DCPIP}] \times V_{\text{DCPIP versé}} \times M(\text{vitC}) / V_{\text{jus de fraise}}$$

3.6.1.5.3 Dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique par DCPIP:

Un volume de 0.5 ml de l'extrait de fraise à été recouvert par 2 ml de solution tampon (pH=4). La solution A : Acide citrique 0.1M et solution B: phosphate disodique 0.2 M), et 5 ml de HPO₃ (3%) plus 1 ml de 2,6-DCPIP et en fin la solution à tester et passer dans les cuvettes afin de lire la densité optique D.O à une longueur d'onde. ($\lambda = 520 \text{ nm}$) (**figure 121**).

La lecture de la densité optique à 520 nm permet de déterminer la concentration de la vitamine C en se référant à une courbe étalon dressée à partir d'une série de solutions étalons d'acide ascorbique de concentrations allant de 0.01 à 0.07 mg/ml (figure 120).

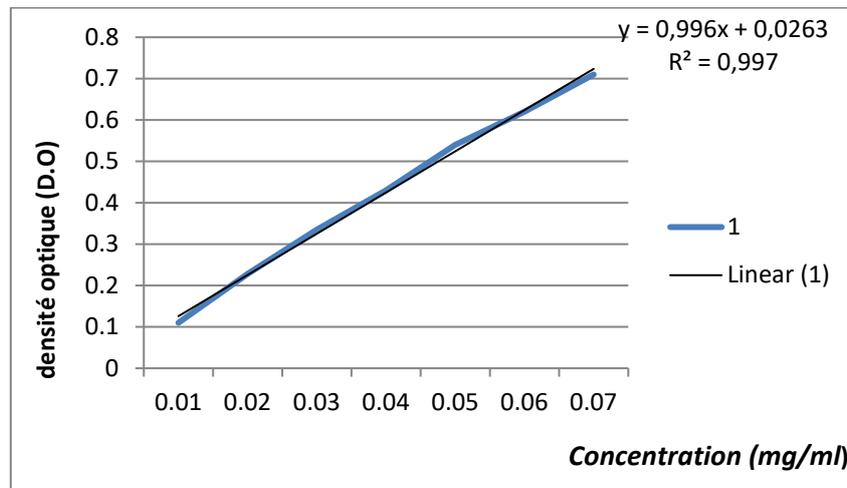


Figure 120: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

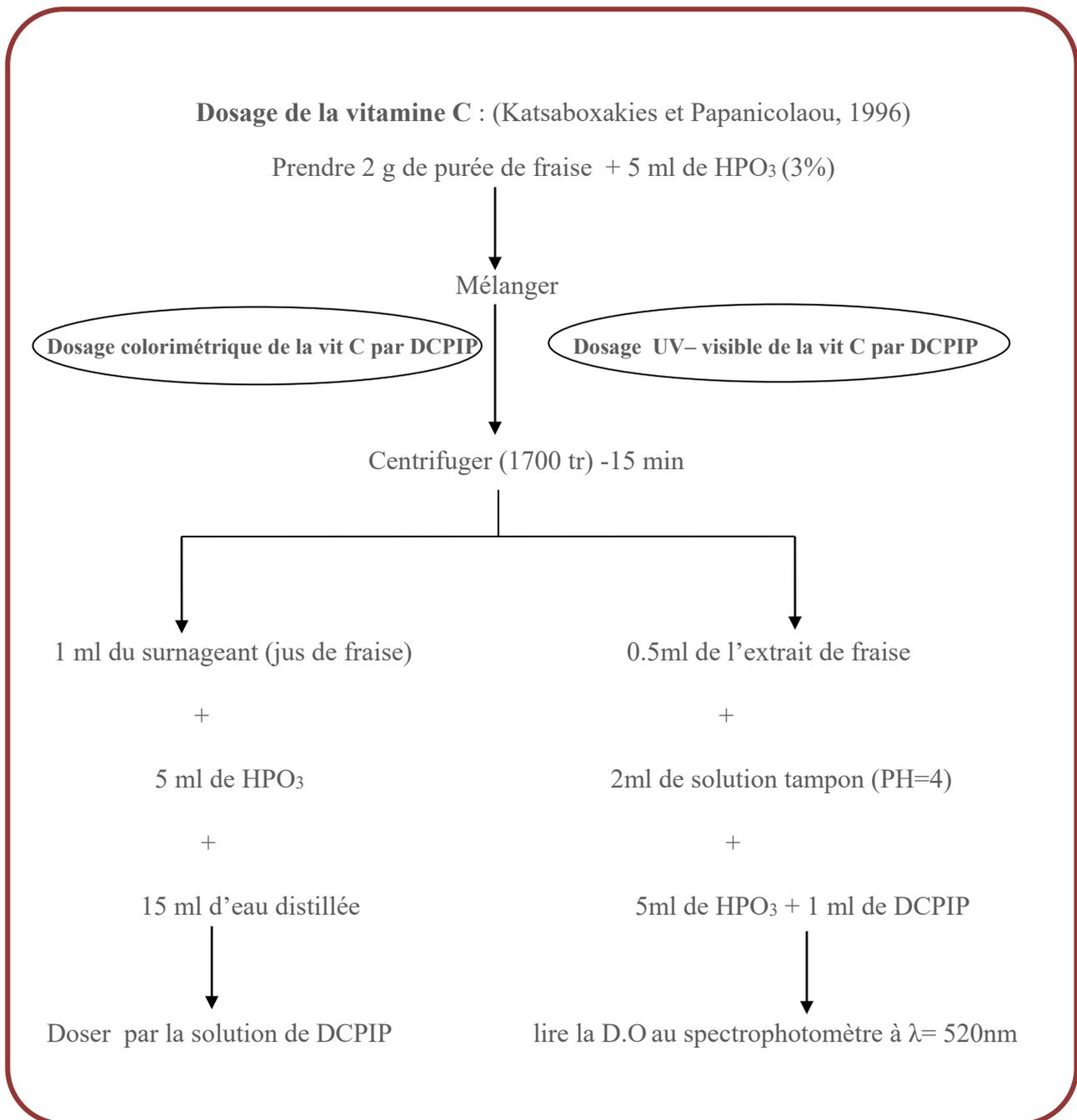


Figure 121 : Organigramme du dosage de la vitamine C dans la fraise

Dans la suite de notre travail nous avons fait une analyse détaillée sur l'effet de la température et de l'emballage au cours du stockage sur le taux des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des anthocyanes et de la vit C en fonction du mode de conservation (avec ou sans emballage) en fonction du temps à températures positives (T.A et +5°C) et négatives (-20°C). Par la suite nous allons vous faire part des différents résultats que nous avons obtenus suivi de leurs discussions. Ceci sera détaillé dans la suite de notre étude dans la partie suivante résultats et discussions.

Résultats

&

discussions

1^{ERE} PARTIE : SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICOCHEMICOLOGIQUES DE LA FRAISE

1. Analyse phytochimique

1.1. Résultats du screening phytochimique

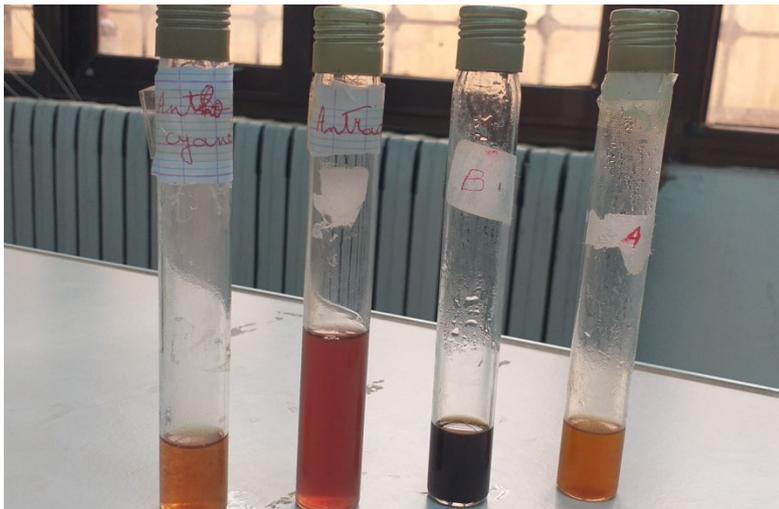
L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des fraises a permis de mettre en évidence la présence de quelques familles chimiques représentées dans le tableau 23

Tableau 23 : Les résultats de screening phytochimique.

Les composés	Réactifs utilisés	Résultats (*)
Flavonoïdes	HCl/Mg	+++
Tanins	FeCl ₃	+
Saponines	Determination de l'indice de mousse (IM)	+
Terpénoïdes	CHCl ₃ /H ₂ SO ₄	+++
Composés réducteurs	Liquier de Fehling	+
Oses et holosides	EtOH	-
Huiles essentielles	CH ₂ Cl ₂ /EtOH	-
Coumarines	NH ₄ OH (25%) fluorescence sous lumière UV	-
Quinones	NaOH (1%)	-
Anthocyanes		++
Alcaloïdes	Réactif Wagner : HgCl ₂ + KI	+
	Réactif Mayer : Iodomercurate de potassium K ₂ HgI ₄ + I ₂	-

(*) : +++ : Fortement positif ; (++) : Moyennement positif ; (+) : Faiblement positif ; - : Négatif.

La présence ou l'absence des différents groupes chimiques sont présentées dans les figures ci-dessous :



1: Anthocyanes
 2: Antraquinones
 3, 4 : Composés réducteurs



Figure 122 : Résultats du screening phytochimique des Anthocyanes, Antraquinones

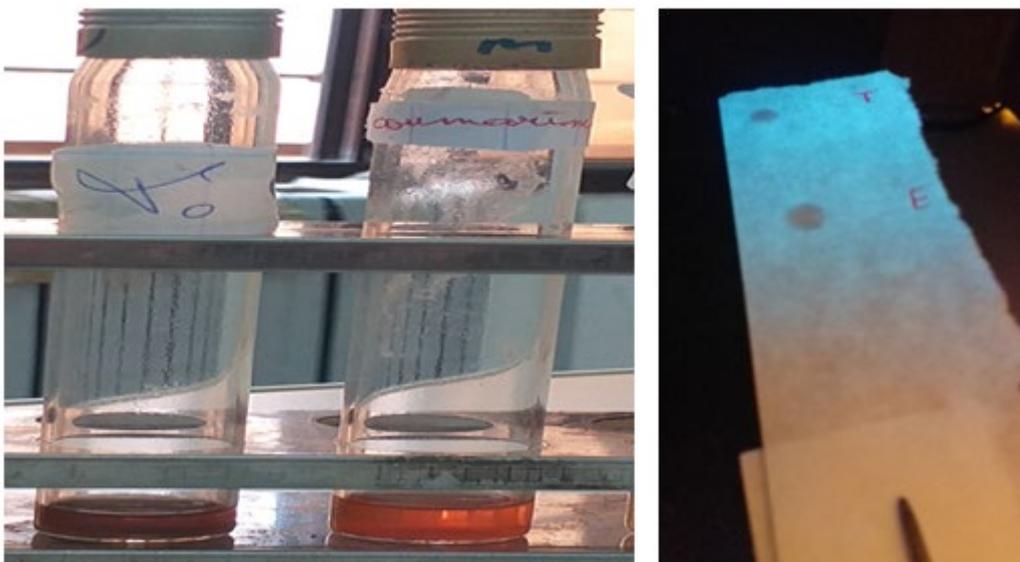


Figure 123 : Résultats du screening phytochimique des Coumarines (l'observation sous UV 366 nm l'absence d'une fluorescence indique l'absence de coumarines).



5 : Réactif de Mayer

6 : Réactif de Wagner

5

6

Figure 124 : Résultats de screening phytochimique des Alcaloïdes



7 : Oses et holosides

8 : Quinones

9 : Saponines

7

8

9

Figure125 : Résultats de screening phytochimique des holosides, quinones et saponines.



10 : Tanins

11 : Flavonoïdes

12 : Terpénoïdes

10

11

12

Figure 126: Résultats de screening phytochimique des tannins, flavonoides et terpénoïdes.

Les tests du screening phytochimiques illustrés par le tableau (23) et représentés par les figures ci-dessus font ressortir les résultats suivants :

La présence des flavonoïdes, des tanins galliques et des terpénoïdes.

La présence des saponines et de composés réducteurs. Une réaction positive pour les alcaloïdes et les anthocyanes.

L'absence des oses et holosides, des coumarines, quinones et antraquinones dans les fraises.

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les extraits de fraise présentés dans le (Tableau 23) montrent que la présence flavonoïdes, terpénoïdes et des anthocyanes est plus marquée que les autres composés recherchés. L'étude complète du screening phytochimique met en évidence la présence de composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes, notamment des substances polyphénoliques (Flavonoïdes, Tanins et anthocyanes). La nature des principes constituants chimiques mise en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes de notre fruit étudié. En effet, Il s'agit essentiellement :

Des flavonoïdes souvent présentés comme anti-inflammatoire, antiallergique, hépato protecteur, antispasmodique, hypocholestérolémiant, diurétique, antibactérien, antiviraux in vitro. Ils sont dotés d'un pouvoir thérapeutique avéré pour soigner les troubles fonctionnels intestinaux comme la colopathie fonctionnelle, la laxophobie, la constipation etc... (Bruneton., 2009).

Des tanins : les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet anti diarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique – antibactérien et antifongique – clairement démontré de ces composés est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatites) (Bruneton., 2009).

Des saponosides : sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces composés aient une très forte activité hémolytique. In vivo, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. (Bruneton., 2009).

Les alcaloïdes jouent toujours un rôle important, comme principes actifs des médicaments, malgré l'essor des produits de synthèse. Ils sont utilisés soit tels quels, soit sous forme de dérivés plus actifs, mieux tolérés par l'organisme. Un des premiers alcaloïdes utilisés a été la Quinine antimalarique qui rend encore service dans certaines formes graves du paludisme dues à *Plasmodium f.* Son isomère, la Quinidine, supprime les fibrillations cardiaques. La Colchicine du colchique est un remède anti-inflammatoire spécifique des accès douloureux de la goutte.

Le groupe des alcaloïdes de L'Ergot de seigle conserve une place privilégiée avec l'ergotamine, dépresseur du système nerveux sympathique (sympatholytique), son dérivé dihydrogéné, vasodilatateur cérébral indiqué dans le traitement des migraines, et la bromocriptine, inhibiteur de la lactation, également prescrite dans certains types de stérilité.

Les alcaloïdes indoliques fournissent des médicaments importants : la Reserpine, isolée d'une plante indienne sédative *Rauwolfia Serpentina*, qui a inauguré avec la chlorpromazine les neuroleptiques, médicaments spécifiques des psychoses aiguës avec agitation, et apporté une révolution en thérapeutique psychiatrique ; la Vincamine, qui améliore le fonctionnement des cellules cérébrales (sujets âgés) ; la Vinblastine et la Vincristine, alcaloïdes voisins de la pervenche de Madagascar, utilisés dans le traitement des leucémies, de la maladie de Hodgkin et de diverses autres tumeurs.

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits de fraises ont confirmé la présence de plusieurs familles de composés. La richesse des fraises en composés chimiques actifs pourrait expliquer leur forte consommation.

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important dans les fraises. Et comme la majorité des effets pharmacologiques sont dus à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes, des anthocyanes et des tannins contenus dans les fraises a été effectué pour en estimer leurs teneurs.

1.2. Paramètres physicochimiques

1.2.1. Détermination du taux d'humidité

Les valeurs de la teneur en eau de nos échantillons de fraise sont illustrées dans la figure suivante :

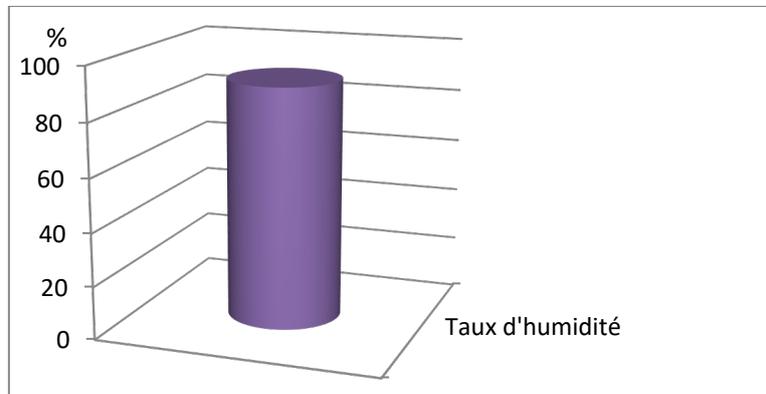


Figure 127 : Taux d'humidité des échantillons de fraise.

Le taux d'humidité dans la fraise est de 90,5%. Cette valeur mesurée est proche de celle trouvée par **Garcia et al (2002)**. Cela prouve que la fraise est un fruit très riche en eau.

1.2.2 Détermination du pH : Potentiel d'hydrogène

Les valeurs moyennes du pH des échantillons de fraise sont illustrées dans la figure suivante :

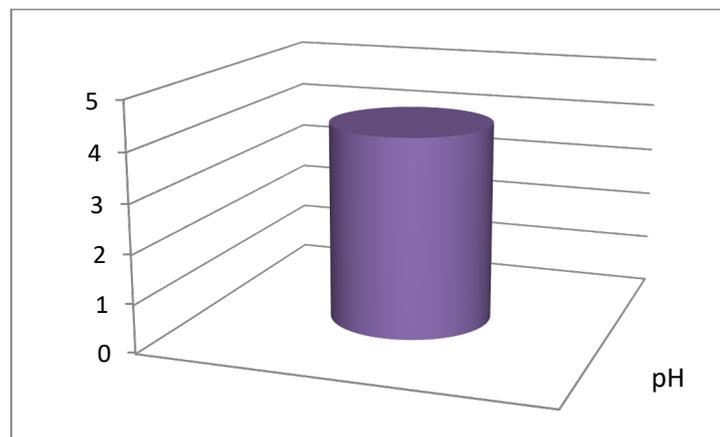


Figure 128 : mesure du pH des échantillons de fraise.

Le pH est un critère principal et d'une importance primordiale, il indique la qualité de la conservation des fruits et légumes et sert aussi à mettre en évidence d'éventuelle fermentation microbienne.

Selon **Luh et al. (1986)**, un pH bas est essentiel pour empêcher la détérioration et la dégradation des fruits et légumes, en défavorisant la prolifération des bactéries, des levures et des moisissures.

D'après la figure 128, une valeur de pH de 4.11 a été enregistrée. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **kamal et al. (2015)** et **Sindumathi et al. (2014)** et à ceux obtenus par **Grigemo-Miguel et Beloso-Martin (1999)** et **Potel Carlen , (2005)** qui ont trouvé une valeur de 3.69 pour la confiture à base d'abricot et d'orange et de 3.29 pour la confiture de la fraise, et une valeur de 2.86 pour une confiture de noix de coco respectivement. Par contre nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par **Muhammed et al. (2008)** avec un pH de 4,60 pour la confiture de pomme.

1.2.3. Détermination de l'acidité titrable.

L'acidité titrable de notre échantillon de fraise est donnée par la figure 129.

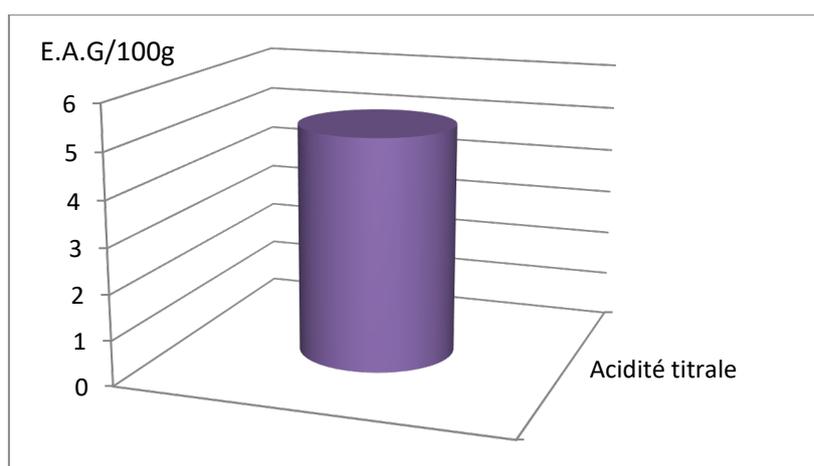


Figure 129: l'acidité titrable de l'échantillon de fraise.

La teneur en acides organiques (acides citrique, malique, tartrique,...) est regroupée sous le terme « acidité ». L'acidité d'un fruit reflète directement son acceptabilité par le consommateur et sa conservabilité.

La valeur enregistrée de l'acidité titrable de nos fraises est de 5,12. Cette valeur est inférieure à celles trouvées par **(Potel Carlen ,2005)** qui ont travaillé sur des jus de fraises.

Garcia-Viguera et al. (1999), ont rapporté des valeurs comprises entre 0,6 et 1,2 g/100g pour la confiture de fraise, ces valeurs sont inférieures à celles obtenues dans la présente étude.

Des acidités de 0,5 et 0,22 g/100g ont été enregistrées par **Aslanova et al. (2010)** pour les confitures de cerise et de fraise, respectivement. De ces résultats, on peut constater que l'acidité de la confiture de fraise (0,22 g/100g) est inférieure à nos résultats.

De même, les études effectuées par **Touati et al. (2014)**, ont donné des valeurs inférieures à nos résultats où l'acidité constatée est de 0,82g/100g.

De ces résultats, on peut constater que nos fraises sont riches en acides organiques.

1.2.4.Détermination des teneurs en cendres.

Les valeurs de la teneur en cendres des notre échantillon de fraise sont illustrées dans la figure 130.

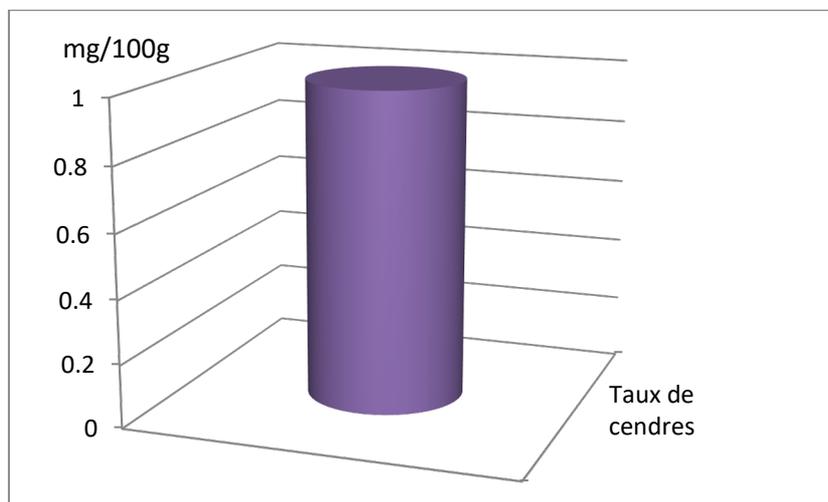


Figure 130: Teneurs en cendres des échantillons de fraise.

Les variations dans le teneur en matières minérales (taux de cendres) sont très probablement dues aux conditions de croissance telles que la qualité des sols (distribution des éléments minéraux dans le sol), le volume d'eau et la composition des engrais utilisés (**Lopez et al ; 2008**).

D'après nos résultats obtenus, on remarque que la teneur en cendres de notre échantillon de fraise est de 1%. Cette valeur est supérieure à la teneur moyenne en cendres (0,280%) de la confiture d'abricots rapportée par **Belitz et al. (2009)**. La teneur en cendre de notre échantillon de fraise est deux fois supérieure à celle obtenue par **Tâpsoba (2011)** qui a trouvé une valeur de 0,40% pour la confiture de baobab (*Adansoniadigitata L.*).

1.2.5. Teneurs en sucres totaux et en sucres réducteurs

Les sucres totaux regroupent l'ensemble des polysaccharides, les oligosaccharides et les monosaccharides. Ils constituent la majeure partie de notre alimentation et sont apportés surtout par les fruits (Lee *et al.*, 1970).

La concentration en sucres des fruits et leurs dérivés est d'un grand intérêt, en raison de leur influence sur les propriétés organoleptiques; elle conditionne la stabilité et la conservabilité des dérivés de fruits (Pavlova *et al.*, 2013).

A partir la courbe d'étalonnage de glucose que nous avons établi, des taux de sucres de 0,148mg/ml et de 0,709mg/ml ont été enregistrées concernant les sucres totaux et réducteurs respectivement pour notre échantillon de fraise.

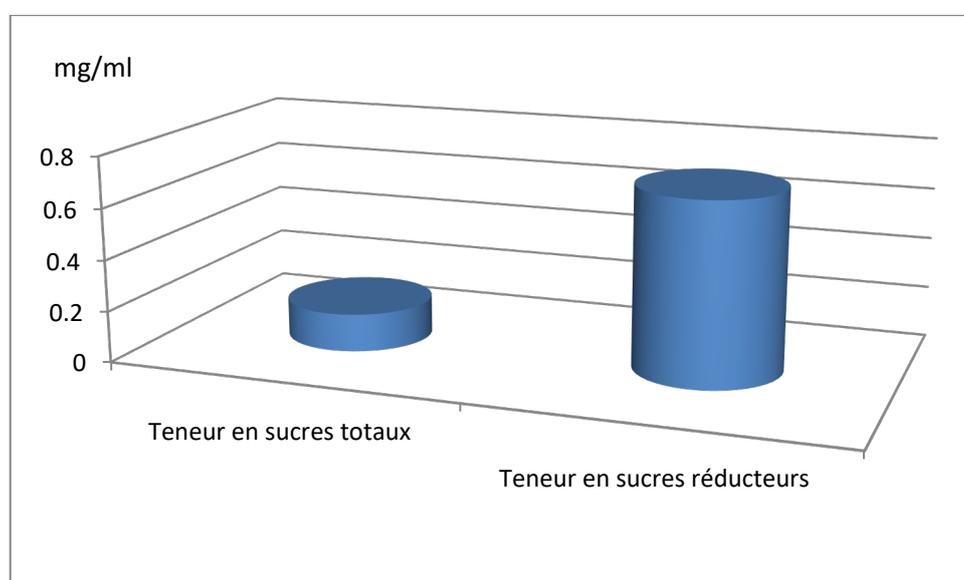


Figure 131 : Teneurs en sucres totaux et réducteurs de notre échantillon de fraise.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Chauhan *et al.* (2013) avec une teneur de 61 g/100g (confiture de noix de coco), avec ceux rapportés par Touati *et al.* (2014) avec une teneur de 64,9 g/100g (confiture d'abricot) et avec ceux trouvés par Mathlouthi *et al.* (2009) avec un taux de sucres totaux de 57,7 à 61,6% (confitures de fraises, abricot, cerise et framboise).

2^{EME} PARTIE : ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE.

1.Extraction des composés phénoliques des fraises

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour extraire les composés phénoliques des fruits et légumes. La méthode la plus utilisée est l'extraction conventionnelle par macération (ECM) qui constituera notre méthode d'extraction de référence (témoin). Les autres méthodes étudiées dans ce travail sont basées sur l'extraction par solvants mais intensifiées par l'utilisation du reflux, du soxhlet ou par l'utilisation des ultrasons. L'extraction par reflux, par soxhlet et par ultrasons ont été utilisées à titre comparative.

1.2. Extraction conventionnelle par macération(ECM)

Une étude préliminaire a été effectuée pour déterminer le rapport solvant/eau (v/v) qui donnera le meilleur rendement en antioxydants naturels et qui sera appliqué dans la suite de notre étude (figure 122).

Les conditions de l'extraction conventionnelle par macération (ECM) ont été choisies selon les données de la littérature (Zia-ur-Rehman et al., 2006 ; Li et al., 2006a; Sawalha et al., 2009 ; M'hiri et al., 2014 ; M'hiri et al., 2015). Les solvants utilisés sont des mélanges de solvants/eau à différents ratios 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 (solvant/eau % (v/v)).

Selon la littérature (Li et al., 2006b) et (Bartnick et al., 2006), les solvants donnant la teneur la plus élevée en phénols totaux sont le méthanol et l'éthanol. Une concentration d'éthanol ou de méthanol variant de 70 à 80% est la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques des fruits et légumes, la chose que nous allons essayer de vérifier dans la suite de notre travail.

La fraise *fragaria vesca* disponible dans le commerce est utilisée comme matériau d'extraction. Cette matière première est lavée puis broyée. 30 g de purée de fraise est transféré dans un Erlenmeyer et les volumes appropriés de solvants d'extraction (solvant-eau) sont ajoutés pour enrichir le rapport solide / solvants souhaité. Ainsi, 100 ml de solvants sont utilisés pour 30 g de fraise. Le mélange est agité pendant 48 h à 25°C, Après filtration de la

solution et évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45° C) on récupère l'extrait brut sous forme liquide de couleur rose.

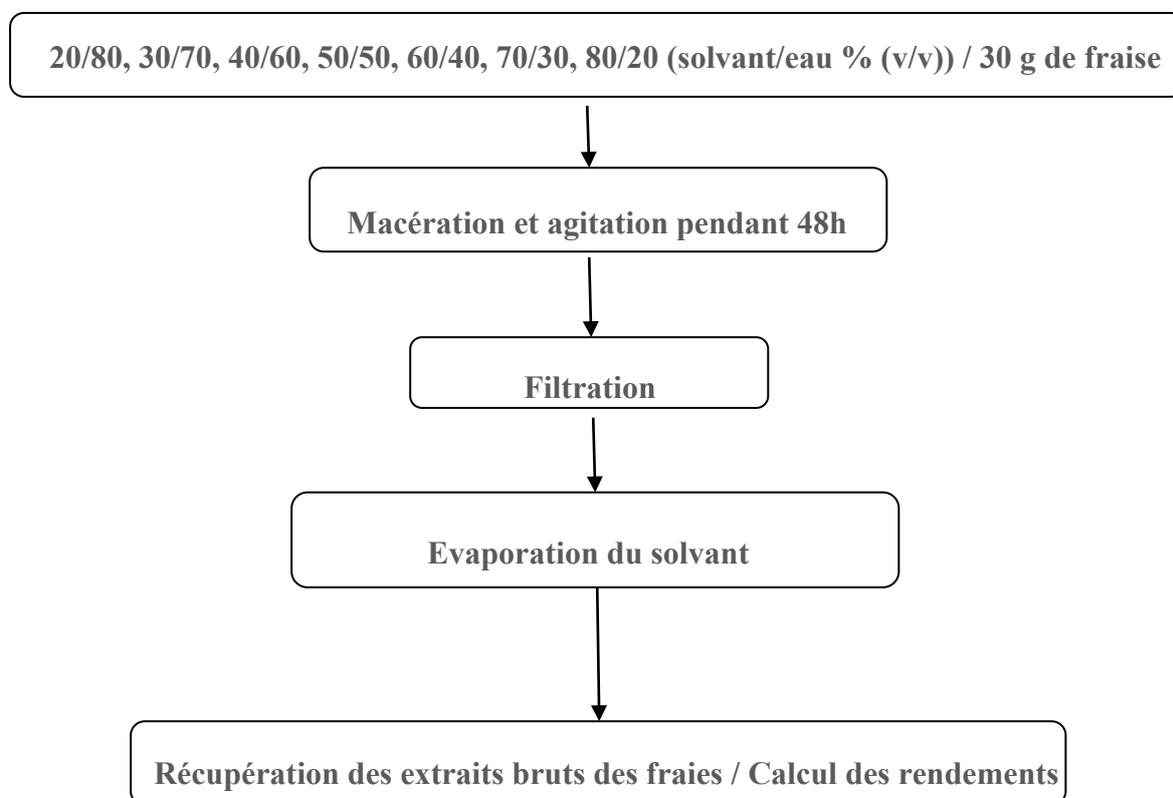


Figure132 : Optimisation du rapport solvant/eau /(30g de fraise).

1.2.1. Recherche du meilleur solvant d'extraction

Le solvant doit être sélectif, possédant une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée et une faible viscosité. A ce niveau du procédé d'extraction, le choix du solvant déterminera le profil phytochimique de l'extrait, dépendamment de la polarité de chaque molécule. Du fait de leur structure chimique, les polyphénols sont des composés moyennement polaires. Les formes glycosylées sont relativement solubles dans l'eau du fait de l'affinité de ce solvant pour les groupements hydroxyles portés par le sucre, mais les formes aglycones y sont moins solubles à température ambiante et pression atmosphérique (Lattanzio V. *et al.*, 2006). Ainsi, les solvants les plus fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau (Lapornik B. *et al.*, 2005; Pinelo M. *et al.*, 2005b).

Dans cette première partie, on a choisi d'extraire les antioxydants de la fraise en variant la polarité du solvant. Les antioxydants naturels, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont le méthanol ($\mu= 1.71$), l'éthanol ($\mu= 1.74$) l'eau ($\mu=1.84$), et l'acétate d'éthyle ($\mu= 1.88$) qui présentent une polarité moyenne et l'acétone ($\mu= 2.86$), dont la polarité est la plus élevée. Nous avons utilisé Quatre systèmes de mélanges de solvants : méthanol/eau, éthanol/eau, acétone/eau et acétate d'éthyle/eau dont la polarité sera qualifiée d'intermédiaire (**Bassène E. 2012 ; Wang, B. 2016 ;Brazinha C. et al., 2014; Yilmaz Y. et al., 2006 ; Nayek S et al , 2014**).

Le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et l'eau sont utilisés comme solvants d'extraction à différents rapports, afin de voir lequel de ces mélanges de solvants donnera le meilleur rendement d'extraction et d'observer le degré de sélectivité de ces solvants par rapport aux antioxydants naturels contenus dans les fraises (voir tableau...).

Tableau 24 : solvants utilisés à différents rapports lors de l'extraction par macération

<u>1^{ere} série</u>	<u>2^{eme} série</u>	<u>3^{eme} série</u>
EtOH 80 / eau 20	EtOH 70% / eau 30%	EtOH 50% / eau 50%
MeOH 80/ eau 20	MeOH 70% / eau 30%	MeOH 50%/ eau 50%
(CH ₃) ₂ CO 80/ eau 20	(CH ₃) ₂ CO 70% / eau 30%	(CH ₃) ₂ CO 50%/ eau 50%
AcOEt 80/ eau 20	AcOEt 70% / eau 30%	AcOEt 50%/ eau 50%
<u>4^{eme} série</u>	<u>5^{eme} série</u>	
EtOH 30% / eau 70%	EtOH 20% / eau 80%	
MeOH 30% / eau 70%	MeOH 20% / eau 80%	
(CH ₃) ₂ CO 30% / eau 70%	(CH ₃) ₂ CO 20% / eau 80%	
AcOEt 30% / eau 70%	AcOEt 20% / eau 80%	

1.2.2.Rendements d'extraction par macération des différents extraits

Après l'extraction des antioxydants des fraises effectuée par macération dans les différents solvants, on a calculé les rendements par rapport à 30 g de fraises. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux et les spectres d'absorption UV-visible ci-dessous :

1.2.2.1.Extraction par méthanol/eau

En utilisant le solvant binaire méthanol/eau comme solvant d'extraction on a obtenu les résultats suivants :

Tableau 25 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par le méthanol/eau.

Solvant	Ratio solvant/eau (v/v)	Rendement %
Méthanol-eau	20-80	15.85
	30-70	16.61
	50-50	23.45
	70-30	30.45
	80-20	35.26

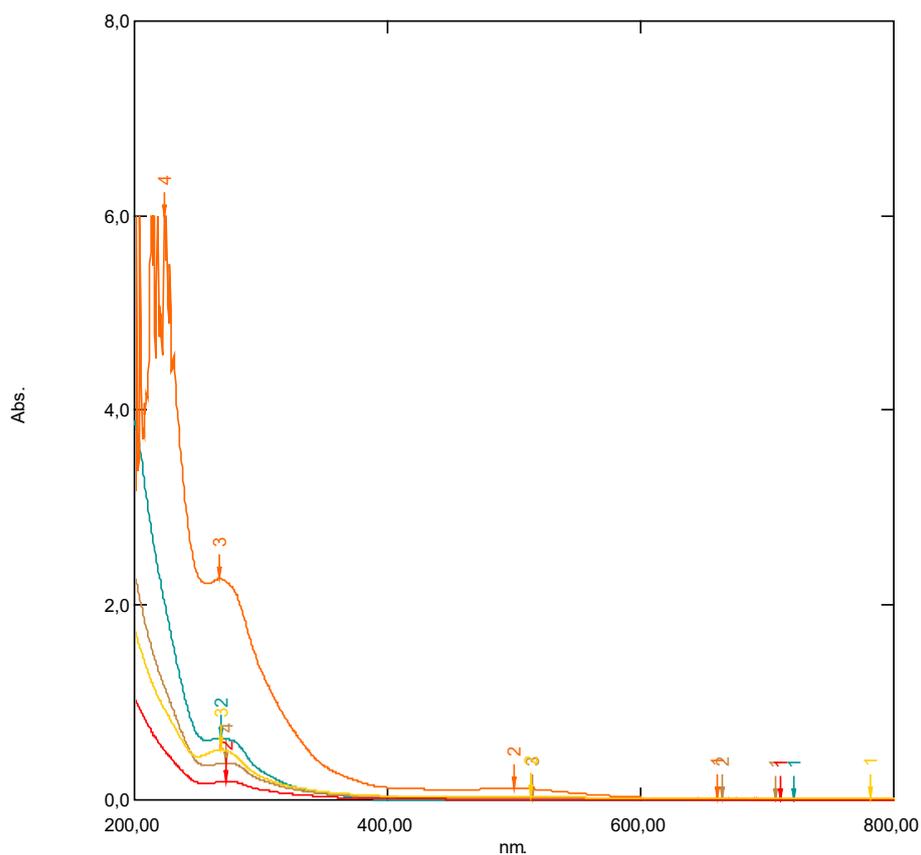


Figure 133 : Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Méthanol/Eau

1.2.2.2. Extraction par éthanol/eau

Les rendements ci-dessous ont été calculés pour l'extraction des antioxydants de la fraise en utilisant le solvant binaire l'éthanol/eau comme solvant.

Tableau 26 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'éthanol/eau.

solvant	Ratio solvant/eau (v/v)	Rendement %
Ethanol_eau	20-80	21.24
	30-70	25.95
	50-50	34.45
	70-30	38.17
	80-20	52.02

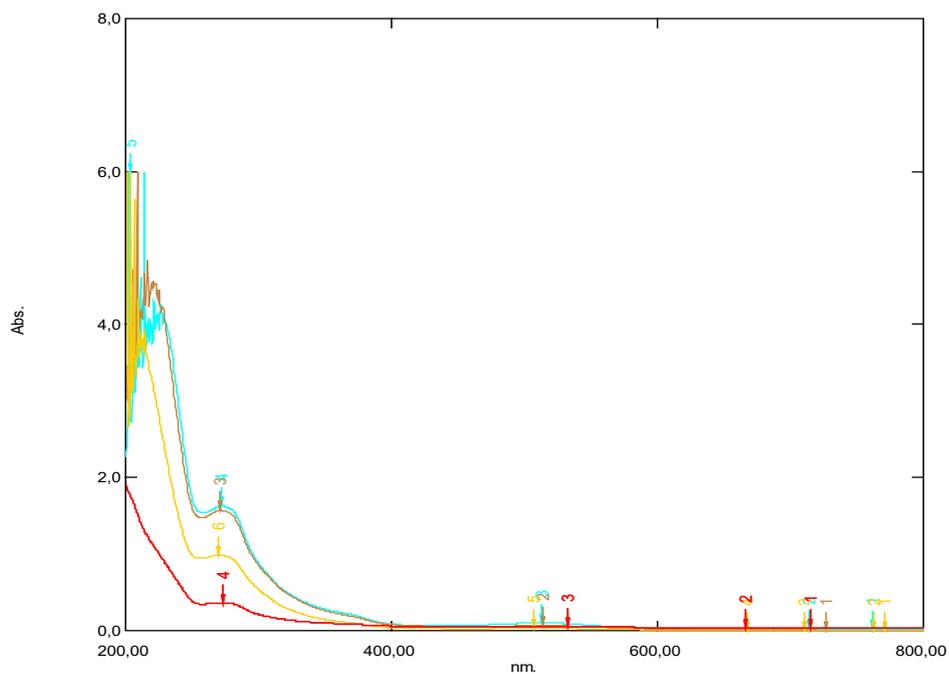


Figure 134: Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Ethanol/Eau

1.2.2.3.Extraction par macération utilisant le solvant Acétone/eau

En utilisant le solvant binaire acétone/eau comme solvant d'extraction on a obtenu les résultats suivants :

Tableau 27: rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'acétone/eau.

solvant	Ratio solvant/eau (v/v)	Rendement %
Acétone-eau	20-80	21.4
	30-70	21.62
	50-50	28.45
	70-30	29.18
	80-20	35.44

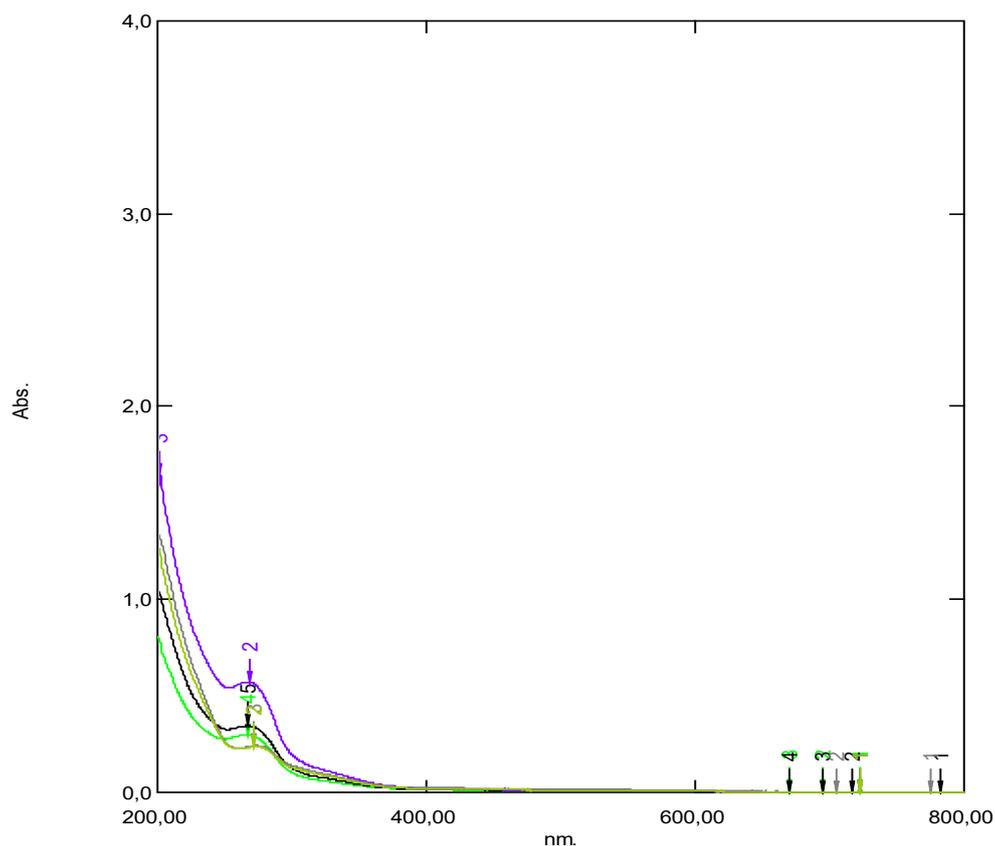


Figure 135 : Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant Acétone/Eau

1.2.2.4Extraction par Acétate d'éthyle-eau

Les rendements ci-dessous ont été calculés pour l'extraction des antioxydants de la fraise en utilisant le solvant binaire acétate d'éthyle/eau comme solvant :

Tableau 28 : rendements d'extraction des antioxydants naturels par l'acétate d'éthyle /eau.

Solvant	Ratio solvant/eau (v/v)	Rendement %
Acétate d'éthyle-eau	20-80	10.79
	30-70	15.8
	50-50	18.64
	70-30	19.73
	80-20	33.6

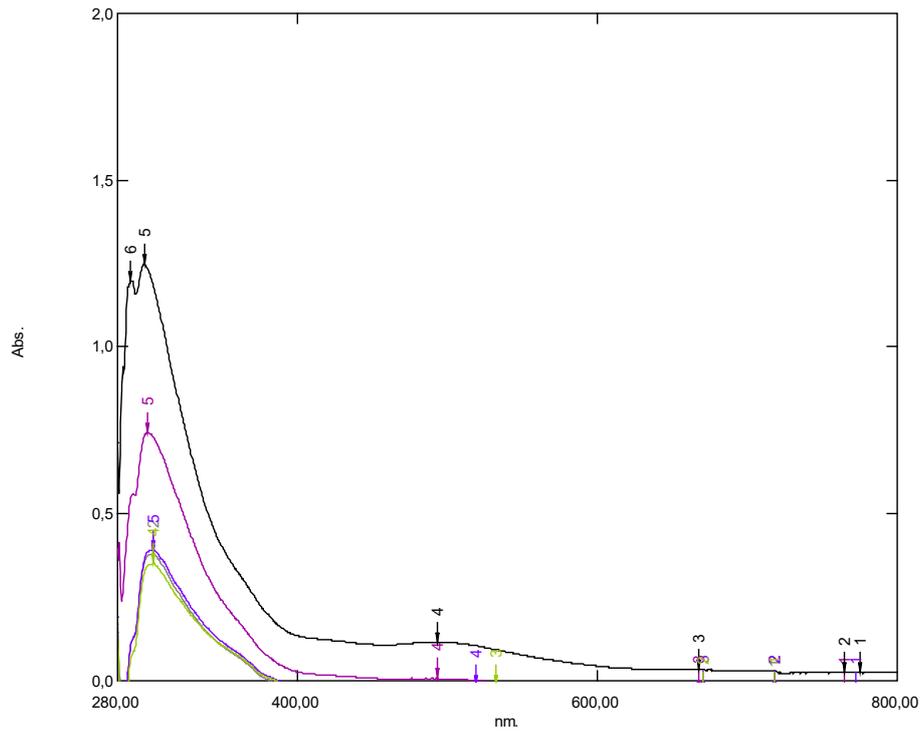


Figure 136 : Spectre d'absorption UV-visible de l'extrait fraise par le solvant AcOEt/Eau

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que :

Le rendement le plus élevé a été obtenu pour le rapport 80-20 (v/v) pour les quatre solvants « méthanol, éthanol, acétone et acétate d'éthyle suivi du rapport 70-30.(v/v.)

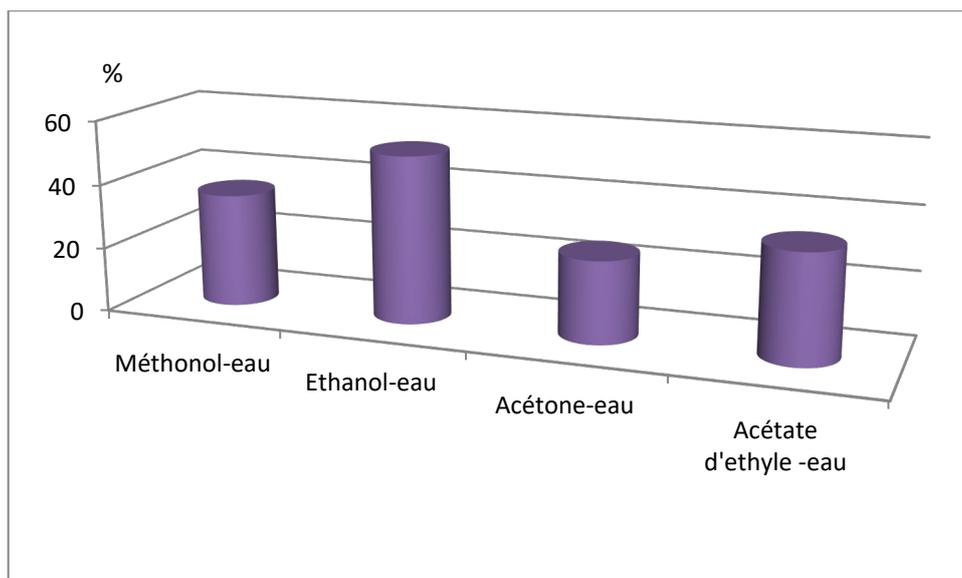


Figure 137 : Résultats des rendements des extraits à concentration 80% de la fraise.

Il ressort de cette figure que :

Le mélange éthanol/eau semble être le plus efficace et nous pouvons donc conclure que l'éthanol à 80% est le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques des fraises.

Les moments dipolaires des solvants binaires : méthanol (1.71), éthanol (1.74), acétate d'éthyle (1.88) et acétone (2.86) influent sur l'extraction des antioxydants naturels de la fraise.

Les spectres d'absorption UV – Vis des différents extraits de fraise à différents ratios des solvants utilisés sont visibles sur les figures ci-dessus.

Les formes des spectres montrent deux centres de pic aux longueurs d'onde de 480 nm à 540 nm et les valeurs enregistrées par les spectres UV-vis confirment l'exactitude des rendements calculés, car les rendements les plus élevés correspondent aux absorbances maximales.

1.2.3. Recherche de la meilleure méthode d'extraction

Une fois les solvants ont été choisis, l'étude de l'effet de la technique d'extraction a été analysée. Pour cela l'extraction a été faite par ultrasons (sonication), par reflux et par soxhlet. Ces méthodes sont simples, efficaces et peu coûteuses et facilement réalisables au niveau du laboratoire. Elles sont reproductibles, faciles à mettre en œuvre et elles permettent d'utiliser une large gamme de solvant afin d'extraire différents composés naturels. De plus la méthode d'extraction par sonication possède plusieurs avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. (Kiriamiti, 2003 ; Chemat F. et al , 2008 ; Draye et al., 2009).

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les antioxydants naturels en particulier les antioxydants polyphénoliques, sensibles à toute dégradation éventuelle à l'oxydation, à la lumière et à la température (La température d'extraction a été fixée à 45°C pour éviter la dégradation des composés phénoliques au cours du processus de l'extraction.

De ce fait, chaque ballon d'extraction a été entièrement recouvert d'une feuille d'aluminium et tous les échantillons ont été extraits et évaporés à température de 45°C et conservés à basse température (- 4°C) et à l'abri de la lumière avant chaque analyse.

La figure ci-dessous (figure 138) décrit les différentes étapes suivies pour l'extraction des antioxydants naturels polyphénoliques contenus dans nos fraises.

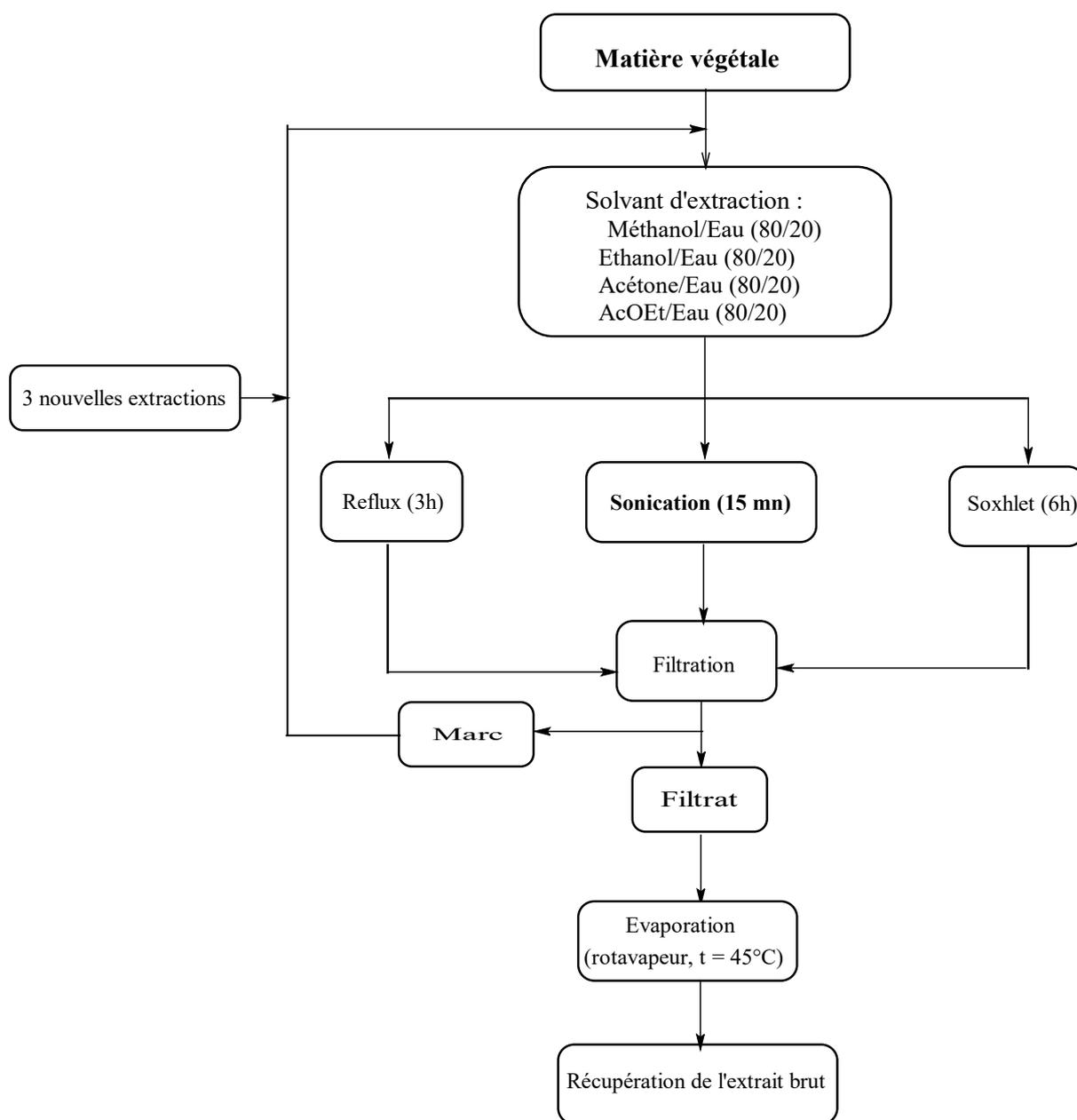


Fig 138 : Schéma du protocole d'extraction des antioxydants naturels de la fraise par trois techniques d'extractions.

1.2.3.1 Extraction par sonication :

Une prise d'essai de 30g de matière végétale finement broyées est mélangée avec 100 ml du solvant choisi. Le mélange est agité par vortex à 5000 tr/min pendant 10 min, puis extrait dans un bain à ultrason à 25 KHz pendant 15 min. Le solvant est évaporé à 45° C, le marc est alors récupéré puis extrait à nouveau à trois reprises et l'extrait est ensuite filtré avec du papier filtre (Wattman N°4) puis conservé à - 4°C.

1.2.3.2 Extraction par soxhlet :

Une quantité de 30g de matière végétale (fraise broyée) est placée dans une cartouche en présence de 300 ml du solvant choisi. L'extraction a duré 6 heures. L'extrait brut est récupéré, filtré avec du papier filtre (Wattman N°4) puis conservé à -4°C .

1.2.3.3 Extraction par reflux :

Concernant l'extraction par reflux, 30g de chair de fraises broyée est mélangé avec 100 ml du solvant choisi. L'extraction a duré 3 heures. Après filtration de la solution et évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (45°C) on récupère l'extrait brut sous forme liquide de couleur marron clair

1.2.4 Les rendements des extraits bruts des fraises

Dans cette partie, nous avons choisi d'extraire les composés phénoliques par trois méthodes différentes à savoir chauffage à reflux, soxhlet et sonication, en utilisant quatre systèmes de solvants binaires : **Méthanol/Eau, Ethanol/Eau, Acétone/Eau, Acétate d'éthyle/eau**. Au total, nous avons obtenu douze extraits secs avec lesquels les différents tests ont été effectués. L'étude comparative des ces trois méthodes d'extraction a porté sur : Le rendement d'extraction, le dosage quantitatif des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins et l'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits. Les différents résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 29 : La masse des extraits bruts (extraction par chauffage à reflux).

Solvant	La masse initiale(g)	La masse de l'extrait brut(g)
Méthanol /Eau	30(g)	5.4(g)
Ethanol/Eau	30(g)	5.25(g)
Acétone/Eau	30(g)	3.7(g)
Acétate d'éthyle/Eau	30(g)	2.1(g)

Tableau 30 : La masse des extraits bruts (extraction par soxhlet)

Solvant	La masse initiale (g)	La masse de l'extrait brut(g)
Méthanol/Eau	30(g)	6.1(g)
Ethanol/Eau	30(g)	6.66(g)
Acétone/Eau	30(g)	4.0(g)
Acétate d'éthyle/Eau	30(g)	2.6(g)

Tableau 31 : La masse des extraits bruts (extraction par sonication)

Solvant	La masse initiale (g)	La masse de l'extrait brut(g)
Méthanol/Eau	30(g)	12.2(g)
Ethanol/Eau	30(g)	13.65(g)
Acétone/Eau	30(g)	5.2(g)
Acétate d'éthyle/Eau	30(g)	4.9(g)

Les extractions des différents composés phénoliques nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait. Ce dernier a été déterminé par rapport à 30g de matériel végétal est exprimé en pourcentage, le calcul de rendement est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{\text{Masse de l'extrait brut}}{\text{Masse des fraises}} \times 100$$

1.2.5.Choix du meilleur solvant d'extraction sur le rendement et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes

Dans cette partie, nous avons choisi d'extraire les composés phénoliques des fraises par trois méthodes différentes : chauffage à reflux, soxhlet et sonication, en utilisant quatre systèmes de solvants binaires de polarité croissante à savoir l'acétate d'éthyle, l'éthanol, l'acétone et le méthanol.

Les différents solvants sont additionnés de 20% de l'eau distillée: méthanol/eau (80/20), éthanol/eau (80/20), acétone/eau (80/20), acétate d'éthyle/eau (80/20). Au total, nous avons

obtenu douze extraits secs avec lesquels les différents tests ont été effectués. L'étude comparative des ces trois méthodes d'extraction ont porté sur : Le rendement d'extraction, le dosage quantitatif des polyphénols totaux, des flavonoïdes et les tannins.

A partir des fraises sélectionnées, douze extraits ont été obtenus. Le tableau 1 indique les rendements obtenus pour chaque extrait de fraise.

Tableau 32 : Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir de fraise par différents modes d'extraction :

Rendements d'extraction (%)			
Solvants	Extraction par reflux	Extraction par soxhlet	Extraction par sonication
Méthanol/Eau	12.5%	20.03%	40.6%
Ethanol/Eau	17.5 %	22.2%	45.5%
Acétone/Eau	12.33%	13.2%	16.26%
AcOEt/Eau	6.2%	8.6%	16.3%

Les extractions des différents composés phénoliques nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait. Les résultats des rendements sont exprimés en moyenne, pour chaque extrait. Les rendements d'extraction obtenus pour chaque extrait de fraise par les trois méthodes d'extraction sont présentés dans la figure 139 :

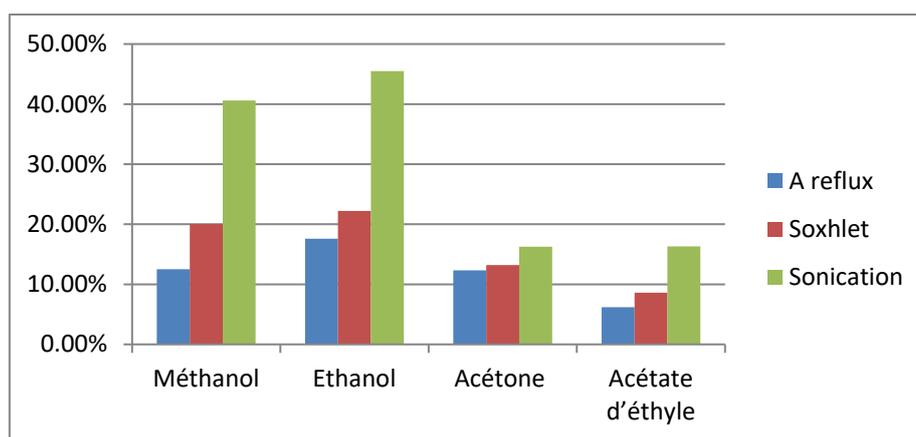


Figure 139 : Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir de fraise par différents modes d'extraction.

Il ressort de cette figure que :

Les résultats obtenus révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. Le meilleur rendement d'extraction des trois méthodes utilisées, est la sonication avec un taux d'extraction de **45.5%**, suivi du soxhlet avec **22.2%** et du reflux avec **17.5%**.

En effet le meilleur rendement a été obtenu avec le mélange binaire éthanol/eau (**45.5%**), concernant l'extraction par sonication et pour les autres méthodes (Sохhlet ; et reflux), le meilleur mélange est éthanol /eau avec respectivement (**22.2% ; 17.5%**)

Nous pouvons donc conclure que le mélange éthanol/eau semble être le plus efficace et la méthode d'extraction par sonication est la plus sélective pour extraire les composés phénoliques des fraises.

Les résultats décrits dans cette figure révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. Les solvants mixtes se sont montrés particulièrement efficaces. En effet, le méthanol (80%) et l'éthanol (80%) présentent les rendements les plus forts suivis par l'acétone et l'acétate d'éthyle (80%). C'est ainsi que le méthanol (80%) et l'éthanol (80%) apparaissent comme étant les solvants les plus efficaces à extraire les polyphénols totaux et les flavonoïdes des fraises. Nous constatons donc que le mélange méthanol/eau et éthanol/eau semblent être plus efficaces et plus sélectifs que le mélange mixte acétone/eau et acétate d'éthyle/eau pour extraire les polyphénols totaux des fraises. Cela est dû probablement à l'affinité des composés phénoliques aux solvants polaires que les solvants polaires non polaires. De plus, la supériorité de l'extraction par soxhlet par rapport à l'extraction par reflux suggère que le temps d'extraction jouerait un effet positif améliorant l'extraction.

En outre l'utilisation de solvants mixtes a augmenté de façon remarquable leurs pouvoirs extractants. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les polyphénols. Lapornik B. *et al.* (2005) ont montré qu'une extraction aqueuse à température ambiante, à partir du marc de raisin, conduisait à l'obtention d'un extrait contenant 340.2 ± 5.6 mg de polyphénols totaux et 78.6 ± 8.6 mg de flavonoïdes par litre de solution, respectivement, après 12h de macération à température ambiante. Dans les mêmes conditions, un mélange éthanol/eau (70:30) a permis de multiplier par 4 la concentration en composés phénoliques totaux (soit 1448.6 ± 5.6 mg/L)

et par 12 la concentration en flavonoïdes (995.1 ± 9.2 mg/L). Selon Mohammedi.Z et Atik.F (2011) l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. En effet, ces auteurs ont observé qu'un mélange binaire méthanol/eau (70:30) permet d'accroître les rendements en composés phénoliques totaux (jusqu'à 2025.5 ± 8.6 mg/L après 12h de macération, tandis qu'un mélange acétone/eau (70:30) permettait une récupération maximale des composés phénoliques totaux.

La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs (Trabelsi et al. 2010). L'augmentation de la concentration d'alcool d'un mélange hydro-alcoolique réduit la constante diélectrique (ϵ_r) de ce mélange et augmente la solvation des molécules de polarité inférieure à l'eau, comme c'est le cas pour les polyphénols (Cacace J. *et al.*, 2003).

D'après nos résultats obtenus on remarque une amélioration du rendement par extraction par sonication (16.26% pour l'acétone (80%) et 16.3% pour l'acétate d'éthyle(80%), 40.6% pour le méthanol 70% et 45.5% pour l'éthanol (80%)) comparée à l'extraction par soxhlet (8.6% pour l'acétate d'éthyle(80%), 13.2 % pour l'acétone (80%) et 20.03% pour le méthanol 80% et 22.2% pour l'éthanol (80%)) et à l'extraction par reflux (6.2% pour l'acétate d'éthyle (80%), 12.33% pour l'acétone (80%) et 12.5% pour le méthanol 80% et 17.5% pour l'éthanol (80%)) alors qu'on assiste à une baisse des rendements lors de l'utilisation du reflux et du soxhlet (6.20% et 8.6 % pour l'acétone (80%)).

L'extraction par reflux et par soxhlet sont considérés comme étant des méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques approuvées par divers auteurs pour leurs efficacités (Liu et al. 2013). Les ultrasons perturbent la structure de la paroi cellulaire induisant ainsi la lyse des cellules et accélérant la diffusion des molécules à travers les membranes et en brisant les membranes cellulaires. Les ultrasons ont l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction. Ceci est en accord avec nos résultats qui révèlent que les plus importants rendements ont été mentionnés par la méthode d'extraction par ultrasons (sonication).

A titre comparatif, nous pouvons donner un ordre de classement concernant les rendements pour les différents solvants utilisés et cela quelque soit le mode d'extraction adopté.

Ethanol 80% > méthanol 80% > acétone 80% > acétae d'éthyle 80%

Cependant et bien que l'éthanol 80% et le méthanol 80% soient efficaces du fait de leurs propriétés chimiques, et notamment de leurs polarités, le mélange binaire éthanol/eau est préférable pour des raisons de coûts de production mais également de toxicologie, et donc, d'alimentarité des extraits (Tephly T.R., 1991; Yilmaz Y. *et al.*, 2006 ,Brazinha C. *et al* 2014.).

Nous pouvons donc conclure que le mélange méthanol/eau et éthanol/eau semblent être les plus efficaces et la méthode d'extraction par sonication est la plus sélective pour extraire les composés phénoliques des fraises, car cette dernière donne les rendements les plus élevés quelque soit le solvant utilisé comparé aux deux autres modes d'extractions (soxhlet et reflux).

2. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 755nm. La teneur en polyphénols totaux des extraits a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique comme étalon (Figure 140). Elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par mL d'extrait.

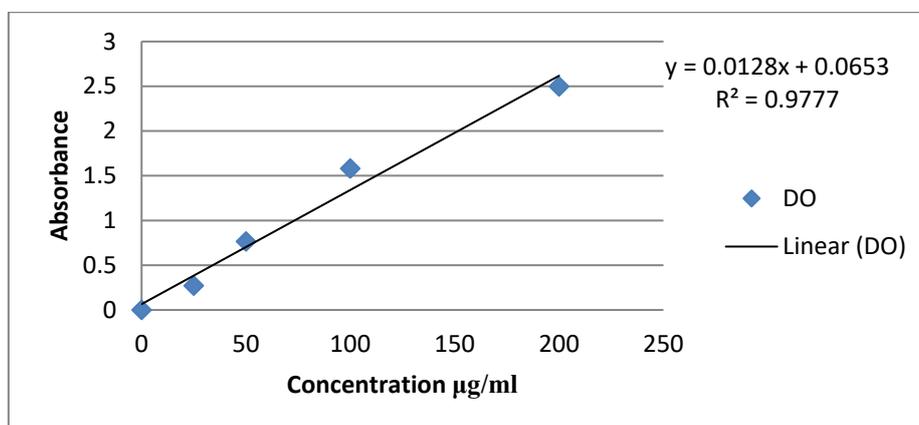


Figure 140 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux a pu être calculée et on a pu obtenir une meilleure concentration [**202.5µg/ml**], par sonication pour le mélange binaire acétone/eau, par contre pour l'extraction au soxhlet, la meilleure

concentration est de [128.25µg/ml] a été obtenue avec le mélange de solvant binaire éthanol/eau et concernant le chauffage à reflux la meilleure concentration est obtenue en utilisant les mélange binaires éthanol/eau et méthanol/eau avec respectivement [67.5µg/ml] et [69.5µg/ml] .

Les résultats relatifs au dosage des teneurs en polyphénols totaux sont indiqués dans la figure 141.

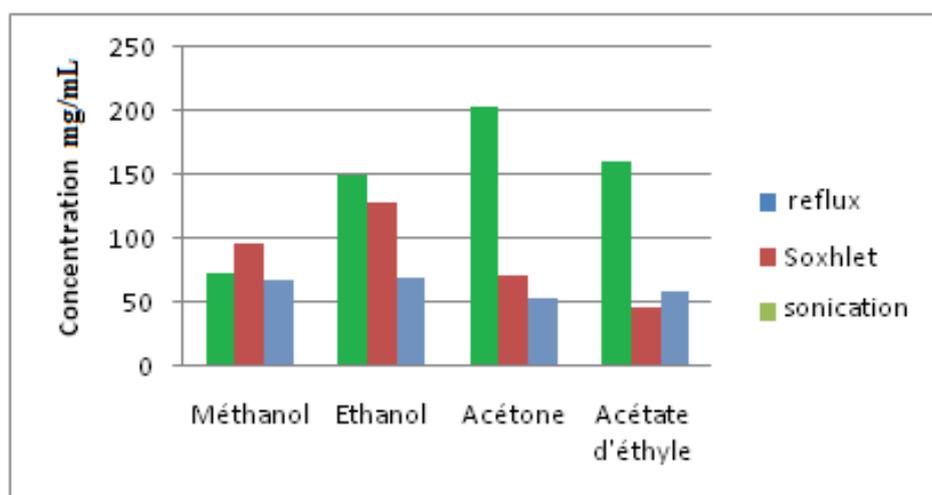


Figure 141 : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.

Les résultats indiquent que les teneurs en polyphénols totaux varient significativement selon le solvant utilisé et la méthode d'extraction. En effet on a obtenu la teneur la plus élevée (202.5mg/ml) en polyphénols totaux, par extractions aux ultrasons en utilisant le mélange binaire acétone/eau, par contre pour l'extraction au soxhlet, la teneur la plus élevée est de (128.25mg/ml) a été obtenue avec le mélange de solvant binaire éthanol/eau et concernant la l'extraction par chauffage à reflux la concentration la plus élevée en polyphénols totaux est obtenue en utilisant les mélanges binaires éthanol/eau et méthanol/eau avec respectivement (67.5mg/ml et 69.5mg/ml).

L'extraction par simple reflux et par soxhlet affiche les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux (44.08 mg/mL et 58.16 mg/mL) lorsque ceux-ci sont extraits par le solvant binaire AcOEt/Eau.

La comparaison des teneurs en polyphénols totaux entre les solvants nous a permis d'établir cet ordre:

Sonication : acétone 80% > acétate d'éthyle80% > éthanol 80% > méthanol 80%

Soxhlet : éthanol 80% > méthanol 80% > acétone 80% > acétate d'éthyle80%

Reflux: éthanol 80% > méthanol 80% > acétone 80% > acétate d'éthyle80%

Enfin, la meilleure méthode pour extraire les polyphénols totaux semble être la sonication suivi de la méthode par soxhlet et par chauffage à reflux.

3. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits de fraises ont été estimées par la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$.

La spectrophotométrie a permis de quantifier les flavonoïdes dans nos extraits de fraises à une longueur d'onde de 510nm.

La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant différentes concentrations de la quercétine. Les résultats sont représentés dans la figure 142.

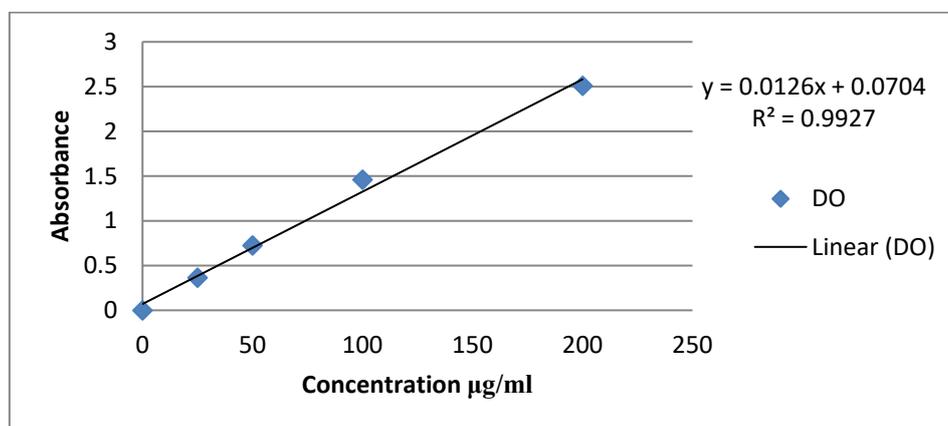


Figure 142: courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Les teneurs en flavonoïdes des extraits de fraise ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme étalon. Elles sont exprimées en µg d'équivalent de quercétine par mL d'extrait (Figure 143)...

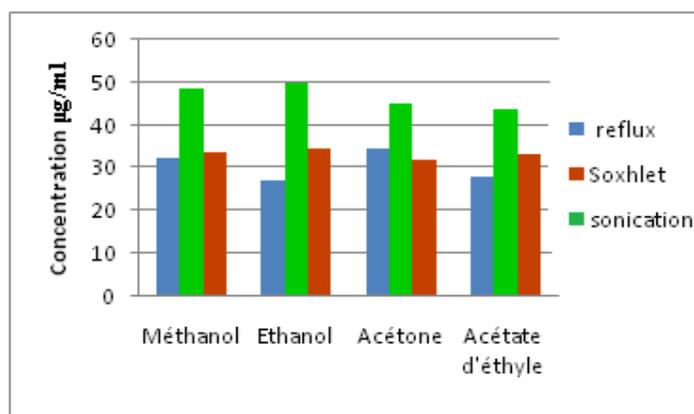


Figure 143: Teneurs en flavonoïdes (µg EQ/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication

À partir de nos résultats le dosage des flavonoïdes montre clairement que l'extraction par sonication utilisant le mélange binaire éthanol/eau a la valeur la plus élevée avec une teneur de [49.75µg/ml], par contre l'extraction par soxhlet est plus riche en flavonoïdes avec le mélange binaire éthanol/eau montrant une valeur de [34.58µg/ml]. En ce qui concerne l'extraction par chauffage à reflux le meilleur mélange de solvant binaire qui donne une valeur de [34.41µg/ml] est acétone/eau

Les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux pour la sonication, le soxhlet et pour le reflux obtenu par les trois modes d'extraction montrent que la sonication est préférable pour extraire les flavonoïdes à savoir une moyenne de 49,90 µg /mL utilisant le solvant binaire éthanol/eau contre 30,45 µg /mL en moyenne pour le soxhlet suivie du reflux avec une moyenne de 20,60 µg /mL. La figure montre une différence entre les teneurs en flavonoïdes totaux en fonction des différentes méthodes d'extraction. Cette différence pourrait s'expliquer par le temps d'extraction, qui est long dans le cas de l'extraction par soxhlet et reflux (6 h et 3h) par rapport à la sonication (15 min).

Cependant, la sonication et le soxhlet semblent être préférables pour extraire les flavonoïdes par rapport au reflux. Cela est matérialisé par la différence significative observée des deux méthodes d'extraction (la sonication et le soxhlet) avec l'extraction par reflux. C'est ainsi que la meilleure méthode pour l'extraction et la quantification des flavonoïdes est la sonication et le soxhlet utilisant les mélanges binaires méthanol/eau et éthanol/eau qui semble être les meilleurs solvants pour l'extraction des flavonoïdes..

À partir de nos résultats le dosage des flavonoïdes montre clairement que l'extraction par sonication présentent les teneurs en flavonoïdes les plus élevées et cela quelque soit le solvant d'extraction utilisé. Cependant l'éthanol/eau est le meilleur mélange de solvant binaire qui donne la valeur la plus élevée (49.75µg/ml).

L'extraction par chauffage à reflux utilisant le mélange binaire acétone/eau donne la valeur la plus élevée avec une teneur de (34.58µg/ml), par contre l'extraction par soxhlet est plus riche en flavonoïdes en utilisant le mélange binaire éthanol/eau montrant une valeur de (34.41µg/ml).

Les résultats de la teneur en flavonoïdes obtenus par les trois modes d'extraction montrent que la sonication est préférable pour extraire les flavonoïdes à savoir une moyenne de 49,75

$\mu\text{g /mL}$ utilisant le solvant binaire éthanol/eau contre $34.41 \mu\text{g /mL}$ et $34.58 \mu\text{g /mL}$ en moyenne pour le soxhlet et le chauffage à reflux.

En outre la figure montre une différence entre les teneurs en flavonoïdes totaux en fonction des différentes méthodes d'extraction. Cette différence pourrait s'expliquer par le temps d'extraction, qui est long dans le cas de l'extraction par soxhlet (6 h) et par reflux (3h) par rapport à la méthode d'extraction par sonication (15 min).

Cependant, la sonication et le soxhlet semblent être préférables pour extraire les flavonoïdes par rapport au reflux. Cela est matérialisé par la différence significative observée des deux méthodes d'extraction (la sonication et le soxhlet) avec l'extraction par reflux. C'est ainsi que la meilleure méthode pour l'extraction et la quantification des flavonoïdes est la sonication et le soxhlet utilisant les mélanges binaires méthanol/eau et éthanol/eau qui semble être les meilleurs solvants pour l'extraction des flavonoïdes.

La comparaison des teneurs en flavonoïdes entre les solvants d'extraction peuvent être classés selon cet ordre:

Reflux : acétone 80% > méthanol 80% > acétate d'éthyle80% > éthanol 80%

Soxhlet : éthanol 80% > méthanol 80% > acétate d'éthyle80% > acétone 80%

Sonication : éthanol 80% > méthanol 80% > acétone 80% > acétate d'éthyle80%.

4.Effet de la méthode d'extraction sur les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les teneurs en phénols totaux de la chair des fraises se situent dans la gamme de valeurs rapportées par Kähkönen *et al.* (2001), Heinonen *et al.* (1998) et Zheng *et al.* (2007). Il est toutefois important de relever qu'il existe une large gamme de teneurs en composés phénoliques dans la littérature.

Les résultats relatifs aux variations des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont indiqués dans le tableau 33.

Tableau 33 : Variation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes de la chair de fraise (*fragaria vesca*) obtenues par différents méthodes d'extraction.

Solvants	Teneur en polyphénols (mg EAG/ mL)			Teneur en flavonoïdes (µg EQ / mL)		
	Reflux	Soxhlet	Sonication	Reflux	Soxhlet	Sonication
Méthanol/Eau	66.66	95.85	71.25	32.23	33.83	48.50
Ethanol/Eau	67.50	128.25	150.08	27.33	34.41	49.75
Acétone/Eau	51.50	69.83	202.5	34.58	31.39	45.16
AcOEt/Eau	44.08	58.16	159.25	28.00	33.41	43.75

les résultats révèlent que les plus importantes teneurs en polyphénols ont été mentionnées par la méthode d'extraction par sonication avec des valeurs allant de 71.25 mg/ml pour le méthanol (80%) à 202.5 mg/ml pour l'acétone (80%) suivi par la méthode d'extraction par soxhlet et enfin la méthode d'extraction par simple reflux affiche les teneurs les plus faibles. Par ailleurs mis à part l'extrait à l'acétate d'éthyle (80%) obtenu par soxhlet et par reflux, les résultats ont montré que les extraits hydro-méthanoliques, hydro-éthanoliques et hydro-acétoniques obtenus par les deux méthodes d'extraction (soxhlet et sonication) accusent un net enrichissement en polyphénols totaux par rapport à ceux obtenus par reflux. La plus forte teneur étant enregistrée dans l'éthanol (80%) obtenue par soxhlet suivi par celle enregistrée par l'acétone (80%) obtenue par sonication. Ces résultats nous permettent d'établir l'ordre suivant :

Soni Acétone80% > Soni AcOEt80% > Soni EtOH80% > Sox EtOH80% > Sox MeOH80% > Sox Acétone80% > Reflux EtOH80% > Reflux MeOH80%.

Concernant Le dosage des flavonoïdes, nos résultats montrent que la teneur la plus élevée est celle de l'éthanol 80% et du Méthanol70% en utilisant la sonication comme technique d'extraction, qui renferme 49.75 µg.eq catéchine/mL d'extrait et 48.50 µg.eq catéchine/ml d'extrait respectivement, suivie par l'acétone 34.58 µg.eq catéchine/mL d'extrait dans le cas du chauffage à reflux et par l'éthanol 34.41 µg.eq catéchine/mL d'extrait pour l'extraction par soxhlet, alors que l'extrait éthanolique 80% dans le cas du reflux et celui de l'acétone 80%

dans le cas de la sonication contiennent la plus faible teneur en flavonoïdes à savoir 27.33 et 31.39 µg.eq quercétine /mL d'extrait respectivement.

L'utilisation de la technique par sonication dans le cas de l'éthanol (80%) et du méthanol (80%) améliore l'extraction des flavonoïdes alors que les teneurs restent voisines concernant l'extraction par soxhlet et par reflux et cela malgré l'utilisation des quatre solvants. Ces résultats nous permettent d'établir cet ordre:

Soni EtOH80% > Soni MeOH80% > Soni Acétone80% > Soni ACOEt80% > Sox EtOH80% > Sox MeOH80% > Sox ACOEt80% > Reflux Acétone80% > Reflux MeOH80%

Nos résultats montrent que la méthode d'extraction influence significativement les teneurs en composés phénoliques chez la fraise et que l'extraction par sonication et par soxhlet permettent un enrichissement des extraits en polyphénols totaux et en flavonoïdes comparée à l'extraction par reflux. Des résultats similaires indiquant une variation significative des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes en fonction de la technique utilisée ont été rapportés par plusieurs travaux (Mohammedi.Z et Atik.F 2020), (Annegowda et al 2011). Conformément à nos résultats, Achat. S et al (2012) ont montré que les extraits des feuilles d'olive obtenus par sonication présentent des taux élevés en polyphénols totaux et en flavonoïdes, comparés à ceux obtenus par macération.

Par ailleurs, la richesse de la fraise en composés phénoliques dans notre étude est en accord avec les travaux de Thurre.N et Andlauer.W (2007) qui se sont intéressés aux extraits hydrométhanoliques et hydroéthanoliques de quelques variétés de fraises, ils rapportent des teneurs en polyphénols totaux variant de 12.96 mg EAG. g⁻¹ MS à 29.63 mg EAG. g⁻¹ MS. Toutefois, ils rapportent des teneurs moindres en flavonoïdes que ceux obtenus dans nos extraits variant de 1.21 à 4.56 mg EC/ g⁻¹ MS. En effet, de telles différences sont notamment dues au fait que la quantité de polyphénols varie selon de nombreux paramètres tels que la variété (Rekika. D. 2005), le niveau de fertilisation ou la date de plantation (Hernanz. D.*et al.*, 2007., et Anttonen .M.*et al.*, 2006).

5. Dosage des tannins

5. 1. Dosage des tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables ont été déterminés par la méthode utilisant le trichlorure de fer FeCl_3 . L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue à longueur d'onde de 660nm. La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant différentes concentrations de l'acide gallique (**figure 144**). Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 145**.

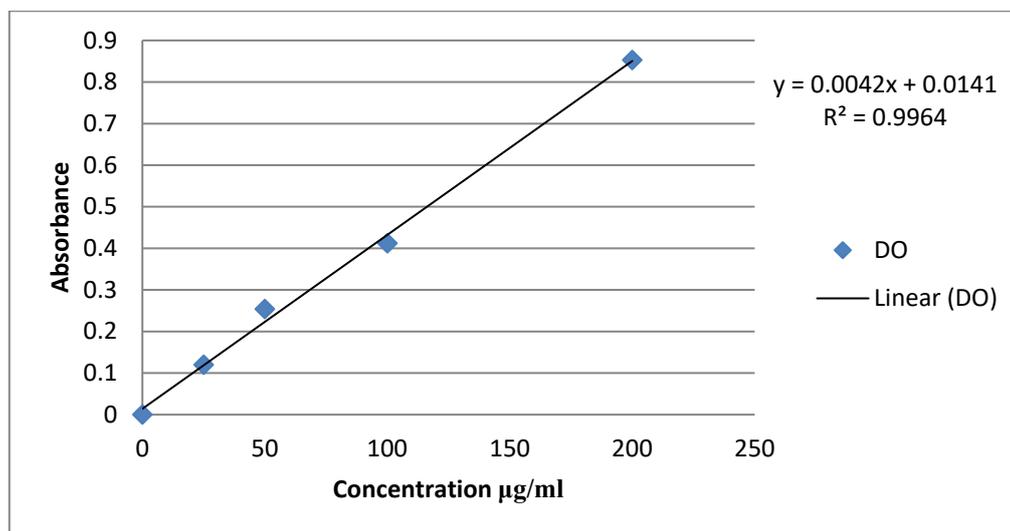


Figure 144 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des tannins hydrolysables.

Les résultats du dosage des tannins hydrolysables indiquent que le meilleur mélange par le chauffage à reflux est le méthanol/eau avec un teneur de **[39.75 $\mu\text{g/ml}$]**, pour le soxhlet, c'est le méthanol/eau avec une concentration **[45.5 $\mu\text{g/ml}$]**, par contre pour l'extraction par sonication le meilleur solvant d'extraction qui donne la teneur la plus élevée **[38.25 $\mu\text{g/ml}$]** est le mélange binaire mélange acétone/eau.

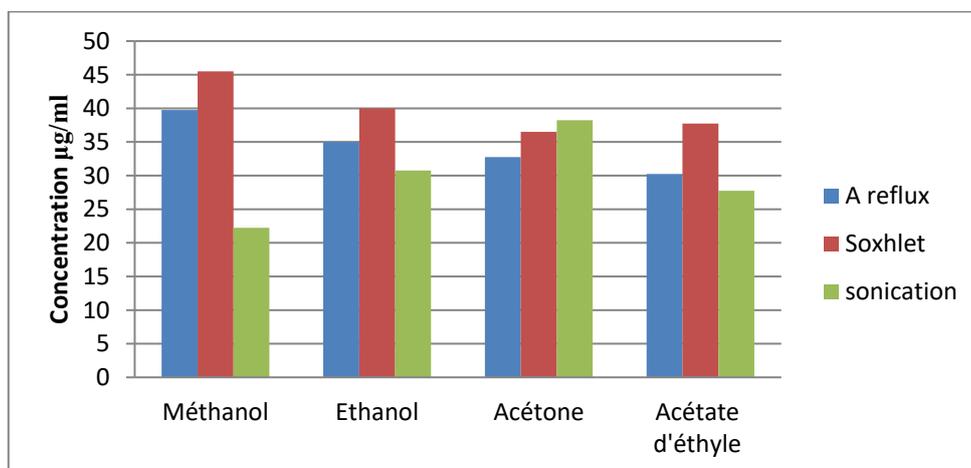


Figure 145 : Teneurs en tannins hydrolysables ($\mu\text{g EAG/mL}$) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication

Nos résultats montrent clairement que la bonne méthode d'extraction et le meilleur solvant d'extraction des tannins hydrolysables sont la méthode au soxhlet utilisant le mélange binaire méthanol/eau.

5.2. Dosage des tannins condensés

Les teneurs en tannins condensés dans nos extraits de fraises ont été réalisées par la méthode utilisant la vanilline. La catéchine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été à une longueur d'onde de 550nm. La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant les différentes concentrations de la catéchine, les résultats sont représentés dans la **figure 146**.

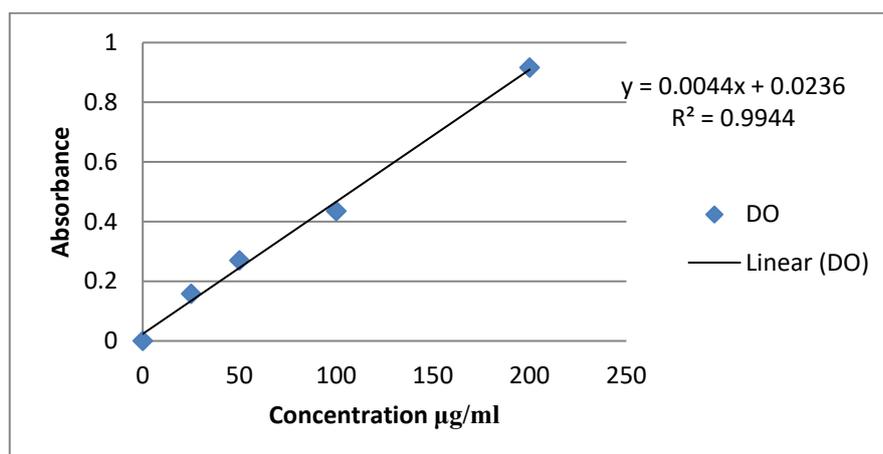


Figure 146 : courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tannins condensés.

D'après la figure 147 les résultats montrent que le chauffage à reflux donne la teneur la plus élevée en tannins condensés [**33.75µg/ml**], en utilisant le mélange binaire acétate d'éthyle/eau. Par contre en utilisant la méthode au soxhlet le mélange binaire acétone/eau donne la valeur la plus élevée [**79.5µg/ml**] comparé aux deux méthodes d'extraction sonication et reflux dont le meilleur solvant d'extraction est l'acétate d'éthyle/Eau.

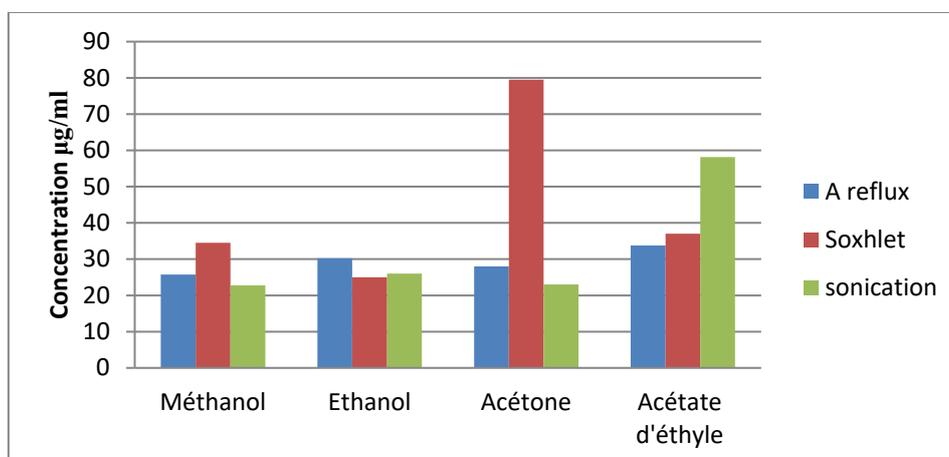


Figure 147: Teneurs en tannins condensés (µg EC/mL) dans les extraits de fraises par reflux, soxhlet et par sonication.

On peut donc conclure que, la méthode la plus sélective pour l'extraction des tannins condensés est l'extraction par soxhlet et le solvant le plus efficace est le mélange binaire acétone/eau.

6 – Evaluation de l'activité antioxydante dans les extraits de fraise

Le but de cette partie est d'observer l'évolution de l'activité antioxydante (AAO) (mesurée par le test DPPH et par FRAP). Le choix particulier de tester l'AAO par ces tests réside dans la simplicité de mise en oeuvre de ces deux méthodes et à leur bonne reproductibilité.

6.1– L'activité antioxydante mettant en jeu le radical DPPH :

L'activité antioxydante des extraits testés correspondant au pourcentage d'inhibition (PI) du radical DPPH, elle est calculée selon l'équation suivante :

$$PI (\%) = (A_0 (\text{Abs du blanc}) - A (\text{Abs de l'extrait}) \times 100) / (A_0 (\text{Abs du blanc}))$$

Ou A_0 est l'absorbance du témoin négatif ; ce dernier contient du DPPH et du méthanol sans extrait.



Figure 148 : Déroulement de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

La variabilité de l'activité antioxydante chez nos extraits de fraises en fonction du solvant mixte utilisé est indiquée dans les figures suivantes :

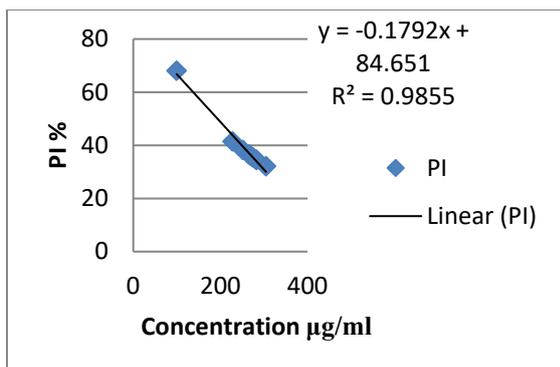


Figure 149 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanolique à reflux

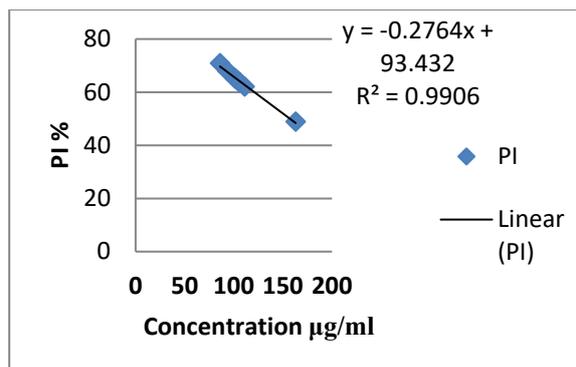


Figure 150 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanolique à reflux

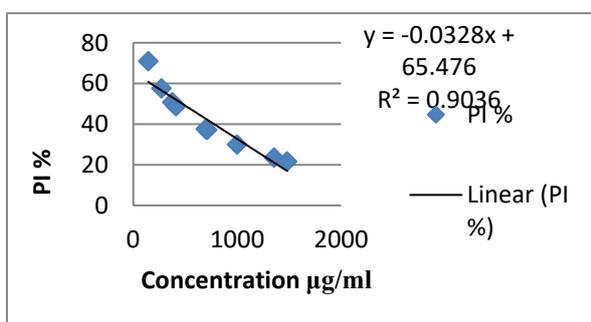


Figure 151 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétone à reflux

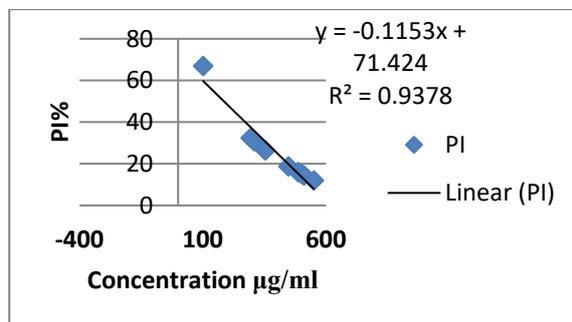


Figure 152 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétate d'éthyle reflux

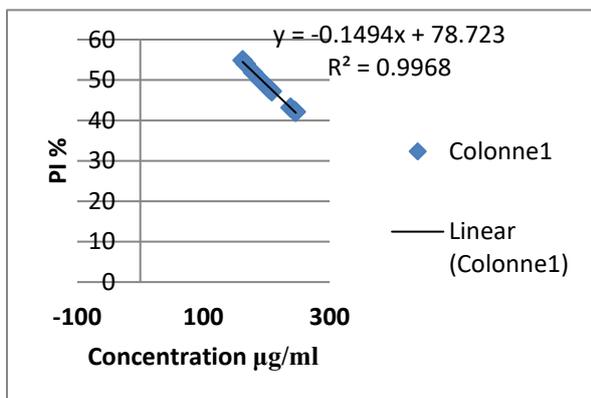


Figure 153 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanolique soxhlet

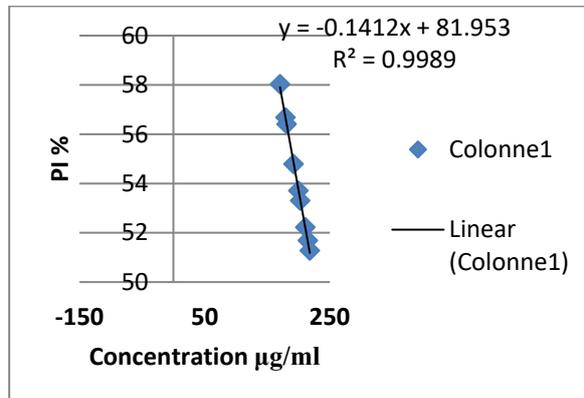


Figure 154 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanolique soxhlet

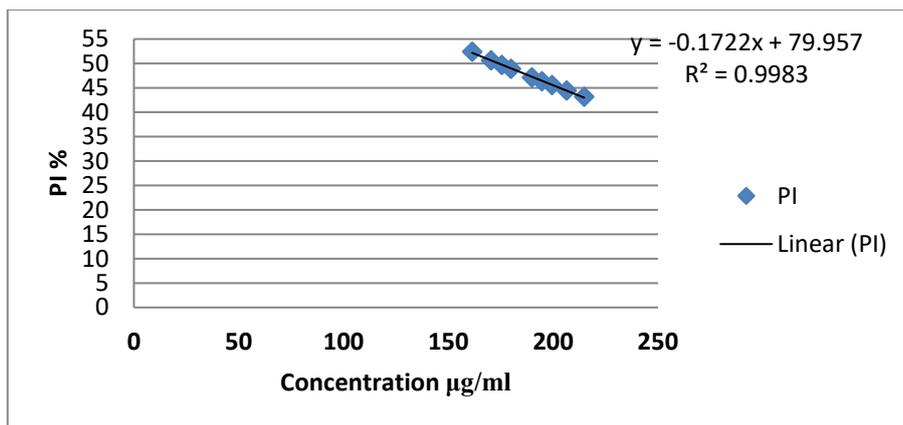


Figure 155 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétonique soxhlet

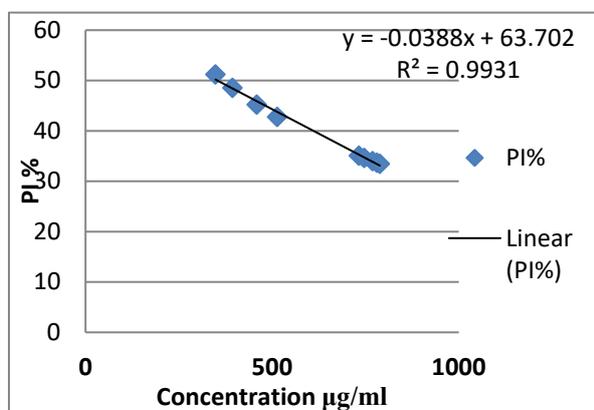


Figure 156 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydro-acétate d'éthyle

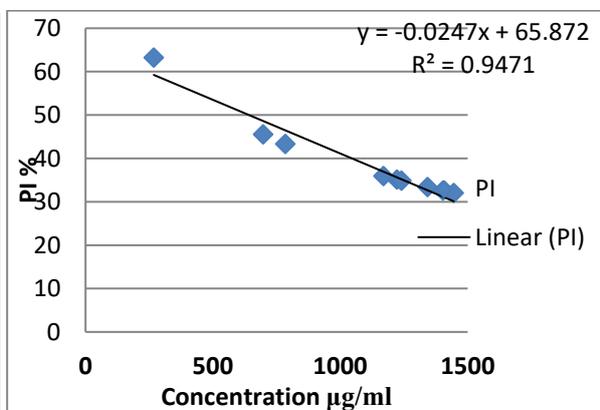


Figure 157: Pourcentage d'inhibition des extraits hydrométhanolique

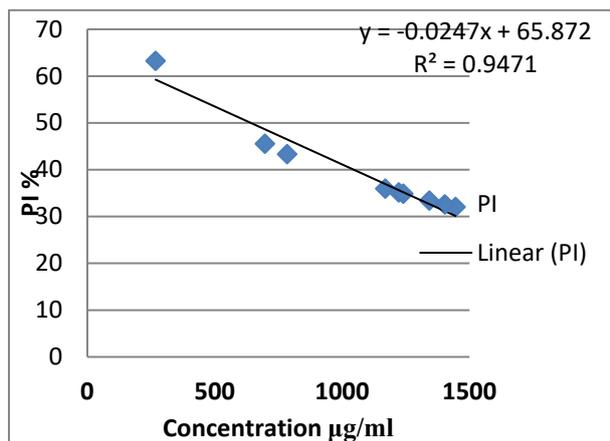


Figure 158: Pourcentage d'inhibition des extraits hydroéthanolique sonication

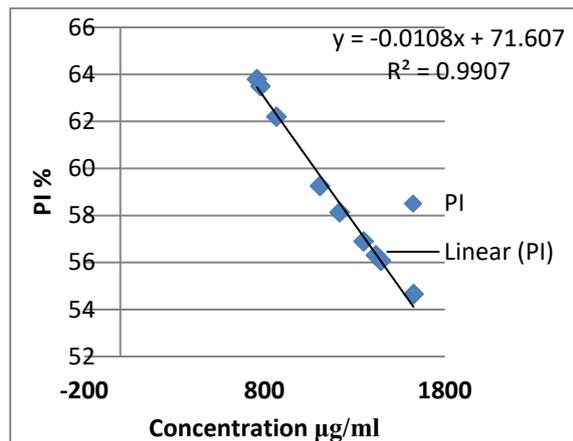


Figure 159 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétonique sonication

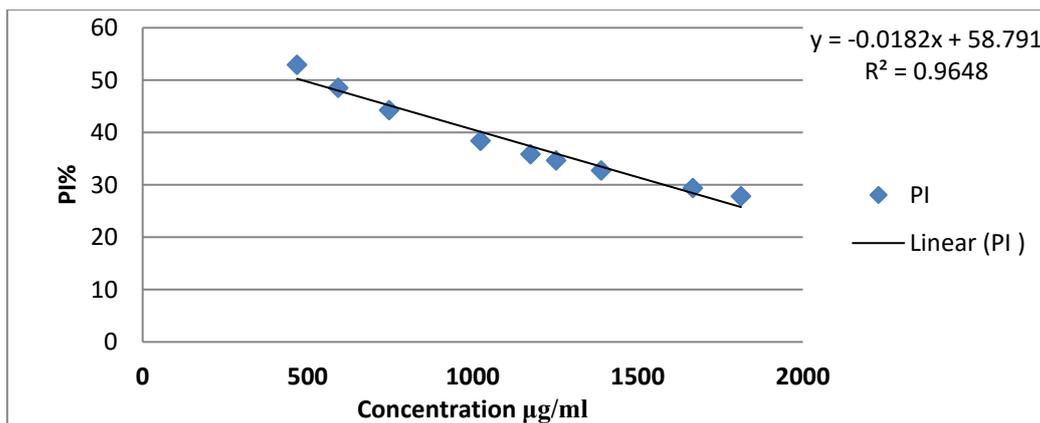


Figure 160 : Pourcentage d'inhibition des extraits hydroacétate d'éthyle sonication.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (Abadio Finco, F ;2012)

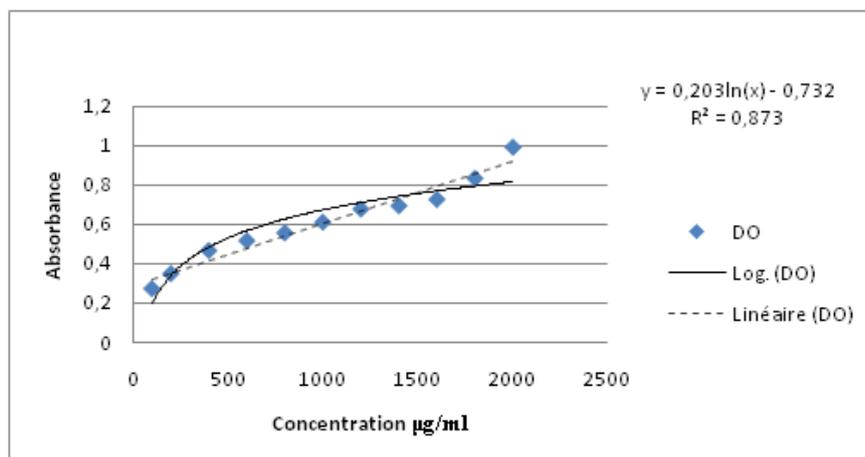


Figure 161 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'activité anti oxydante DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse (Bozin et al, 2008).

L'activité antioxydante des différents extraits est réalisée par la méthode de DPPH, l'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant de référence.

Le spectrophotomètre UV visible a permis de suivre l'activité antioxydante dans nos extraits à une longueur d'onde de 517nm.

Les résultats obtenus des activités antioxydantes de nos différents extraits sont conciliés dans le tableau 34. Les valeurs relatives de la IC₅₀ de chaque extrait ont alors été évaluées par rapport à celle déterminée dans le cas de la vitamine C, pour lequel une valeur de **136.25**

$\mu\text{g/ml}$ a été mesurée. On rappelle que la IC_{50} représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux présents.

Tableau 34 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction à reflux.

Solvant	Absorbance	DPPH (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)
Méthanol/Eau	0.278-0.750	157.32
Éthanol /Eau	0.202-0.429	193.57
Acétone/Eau	0.172-0.302	483.43
Acétate d'éthyle/Eau	0.206-0.549	186.26

Tableau 35 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction par soxhlet.

Solvant	Absorbance	DPPH (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)
Méthanol/Eau	0.301-0.386	192.75
Ethanol/Eau	0.311-0.861	226.59
Acétone/Eau	0.300-0.358	174.12
Acétate d'éthyle/Eau	0.456-0.622	360.52

Tableau 36 : Variation des activités antioxydantes en fonction du solvant par la méthode d'extraction par sonication.

Solvant d'extraction	DPPH (IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)
Méthanol/Eau	378.33
Éthanol/Eau	661.25
Acétone/Eau	216
Acétate d'éthyle/Eau	488.33

Nos résultats, indiquent que :

L'extrait hydroacétonique (acétone/eau) a montré un pouvoir de piéger le DPPH un peu plus important que celui des autres extraits méthanol/eau, éthanol/eau et acétate d'éthyle/eau concernant l'extraction par chauffage à reflux.

L'extrait hydroéthanolique (éthanol/eau) a montré un pouvoir de piéger le DPPH un peu plus important que celui des autres extraits méthanol/eau, acétone/eau et acétate d'éthyle/eau pour la méthode d'extraction par soxhlet.

L'extrait hydroacétonique (acétone/eau) a montré un pouvoir de piéger le DPPH un peu plus important que celui des autres extraits méthanol/eau, éthanol/eau et acétate d'éthyle/eau pour la méthode d'extraction par sonication.

Nous constatons que les composés phénoliques contenus dans la fraise, sont doués d'un pouvoir antioxydant important.

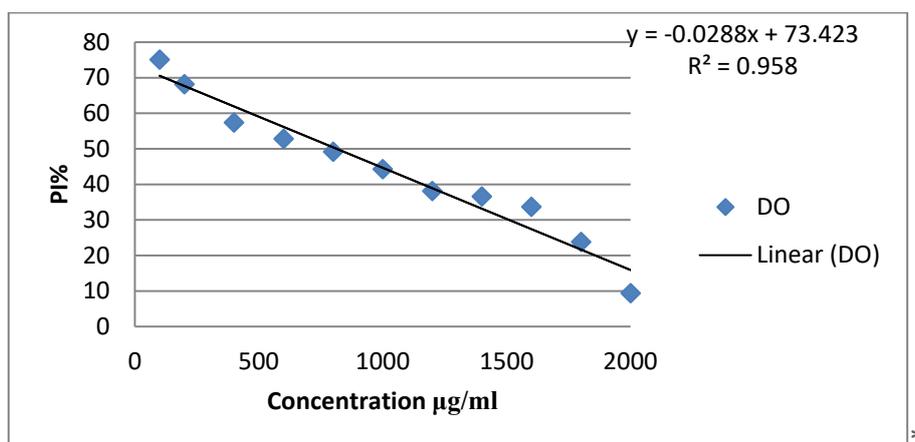


Figure 162 : Pourcentage d'inhibition de DPPH dans le cas l'acide ascorbique

6.2 – Calcul de la concentration inhibitrice IC50

La concentration d'inhibition IC50 (µg/mL) qui correspond à la concentration de l'extrait des fraises où l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé.

On calcule la concentration d'inhibition IC50 de l'acide ascorbique graphiquement avec la formule de la régression des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits.

A partir de la figure nous avons calculé les IC50 de chaque extrait dont celle de la vitamine C. Les valeurs des IC50 obtenus pour les extraits sont variables et dont les valeurs sont exprimées en µg/ml.

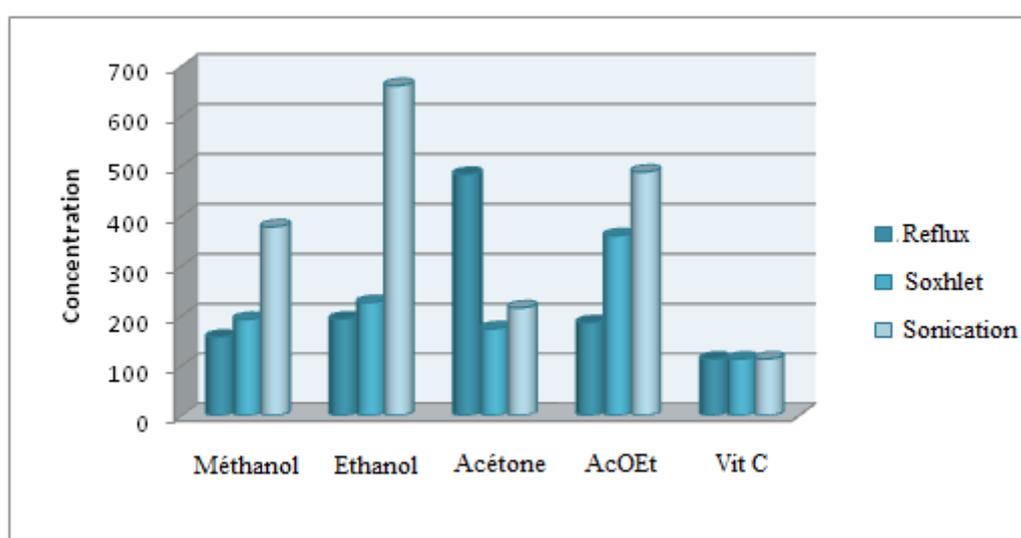


Figure 163 : Histogramme de la concentration inhibitrice IC50 des extraits de fraises et de Vitamine C

Nos résultats révèlent que l'activité antioxydante est significativement influencée par la nature du solvant et par la méthode d'extraction. La concentration inhibitrice IC₅₀ de vitamine C est égale à 136.25µg/ml.

Dans notre cas les IC₅₀ de nos extraits de fraises sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 37 : Variation des IC₅₀ des différents extraits de fraises et de Vit C

Méthode d'extraction	Solvant d'extraction	DPPH IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ Vit C µg/mL
Extraction par reflux	– Méthanol/eau	157.32µg/ml	136.25 µg/ml
	– Ethanol/eau	193.57µg/ml	
	– Acétone/eau	483.43µg/ml	
	– Acétate d'éthyle/eau	186.26µg/ml	
Extraction par soxhlet	– Méthanol/eau	192.75µg/ml	136.25 µg/ml
	– Ethanol/eau	226.59µg/ml	
	– Acétone/eau	174.12µg/ml	
	– Acétate d'éthyle/eau	360.52µg/ml	
Extraction par sonication	– Méthanol/eau	378.33µg/ml	136.25 µg/ml
	– Ethanol/eau	661.25µg/ml	
	– Acétone/eau	216µg/ml	
	– Acétate d'éthyle/eau	488.33µg/ml	

D'après les valeurs précédentes, l'extrait hydro-acétonique présente une IC₅₀ plus élevée par rapport aux autres solvants pour l'extraction à reflux, en parallèle avec l'extrait hydro-acétate d'éthyle par la méthode d'extraction au soxhlet et pour l'extraction assistée par sonication, le plus important mélange est l'extrait hydro-éthanolique.

On remarque que les différents extraits présentent une forte capacité à piéger le radical DPPH avec des valeurs de la IC₅₀ allant de 157.32 à 483.43µg/ml pour l'extraction par chauffage à reflux et de 174.12 à 360.52µg/ml pour l'extraction par soxhlet et de 216 à 661.25µg/ml. Par ailleurs, les extraits à l'acétone (70%) et le méthanol (70%) ont montré les activités antiradicalaires les plus importantes en affichant les IC₅₀ les plus faibles de l'ordre de 174.12 µg/ml et 216 µg/ml pour la méthode d'extraction par sonication et 157.32 et µg/ml, pour le chauffage à reflux respectivement. De plus, ces activités sont nettement plus fortes comparées à la Vit C et qui présente une IC₅₀ égale à 136.25 µg/ml.

Ceci nous amène à considérer les fraises comme une importante source d'antioxydants naturels. Cela justifie sa grande consommation dans divers pays et l'intérêt porté par les consommateurs vis-à-vis de ce fruit.

6.3 – Détermination de l'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

6.3.1 – Détermination de l'activité antioxydante par le pouvoir réducteur du fer (FRAP) dans la chair de fraise

L'activité antioxydante des différents extraits de fraise de la variété *fragaria vesca* à été évaluée par la méthode du pouvoir réducteur du fer (FRAP). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Elle est universelle et peut être appliquée aussi bien chez les plantes et pour les extraits organiques et aqueux (Li et al ; 2008). Elle est basée sur la capacité des antioxydants dans les extraits bruts des végétaux à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 700 nm et l'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant de référence (figure 154).

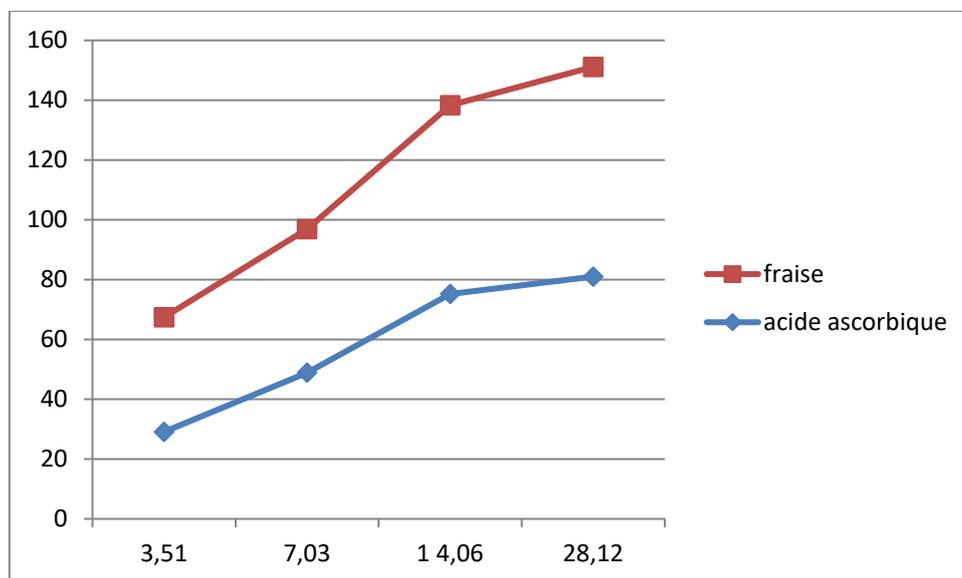


Figure 164: La capacité de réduction du fer pour la chair de fraise et pour l'acide ascorbique.

6.3.2 – Détermination de l'activité antioxydante des différents extraits de fraise.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous.

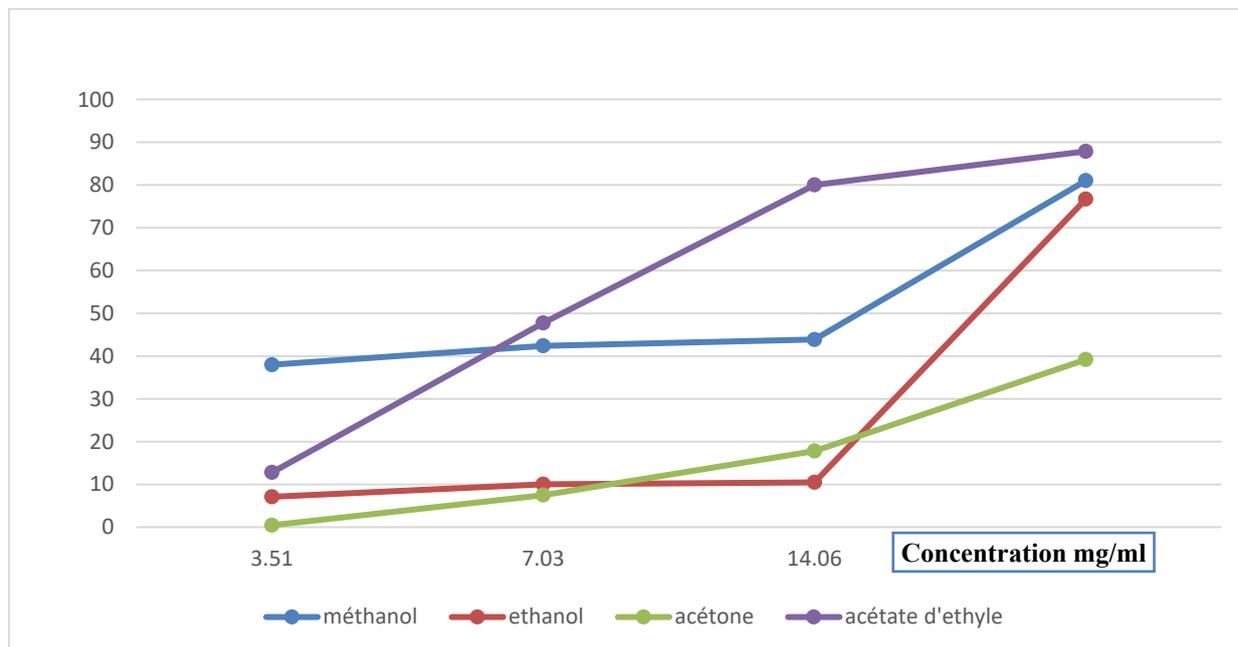


Figure 165: La capacité de réduction du fer par les différents extraits.

Le calcul de l'activité antiradicalaire des extraits testés correspondant au pourcentage d'inhibition (PI) est donné par la formule suivante :

$$PI\% = \frac{(Abs_{blanc} - Abs_{échantillon}) \times 100}{(Abs_{blanc})}$$

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et figure ci-dessous :

Tableau 38: les valeurs d'IC50 et pouvoir antiradicalaire des extraits de fraise.

	IC50	ARB (1 / IC50)
Acide ascorbique	8,80	0,113
Chair de fraise	9,22	0,108
Extrait hydrométhanolique	12,43	0,08
Extrait hydroéthanolique	21,48	0,046
Extrait acétone -eau	34,98	0,028
Extrait acétate d'éthyle-eau	17,55	0,056

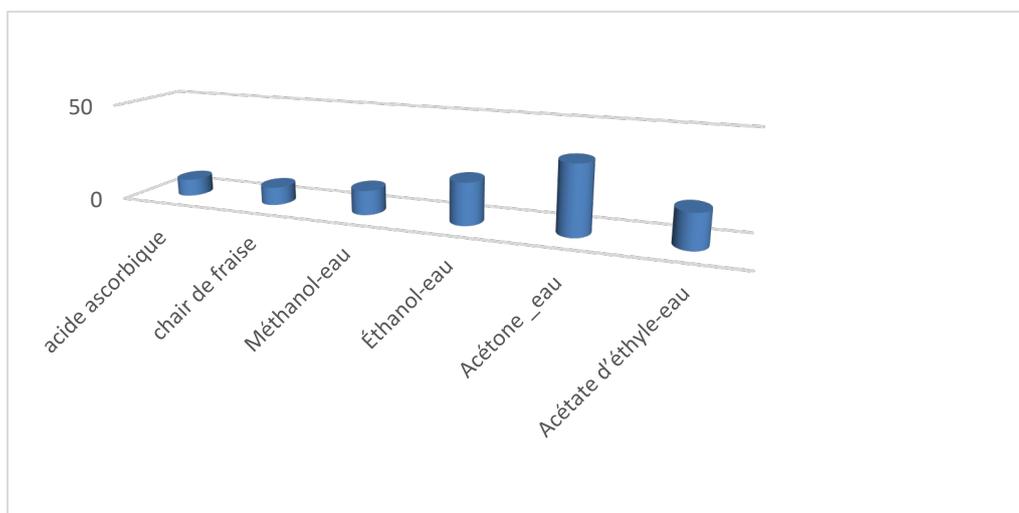


Figure 166 : les valeurs de la IC50 des différents extraits de fraise et acide ascorbique.

La chair de fraise a un pouvoir réducteur plus élevé que les extraits de fraise par les différents solvants utilisés. La variabilité de l'activité antioxydante chez les extraits de fraise en fonction du solvant utilisé est indiquée dans la figure 156. Les résultats révèlent que l'activité antioxydante chez les extraits de fraise est significativement influencée par la nature du solvant d'extraction. On remarque que les différents extraits présentent une forte capacité à réduire le fer avec des valeurs de la CI_{50} allant de 12.43 mg/ml à 34.98 mg/ml. Par ailleurs, les extraits au méthanol 80%, à l'acétate d'éthyle 80% ont montré les activités antiradicalaires les plus importantes en affichant les CI_{50} les plus faibles de l'ordre de 12.43 et 17.55 mg/ml, respectivement. Par contre, l'extrait hydro-éthanolique et hydro-acétonique ont enregistré une capacité réductrice relativement faible.

Le pouvoir réducteur des extraits de notre fruit de fraise est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron.

7 – Conclusion

Durant cette étude, l'influence du solvant et de la méthode d'extraction a été observée sur les teneurs en antioxydants naturels ainsi que sur les composés phénoliques et l'évaluation de leur activité antioxydante dans la fraise, un fruit largement cultivé en Algérie.

Les échantillons ont d'abord été préparés puis subi une extraction par des solvants de polarité différente, ce qui a permis de déterminer l'affinité des composés phénoliques pour le solvant utilisé ainsi que la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins.

Nous avons déterminé quantitativement, dans un premier temps, la teneur en composés phénoliques dans des extraits hydrométhanoliques, hydroéthanoliques, hydroacétoniques et hydroacétatiques ; obtenus par un assemblage entre des méthodes classiques (chauffage à reflux, soxhlet) et d'autres modernes telles que l'extraction assistée par ultrasons (sonication), l'étude de l'activité antioxydante (test DPPH et FRAP) a été aussi évaluée au cours de ce travail.

Les résultats obtenus montrent d'une part que l'extrait hydro-acétonique a présenté le rendement le plus élevé pour les polyphénols totaux et les tannins condensés, par contre les extraits hydro-éthanoliques et hydro-méthanoliques ont montré les rendements les plus élevés concernant les flavonoïdes et les tannins hydrolysables respectivement. D'autre part les méthodes d'extraction par sonication et par soxhlet sont classées comme les méthodes les plus sélectives pour l'extraction des flavonoïdes, des tannins hydrolysables et condensés, suivi par la méthode d'extraction par chauffage au reflux concernant les polyphénols totaux.

De plus, la fraise s'est avérée riche en composés phénoliques principalement les polyphénols totaux. En effet les analyses quantitatives de nos extraits ont montré des résultats importants pour le dosage des flavonoïdes et les tannins.

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a montré que les valeurs des IC50 sont élevées par rapport à celles trouvées pour la vitamine C.

Enfin, nous pouvons conclure que les fraises sont de bonnes sources d'antioxydants principalement les composés phénoliques possédant un pouvoir antioxydant important, la chose qui nous amène à dire que les fraises peuvent contribuer à prévenir les maladies cardiovasculaires, les cancers et les problèmes liés au vieillissement causées par le stress oxydant.

A l'issue de ce travail, on a montré que la fraise *fragaria vesca* exhibe une activité antioxydante plus ou moins élevée mise en évidence via différents systèmes (solvants et méthodes d'extraction). De plus, la fraise s'est avérée riche en composés phénoliques principalement des polyphénols totaux et des flavonoides. Notre étude a révélé que la sonication est la méthode adéquate pour extraire les composés antioxydants de ce fruit. Des travaux sont nécessaires pour isoler et identifier les composés responsables de cette activité antioxydante élevée. En effet, il serait très intéressant de pousser cette étude afin de déterminer les principes composés phénoliques responsables de cette activité antioxydante, pour une meilleure utilisation de ce fruit dans l'alimentation, et afin de lutter contre certaines pathologies liées au stress oxydatif.

**3^{EME} PARTIE : DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE
DE LA CATECHINE ET DE LA VITAMINE C ET IDENTIFICATION
DES MINERAUX PAR XRF**

1 - Analyse et caractérisations de la solution référence (Catéchine-méthanol)

Nous rappelons que le dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Vis d'une substance chimique, tel que la catéchine, dissoute dans un liquide comme l'extrait de fraise, nécessite à faire apparaître dans le spectre d'absorption de l'extrait de fraise au moins un des pics d'absorption de la catéchine même si l'extrait est dilué à plusieurs fois.

Tout d'abord, cette étude deviendrait très avantageuse si le pic d'absorption de la catéchine est considéré comme le pic le plus sensible des pics d'absorption de l'extrait de fraise dilué. Une étude spectrale a été effectuée pour caractériser, optiquement, la catéchine ainsi l'extrait de fraise à plusieurs dilutions.

1.1 - Analyse spectrale de la solution référence

La solution référence (Catéchine-méthanol) préparée a été analysée avec le spectrophotomètre d'absorption optique à double faisceau optique (**UV-3600i Plus UV-Vis-NIR**). La concentration initiale employée était à 0.2 mg/50 ml. La résolution spécifique de l'absorption de la catéchine dissoute dans le méthanol à différentes concentrations a été établie, figure 154.

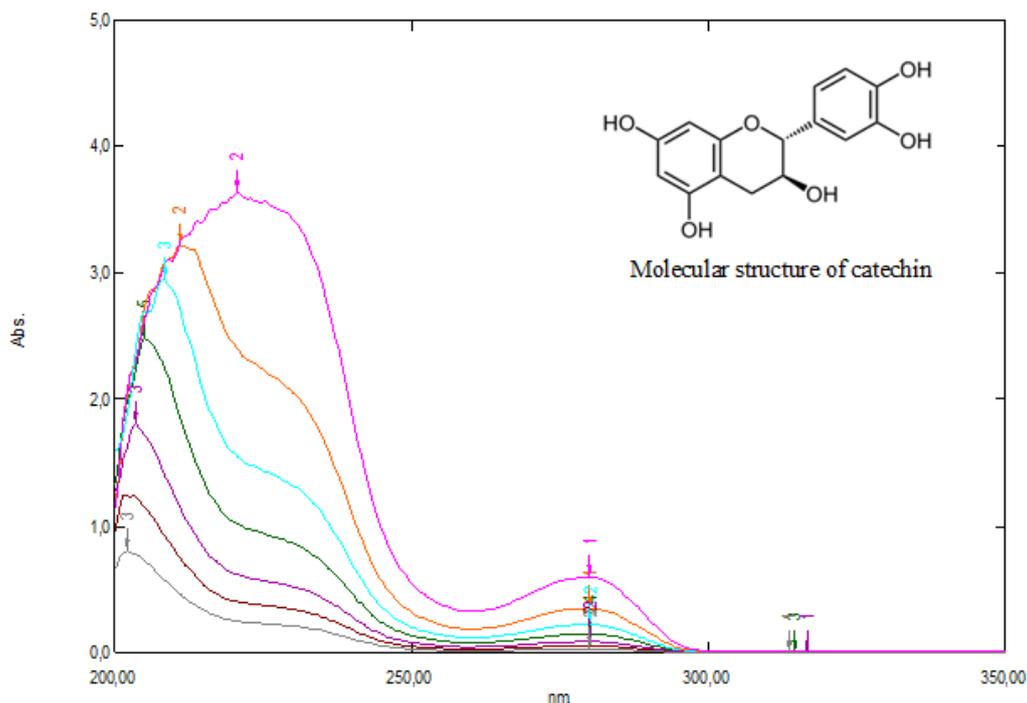


Figure 167 : Spectres d'absorption optique de la catéchine dissoute dans le méthanol.

Selon cette présentation spectrale, on constate que la catéchine a deux importantes absorptions. La première absorption est la plus sensible et se situe à 222 nm, environ, lorsque la concentration est à l'état initial (13,8 $\mu\text{mol/l}$). Elle devenait variable au fur et à mesure avec la dilution. Par contre, la deuxième absorption optique du catéchine est observée à environ 276 nm. Cette dernière est pratiquement, stable en longueur d'onde lorsque la concentration est variable, mais à cause de la très faible sensibilité de mesure au niveau de cette longueur d'onde, la quantité de catéchine ne peut pas être suivie précisément.

Le déclin spectral de la première absorption se déplace vers la gauche et diminue en intensité d'absorption au fur et à mesure avec la diminution de la concentration. Un tableau récapitulatif rassemble les données de ce déplacement spectral.

Tableau 39 : Caractérisation du pic le plus sensible du spectre d'absorption de la catéchine dissout dans le méthanol.

Longueurs d'onde (nm)	Concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Absorbance
222	13.8	3.6
212	6.89	3.2
208.5	3.45	2.9
205	1.72	2.5
203	0.861	1.8
203	0.431	1.2
203	0.215	0.8

Ce tableau de valeurs a été dressé selon les résultats affichés par le logiciel Lab-solution de l'appareil d'analyse Spectrophotomètre UV-Vis-Nir 3600 plus (Schimadzu) à double faisceau assisté par ordinateur. Les valeurs des concentrations sont des dilutions de la solution originale catéchine-méthanol. De ces analyses spectrales, on constate que le déplacement du spectre d'absorption s'arrête, exactement, à 203 nm dont la concentration est égale à 0.861 $\mu\text{mol/l}$. Au dessous de cette concentration considérée limite (C_L), la loi de Beer-Lambert est applicable, parce que le coefficient d'extinction ne dépend pas de la longueur d'onde absorbée.

Puisque la haute sensibilité est enregistrée au niveau du premier spectre, en particulier avec les concentrations considérables, une étude numérique est effectuée par la suite au niveau de

ce déclin spectral dont l'absorbance dépendait aussi de la longueur d'onde dans le but de rendre le dosage du catéchine possible, malgré le déplacement spectrale du pic vers la gauche.

1.2 – Caractérisation à des très faibles concentrations

Il est connu que l'absorbance diffère selon la nature de la substance étudiée, la longueur d'onde sous laquelle elle est analysée, et selon la concentration de cette substance dans le milieu traversé par la source optique monochrome.

En observant, la figure précédente, nous concluons que lorsque la concentration est inférieure à une concentration limite (C_L), le spectre d'absorption se stabilise à une longueur d'onde égale à 203 nm, et la loi de Beer – Lambert est appliquée.

Théoriquement, selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance dépend, seulement, de la concentration de la substance à analyser si le trajet optique est fixé pour une solution très diluée, et le coefficient d'extinction deviendrait dépendant que de la nature chimique de la substance à doser et le solvant employé. On note ceci dans la relation de Beer-Lambert suivante et qui va être considérée par la suite comme référence à la concentration limite déterminée auparavant :

$$A_{B.L} = A_{ref} = \varepsilon_0 C l \quad (1)$$

$A_{B.L}$: Absorbance de Beer-Lambert

ε_0 : Coefficient d'extinction du spectre d'absorption à la longueur d'onde λ_0 égale à 203 nm.

C : Concentration de la substance analysée en mole par litres

λ_0 : Longueur d'onde absorbée par la solution égale à 203 nm, dans notre cas

l : Trajectoire linéaire de la lumière à travers la solution.

Nous rappelons que l'utilisation de cette relation pour la catéchine n'est valable, que lorsque la solution à analyser, a une concentration inférieure à la concentration limite fixée à 0.86 $\mu\text{mole/l}$ et λ_{max} égale à 203 nm. Cette constatation a été prise d'après les résultats expérimentaux du tableau 1. Plus la concentration est faible plus l'absorbance est diminuée.

Le tracé de nos résultats expérimentaux, pour des faibles concentrations dont λ_{max} est fixée à 203 nm, a donné un coefficient d'extinction (ε_0) égal à $1,52 \cdot 10^{+6} \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, (figure 155).

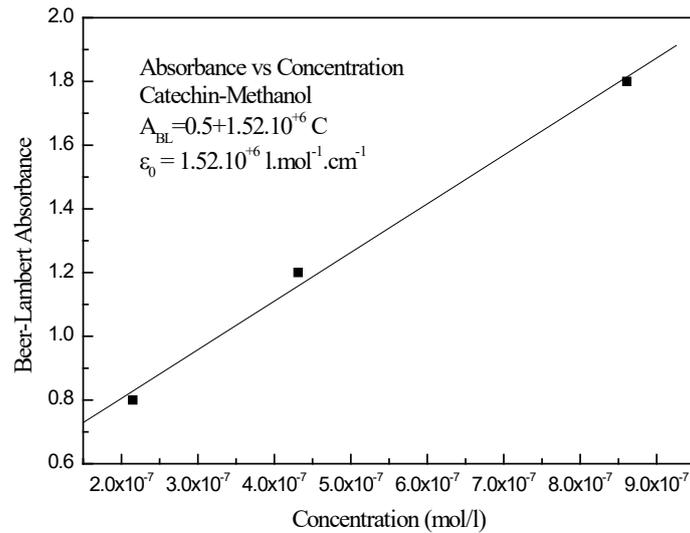


Figure 168 : Absorbance en fonction de la concentration de la solution catéchine-méthanol à très faibles concentrations (λ_{\max} constante).

Pour confirmer l'ordre de grandeur de cette valeur obtenue, nous allons étudier l'effet du déplacement du spectre d'absorption à des concentrations supérieures à la concentration limite (C_L). L'absorbance dépend, simultanément, de l'effet concentration et longueur d'onde absorbée.

1.3 – Caractérisation à des concentrations élevées

Une étude théorique est accomplie sur le déplacement du pic le plus sensible du catéchine afin de constater l'effet de la longueur d'onde d'absorption avec la concentration sur l'absorbance.

A la concentration initiale préparée de catéchine (0.2 mg/50 ml), figure 1, un large spectre optique est détecté dont le maximum d'absorption était à 222 nm, environ. Ensuite, le déclin spectral s'éteint en intensité d'absorption et se penche, en même temps, vers la gauche. Il s'agit d'un déplacement non linéaire du spectre vers les courtes longueurs d'onde.

On remarque aussi qu'à des fortes concentrations, le pic le plus sensible du catéchine est déformé sous forme d'un large spectre. Par contre, il devient représentatif et spécifique à des faibles concentrations.

En considérant la nature chimique de la substance à analyser est connue, nous allons inclure l'effet de la longueur d'onde avec le coefficient d'extinction sous la notation ($\epsilon(\lambda)$). En conséquence, la relation de Beer-Lambert prenait la nouvelle forme suivante :

$$A = \epsilon(\lambda) C l \quad (2)$$

$\varepsilon(\lambda)$: Coefficient d'extinction en fonction de la nature chimique du soluté, solvant et aussi de la longueur d'onde.

Ce coefficient d'extinction du catéchine à des concentrations plus ou moins importantes est le produit du coefficient d'extinction (ε_0) de cette substance à très faibles concentrations lorsque la longueur d'onde est fixe à 203 nm et une fonction mathématique à déterminer, notée $f(\lambda)$.

$$\varepsilon(\lambda) = \varepsilon_0 f(\lambda) \quad (3)$$

Pour mieux observer l'effet de la longueur d'onde sur le coefficient d'extinction à des concentrations élevées et avoir, en même temps, une idée sur le type de relation entre eux, nous allons combiner entre les relations 2 et 3 et écrire la forme suivante :

$$\varepsilon(\lambda) = \frac{A}{A_{BL}} = \frac{A}{\varepsilon_0 C l} = f(\lambda) \quad (4)$$

Les résultats expérimentaux, présentés dans le tableau 1, ont été exploités selon la dernière relation mathématique où la trajectoire optique de la cuve est à 1 cm, seulement. Pour mieux observer l'effet longueur d'onde, nous n'avons pris en considération que les absorbances enregistrées avec changement de la longueur d'onde, de 222 nm jusqu'à 203 nm. La figure 156 exprime cette variation.

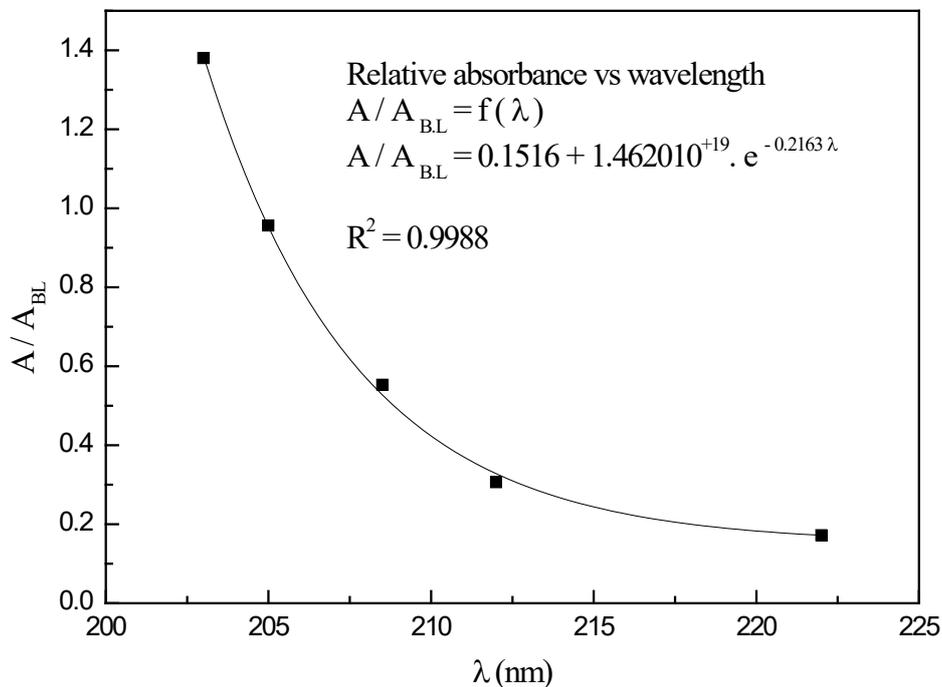


Figure 169 : Absorbance relative en fonction de la longueur d'onde de la solution catéchine-méthanol à très des concentrations importantes.

Selon cette présentation graphique, le coefficient d'extinction devient indépendant de la longueur d'onde à 203 nm, environ. En plus la forme de la courbe présentée exprime le cas exponentiel entre le coefficient d'extinction et la longueur d'onde. De ce fait et pour mieux exploiter nos résultats expérimentaux, nous écrivons d'une manière générale la relation mathématique suivante :

$$\epsilon(\lambda) = \alpha + \beta e^{-\gamma\lambda} \quad (5)$$

Où les paramètres α , β et γ sont les coefficients de la relation. Le paramètre (α) est indépendant de la longueur d'onde. Il présente le coefficient d'extinction de Beer-Lambert (ϵ_0). Par contre, une analyse adimensionnelle nous laisse constater que l'unité du paramètre (γ) est l'inverse de l'unité de la longueur d'onde. Par contre, le coefficient (β) est sans unité.

Pour déterminer ces coefficients et confirmer cette proposition mathématique, nous devons effectuer une simulation de nos données expérimentales, citées auparavant dans le tableau 1, en vérifiant la formule mathématique par le logiciel Origin.

Une reformulation de la relation 4 peut être présentée comme suivant :

$$A = \epsilon_0 C l (\alpha + \beta e^{-\gamma\lambda}) \quad (6)$$

En comparant cette relation avec celle présentée sur la figure 156, ainsi la valeur du coefficient d'extinction (ϵ_0), déterminé auparavant de la figure 155, nous déduisons les valeurs des coefficients, respectivement, 0.1516, $1.4620 \cdot 10^{+19}$ et 0.2164 nm^{-1} . La relation de l'absorbance optique en fonction des deux paramètres (C , λ) peut être reformulée de la manière suivante :

$$A = \epsilon_0 C l (0,1516 + 1,4620 \cdot 10^{+19} e^{-0.2164\lambda}) \quad (7)$$

Si nous remplaçons la valeur du coefficient d'extinction par sa valeur trouvée auparavant, $1,52 \cdot 10^{+6} \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, et l'épaisseur de la cuve d'analyse par 1 cm, la relation précédente prend la forme suivante :

$$A = (0,23 + 2,22 \cdot 10^{+19} e^{-0.2164\lambda}) \cdot C \quad (8)$$

Autrement le coefficient d'extinction à des concentrations élevées soit déterminé par la formule suivante :

$$\epsilon(\lambda) = 0,23 + 2,22 \cdot 10^{+19} e^{-0.2164\lambda} \quad (9)$$

Apparemment, le dosage de la substance chimique telle que la catéchine exige une double connaissance paramétrique, les valeurs de l'absorbance et la longueur d'onde absorbée. Nous rappelons que cette relation n'est valable que pour des longueurs d'onde supérieures ou égales à 203 nm.

Si nous constatons bien cette dernière relation mathématique, on conclut que le coefficient d'extinction (ϵ) à des concentrations élevées dépend du coefficient d'extinction (ϵ_0), qui dépendait de la nature chimique du soluté et du solvant, et d'un exponentiel décroissant de la longueur d'onde (λ) absorbée. Afin de doser la catéchine dans un extrait de fraise, une procédure de travail pratique serait proposée, ci-dessous.

1.4 – Analyse spectrale de l'extrait de fraise

Des analyses par spectrophotométrie d'absorption optique de l'extrait de fraise préparé à plusieurs dilutions ont été effectuées. L'intervalle de longueurs d'onde balayé est entre 195 nm et 600 nm, (figure 170).

Le spectre mère de l'extrait de fraise est celui en couleur noir. On constate de ce spectre différents absorptions optiques complexes, difficile à les distinguer. Ceci laisse remarquer que l'extrait est plus ou moins complexe dans sa composition chimique.

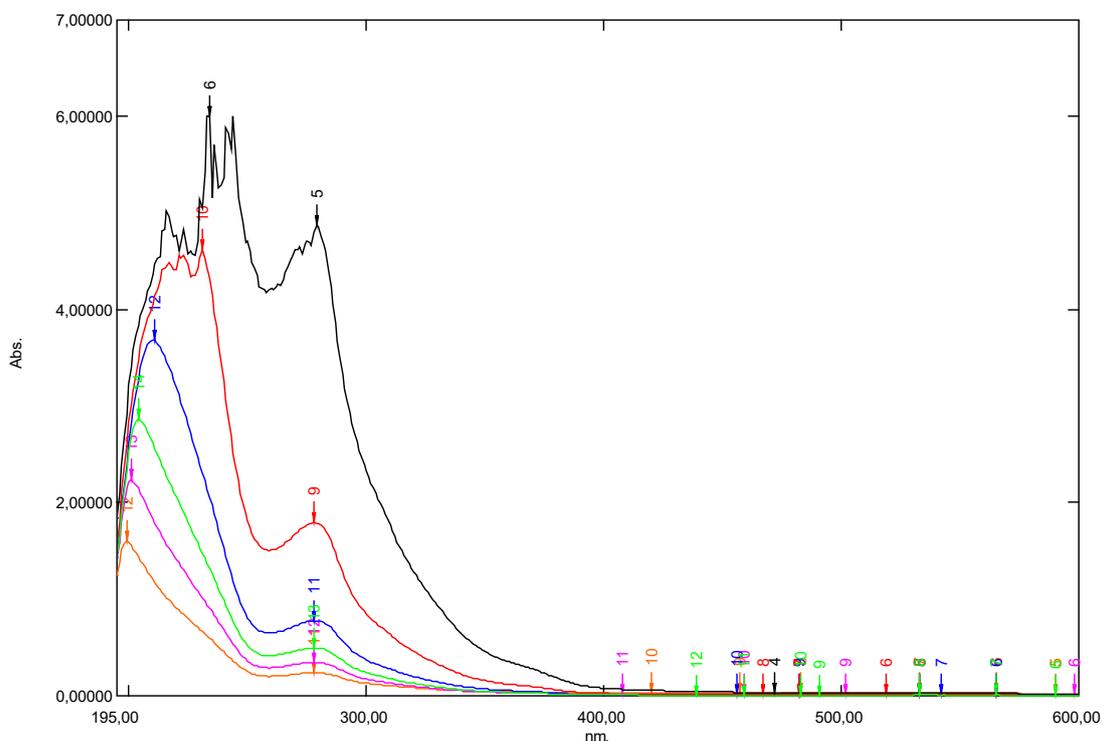


Figure 170 : Spectres d'absorption optique de l'extrait de fraise préparé à plusieurs dilutions.

On constate de la première dilution (1/3), présentée par le spectre rouge, une légère distinction spectrale. Cette nouvelle forme spectrale obtenue est due à l'extinction brutale de certaines absorptions optiques des composés chimiques de l'extrait, en particulier ceux qui ont des coefficients d'extinction de valeurs considérables par rapport au coefficient d'extinction du catéchine. La deuxième dilution (1/9), présentée par le spectre bleu. A cette dilution, la

forme spectrale est devenue très spécifique. Seulement, deux longueurs d'onde sont présentées. Une longueur d'onde fixe à environ 276 nm quel que soit la dilution et une longueur d'onde variable avec la dilution égale à 211 nm.

La troisième dilution (1/18), présentée par le spectre vert. La nouvelle forme spectrale obtenue est toujours très spécifique avec deux longueurs d'onde de même forme que ceux du spectre précédent. Une longueur d'onde fixe à environ 276 nm quel que soit la dilution et une longueur d'onde variable avec la dilution égale à environ 205 nm. Apparemment, le coefficient d'extinction du catéchine, dans l'extrait de fraise, est le moins faible en valeur par rapport aux coefficients d'extinction des autres substances chimiques de l'extrait de fraise. Une comparaison spectrale sera présentée par la suite pour prouver et confirmer, qu'à une certaine dilution, la possibilité du dosage de la catéchine dissous dans l'extrait de fraise.

1.5 – Comparaison spectrale entre l'extrait de fraise et la solution catéchine

Pour montrer la possibilité du dosage du catéchine dans l'extrait de fraise par absorption optique dans l'UV-Vis, nous avons effectué une comparaison en forme et évolution spectrale de deux solutions. Une solution préparée catéchine-méthanol, considérée comme solution de référence et une deuxième solution qui est l'extrait de fraise qui contient un certain pourcentage de catéchine.

Le but de cette comparaison est de prouver qu'à une certaine dilution de l'extrait, l'absorption optique du catéchine domine sur l'ensemble des absorptions optiques des autres substances chimiques de l'extrait.

Selon la figure 157, nous avons conclu que les coefficients d'extinction spécifiques de la composition chimique de l'extrait sont très élevés par rapport à celui du catéchine. A une certaine dilution de l'extrait, nous avons constaté une spécificité spectrale semblable à celle du catéchine en forme et en nombre de pics. Nous rappelons que la solution catéchine a deux pics d'absorptions, figure 154. Un pic à 276 nm, fixe en longueur d'onde quel que soit la dilution et de très faible absorption (sensibilité faible) et un pic d'absorption de longueurs d'onde variable avec la concentration mais de très haute sensibilité. Ce pic d'absorption a pris sa première longueur d'onde variable à 222 nm, lorsque la concentration était à 13,6 $\mu\text{mol/l}$, puis elle a commencée à diminuer proportionnellement avec la concentration jusqu'à la longueur d'onde 203 nm.

Nous avons constaté, aussi, qu'à partir de cette longueur d'onde, l'absorption obéit seulement à la concentration et la loi de Beer-Lambert est vérifiée. Les mêmes symptômes spectraux du

catéchine après une certaine dilution de l'extrait de fraise ont été obtenus : Le spectre d'absorption contient aussi deux absorptions. Un pic d'absorption à 276 nm qui ressemble à celui du catéchine et un deuxième pic de longueur d'onde variable avec la concentration. Cette évolution spectrale a été vérifiée en comparant, par dilution, la variation du coefficient d'extinction (ϵ) de la solution diluée de l'extrait en fonction de la longueur d'onde avec celle de la solution catéchine, car le coefficient d'extinction est le seul témoin sur la spécificité chimique de la substance, car si le coefficient de l'extrait dilué est semblable en valeur à celui du catéchine, ceci veut dire que ce dernier est dominant, par analyse optique, et son dosage dans l'extrait deviendrait possible, mais à faible dilution.

Cette logique peut être prouvée, mathématiquement. Soit, à une longueur d'onde bien déterminée, A_m l'absorbance du mélange et A_i l'absorbance de chaque composé (i) de l'extrait, où on note pour tout l'extrait que :

$$A_m = \sum_{i=1}^n A_i \quad (10)$$

Où (n) exprime le nombre des composés chimiques de l'extrait. Si on sépare l'absorption optique du catéchine, notée par A_c , du reste, on peut écrire :

$$A_m = A_c + \sum_{i=1}^{n-1} A_i \quad (11)$$

Ou autrement, selon la loi générale de Beer-Lambert :

$$\epsilon_m C_m = \epsilon_c C_c + \sum_{i=1}^{n-1} \epsilon_i C_i \quad (12)$$

Donc pour que C_m soit égale à C_c , il faut que ϵ_m soit égal à ϵ_c et l'absorption optique du reste des composés chimiques de l'extrait soit négligeable devant celle du catéchine. La dernière condition est vérifiée parce que la forme spectrale de l'extrait dilué est semblable à celle du catéchine. Ainsi la ressemblance en nombres de pics apparents de l'extrait et celle du catéchine a été constatée (figures 154 et 157). Un pic de longueur d'onde fixe à 276 nm et un pic de longueur d'onde variable avec la concentration, où cette variation est exprimée auparavant par une relation mathématique (eq. 09) entre le coefficient d'extinction ϵ et la longueur d'onde λ .

En appliquant la relation $\epsilon(\lambda)$ sur les résultats expérimentaux de l'absorbance et longueur d'onde des dilutions de l'extrait de fraise, nous pouvons avoir les valeurs du coefficient d'extinction, nous pouvons confirmer par coïncidence des droites, que le coefficient d'extinction de l'extrait dilué (ϵ_m) est celui du catéchine (ϵ_c) à la même longueur d'onde

absorbée. La figure 171 exprime le logarithme népérien du coefficient d'extinction (ϵ) en fonction de la longueur d'onde (λ) de l'extrait dilué et la solution catéchine, considérée comme solution référence.

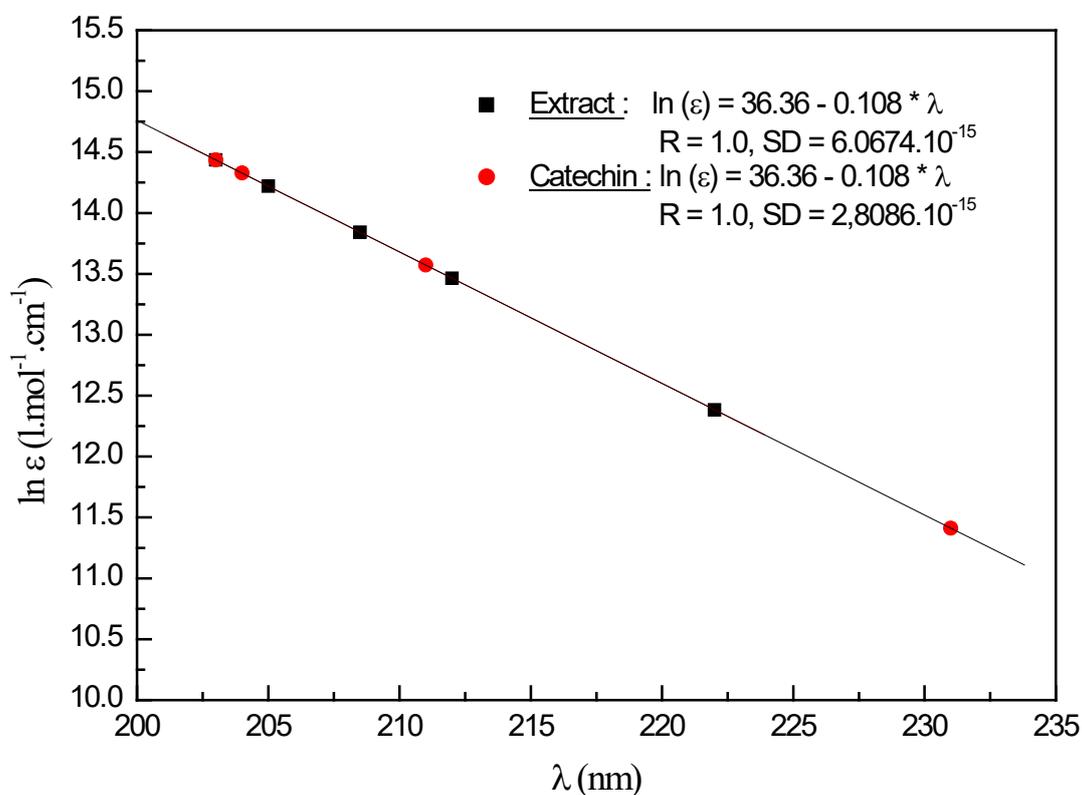


Figure 171 : Présentation linéaire du coefficient d'extinction en fonction de la longueur d'onde du pic le plus sensible de la solution référence et l'extrait de fraise.

Selon les deux tracés linéaires obtenus, on constate une parfaite coïncidence graphique. Ceci confirme aussi l'appartenance spectrale du deuxième pic de l'extrait dilué au catéchine. En conséquence, nous pouvons écrire : $\epsilon_m(\lambda) = \epsilon_c(\lambda)$ et dire que le dosage, par absorption optique dans l'UV-Vis, de la catéchine dissoute dans un extrait de fraise dilué est possible.

2-Dosage de la vitamine C par spectroscopie UV-Visible

Le développement de la méthode UV-Spectrophotométrique implique deux étapes, principalement la sélection du système de solvant et la sélection de la longueur d'onde de détection pour le dosage de l'acide ascorbique. Le profil de solubilité de l'acide ascorbique dans différents solvants a été obtenu selon une revue de la littérature et par une analyse pratique. Une étude de la littérature a révélé que l'acide ascorbique est soluble dans un

mélange de méthanol et d'acide acétique (95: 5), pH=2,1 (acide phosphorique), acétonitrile et tampon d'acétate d'ammonium (78: 22) pH-6,8 (Novokova L et al., 2005).

Une étude préalable consistant à réaliser un spectre d'absorbance d'une solution d'acide ascorbique 0.2g/250 ml a permis de déterminer la longueur d'onde pour laquelle était obtenue la valeur maximale d'absorbance de l'acide ascorbique (figure 172).

Plusieurs essais ont été effectués pour obtenir une longueur d'onde de détection appropriée en utilisant divers mélanges de solvants (EtOH/Eau 80 : 20 v/v MeOH /Eau 80 : 20 v/v Acétone/Eau 80 : 20 v/v AcOEt/Eau 80 : 20 v/v). Le mélange de solvants Ethanol/eau (80 : 20 v/v) a été choisi comme meilleur solvant. Afin d'obtenir le spectre UV des extraits bruts de fraise, une solution contenant de l'acide ascorbique dans un mélange de solvants a été analysée dans un spectrophotomètre UV entre 400 et 200 nm. Le spectre UV de l'acide ascorbique dans les solvants binaires (80:20v/v) a montré une absorbance maximale à 258 nm et a été donc sélectionnée comme longueur d'onde de détection. Cette longueur d'onde a ainsi été retenue comme longueur d'onde de mesure pour la suite de notre travail (figure 172)

Les paramètres de la méthode développée sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau 40 : Paramètres de la méthode développée

paramètres	Spécifications
Extraits bruts de fraise	Acide ascorbique
Solvants	Methanol: Eau (80:20% v/v) Ethanol: Eau (80:20% v/v) Acétone: Eau (80:20% v/v) AcOEt: Eau (80:20% v/v)
Longueur d'onde maximale de l'acide ascorbique	258nm

2.1–Dosage de l'acide ascorbique standard.

Aucune interférence n'a été montrée par le spectre du solvant à la longueur d'onde maximale d'absorbance de l'acide ascorbique. La longueur d'onde maximale a été sélectivement présentée par l'analyte à 258 nm. Ainsi la spécificité et la sélectivité de la méthode ont été validées. Le spectre UV de l'acide ascorbique standard et le spectre de superposition de l'acide ascorbique sont présentés à la figure 172 et figure 173 respectivement.

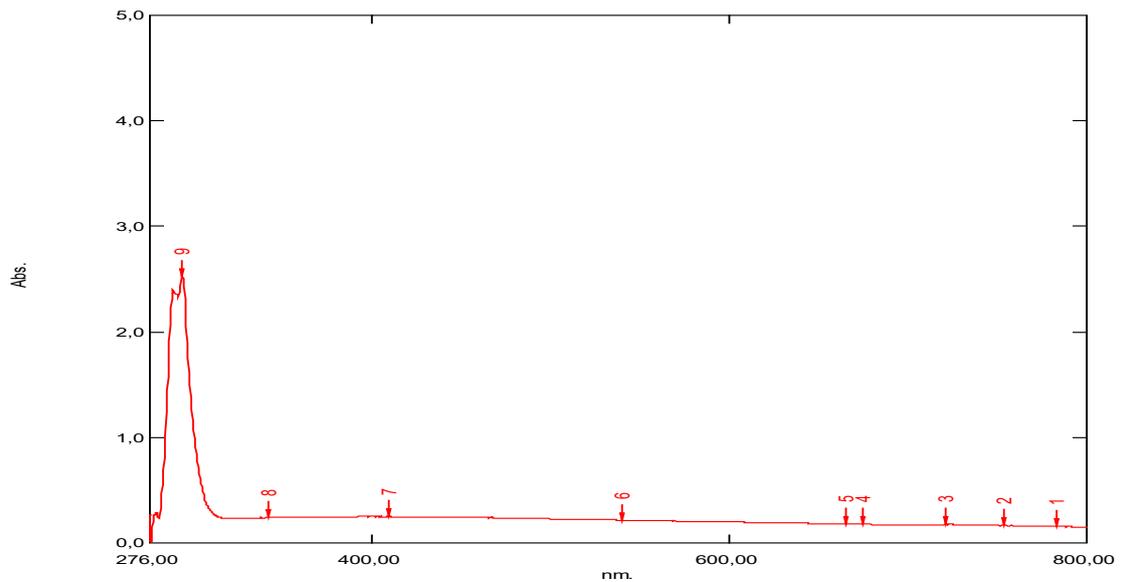


Figure 172: Spectre d'absorption UV-visible de l'acide ascorbique standard ($C_0=5 \cdot 10^{-3}$ mol/l)

2.2–Dosage de Vit C extraite de la chair de fraise

La figure ci-dessous représente le spectre d'absorption de la vitamine C extraite de la chair de fraise en UV-Visible.

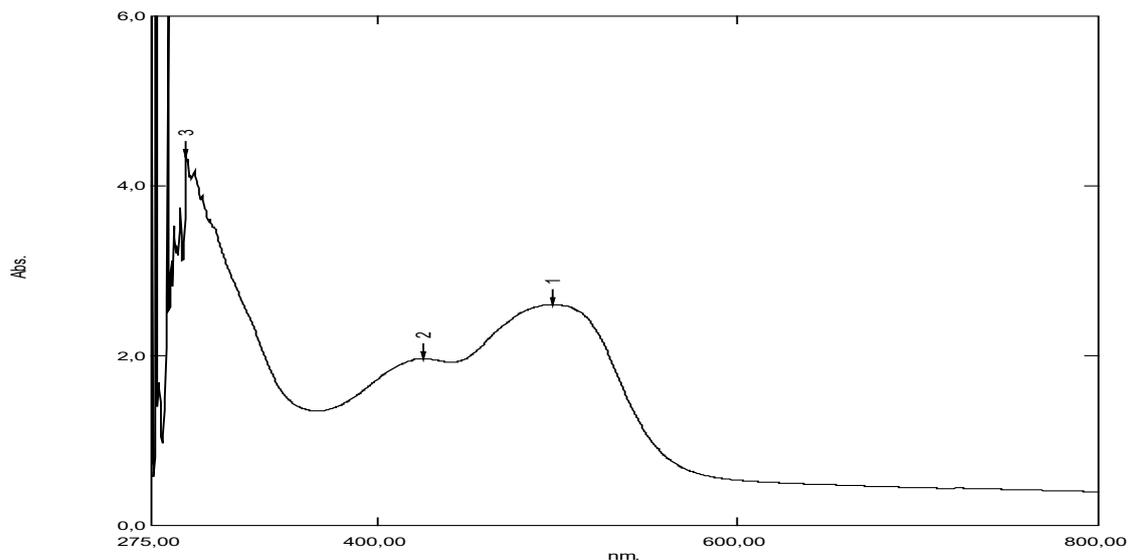


Figure 173 : Spectre d'absorption UV-visible de la vitamine C extraite de la chair de fraise

On remarque une similitude très apparente entre le spectre de l'acide ascorbique standard et celui de la Vit C extraite de la chair de fraise. Cependant, il est important de noter que la vitamine C peut être sujette à la dégradation, en particulier en présence de lumière, de chaleur et d'oxygène. Voici une description générale du spectre d'absorption de la vitamine C :

La vitamine C présente un pic d'absorption caractéristique dans la région de l'UV proche, généralement autour de 275 nm. Ce pic est associé à la transition électronique $\pi-\pi^*$ dans la

molécule. En plus du pic dans l'UV proche, la vitamine C peut également montrer une absorption à des longueurs d'onde plus élevées, dans la région de l'UV moyen (vers 290 nm).

Il est important de noter que la dégradation de la vitamine C peut entraîner des changements dans son spectre d'absorption au fil du temps.

A partir de cette courbe (figure 173), on remarque que la vitamine C extraite de la chair de fraise absorbe à deux longueurs d'ondes maximales égales à 258 nm et à 361nm correspondant respectivement aux groupements chromophores, le cycle à cinq chaînons et la fonction ene –diol (groupe-OH lié à un carbone possédant une double liaison C=C caractéristique des alcènes). D'autres bandes apparaissant dans le visible de plus faibles intensités, entre 500 et 600 nm sont associées aux processus électroniques des chromophores de fonction ester cyclique à 5 chaînons, deux fonctions alcool (OH lié au carbone 5 et 6) de classe différentes et une fonction ene –diol très oxydable en C=O (groupe-OH lié à un carbone possédant une double liaison C=C caractéristique des alcènes) inscrite dans un cycle à 5 chaînons et subissant des contraintes cycliques non négligeables (voir figure 174).

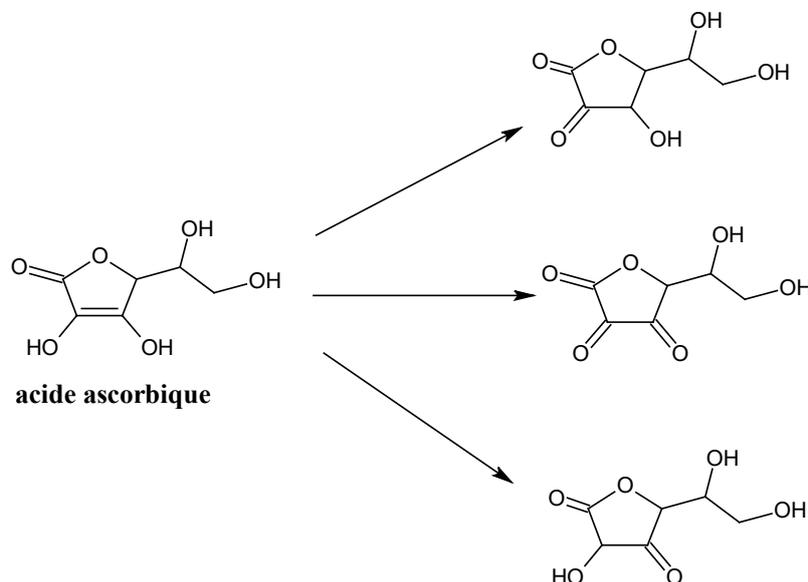


Figure 174 : les formes oxydées de l'acide ascorbique

Néanmoins, sur le spectre correspondant à la vitamine C extraite de la chair de fraise, de nouvelles bandes apparaissent, en raison de l'altération en partie de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique est sensible, il subit ainsi des dégradations favorisées par le pH du milieu ou par la chaleur et la lumière.

L'acide ascorbique peut subir une ouverture du cycle à cinq chaînons en donnant un produit acyclique (voir figure 175), au contact de l'humidité de l'air. Ceci peut s'expliquer soit par l'hydrolyse en milieu acide qui peut entraîner l'ouverture du cycle à cinq chaînons, soit par énolisation de la fonction alcool en fonction cétone par perte de la double liaison, soit par non purification de la Vit C lors de l'étape de l'extraction.

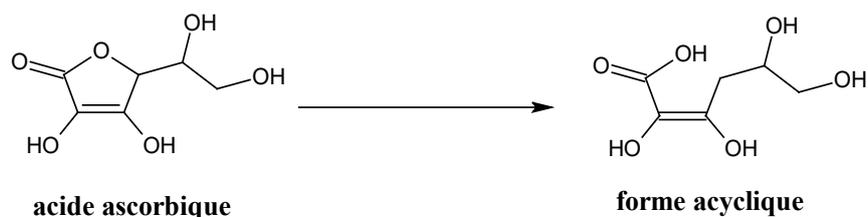


Figure 175: schéma de la molécule d'acide ascorbique et de sa forme acyclique.

2.3–Dosage de Vit C dans les extraits bruts de fraise par différents solvants

La figure ci-dessous (figure 176) représente le spectre d'absorption UV-Visible de la vitamine C extraite des différents extraits bruts dans les différents solvants d'extraction.

Les spectres obtenus ont tous présenté une absorbance maximale à une longueur d'onde de 258 nm, quelle que soit le solvant binaire utilisé. Cette longueur d'onde a ainsi été retenue comme longueur d'onde de mesure pour la suite du travail.

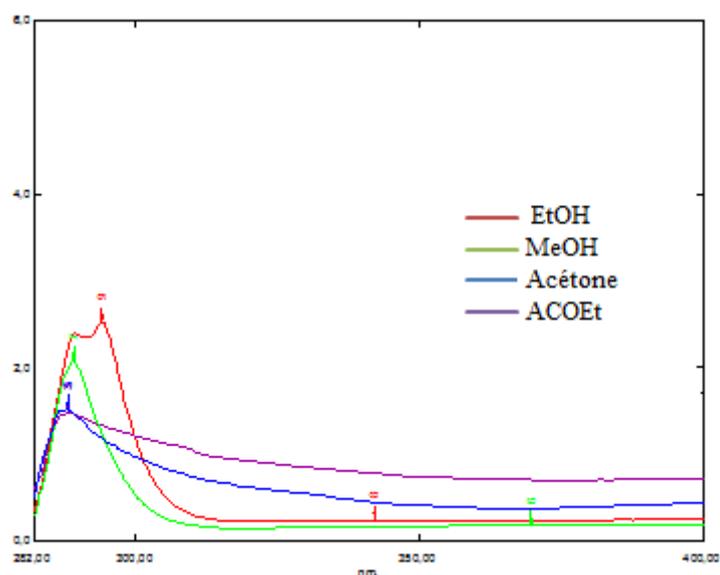


Figure 176 : Spectre de superposition de la vitamine C dans les différents extraits bruts de fraise.

La teneur en vitamine C dans les différents extraits de fraise, a été évaluée en se référant à une courbe d'étalonnage linéaire obtenue à partir d'une série de dilutions réalisées pour obtenir des solutions d'acide L-ascorbique à des concentrations allant de 0.01 à 0.07 mg/ml ($R^2=0,997$) (figure 177).

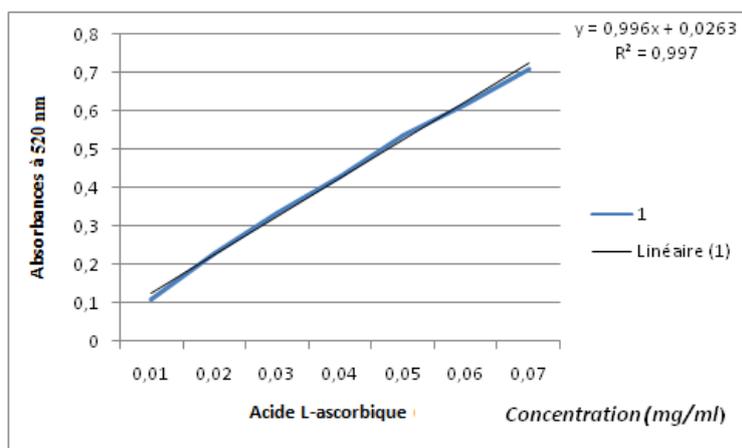


Figure 177: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique par spectrophotométrie UV-Vis.

La teneur en Vit C dans la chair de fraise est de 0,193mg/ml par contre dans les extraits hydro-éthanolique, hydro-méthanolique, hydro-acétonique et acétate d'éthyle 80% sont : 0,042 mg/ml ; 0,039 mg/ml ; 0,036 mg/ml et 0,026 mg/ml respectivement. La concentration en vit C est très élevée dans la chair de fraise par rapport aux extraits bruts de fraise extraits par les solvants organiques.

2.4–Identification de quelques composés polyphénoliques dans les extraits bruts de fraise

2.4.1–Identification de quelques composés polyphénoliques dans l'extrait AcOEt de fraise

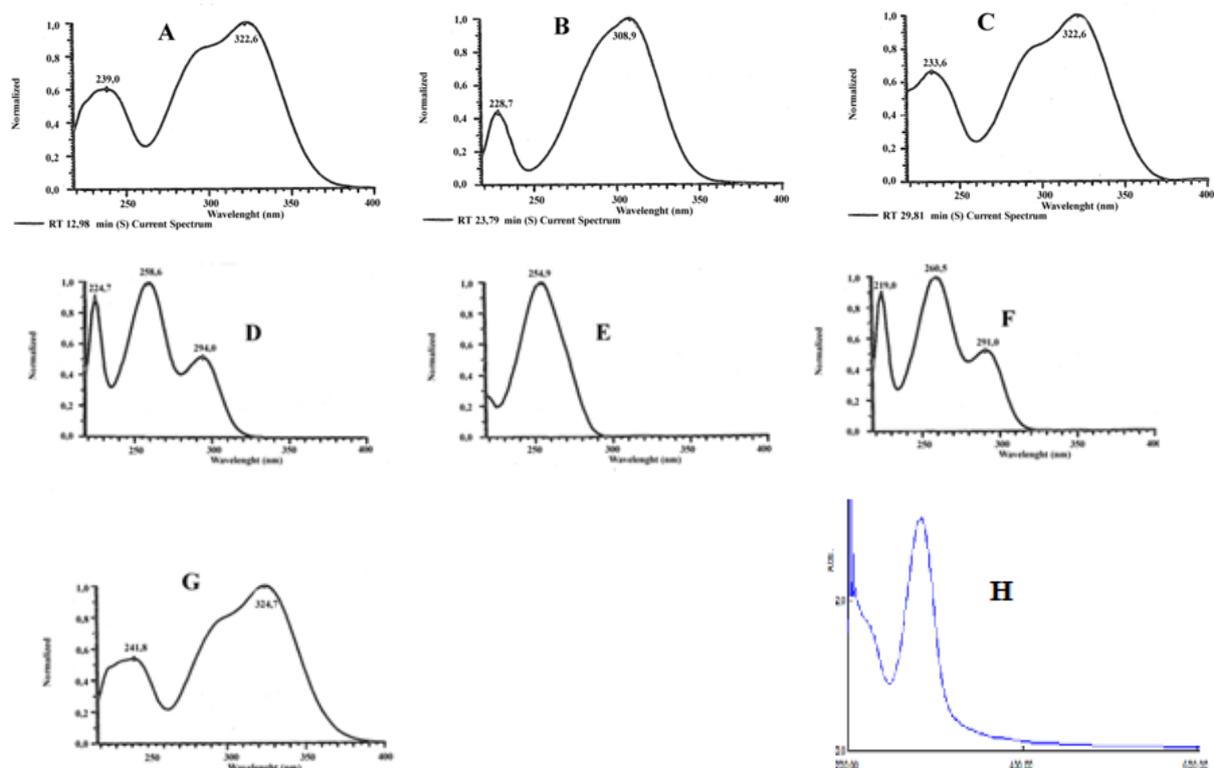
L'identification des composés polyphénoliques par spectrophotométrie UV-visible s'est basée sur les travaux issus de la littérature (Ibrahim.R et Towers.G, 1960), (Mabry, 1970), (Swiateck.L, 1984), (Bakker.J.,1994) ; (Harkati (2011), (Michel, 2011), (Aaby.K, 2012) et de (Bulama et al., 2015).

Ces composés polyphénoliques sont dotés de doubles liaisons conjuguées qui absorbent fortement dans l'UV dans la plage de longueur d'onde comprise entre environ 210 et 350 nm. L'identification des composés polyphénoliques s'est basée sur les maximum d'absorption autour de 270 nm relatif à la bande II et autour de 350 nm relatif à la bande I (Bae et al., 2015).

Les composés identifiés dans cette étude présentent des spectres UV typiques des composés phénoliques qui se distinguent par une seule bande d'absorption intense vers 260-262 et 228-

330 nm et flavonoides avec deux bandes d'absorption intenses vers 336-375 nm et nm 425-514 nm respectivement (Mabry, 1970).

Cette analyse nous a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des quatre constituants (**EBF1, EBF2, EBF3 et EBF4**) qui se distinguent par une seule bande d'absorption intense et un épaulement vers 208-260 nm et 260-330 nm a également été enregistrée (Figure.179). Ces spectres ont été comparés aux spectres des acides phénoliques standards (figure 178), (kowalski.R et Wolski.T., 2003) et (Aaby.K, 2007 ; Aaby.K, 2012)



**A : Acide caféique — B : Acide p-coumarique — C : Acide férulique — D : Acide protocatéchique — E : Acide p-hydroxybenzoïque — F : Acide vanillique
G : Acide Chlorogénique — H : Acide syringique.**

Figure 178 : spectres UV-vis (220-400 nm) des acides phénoliques standards

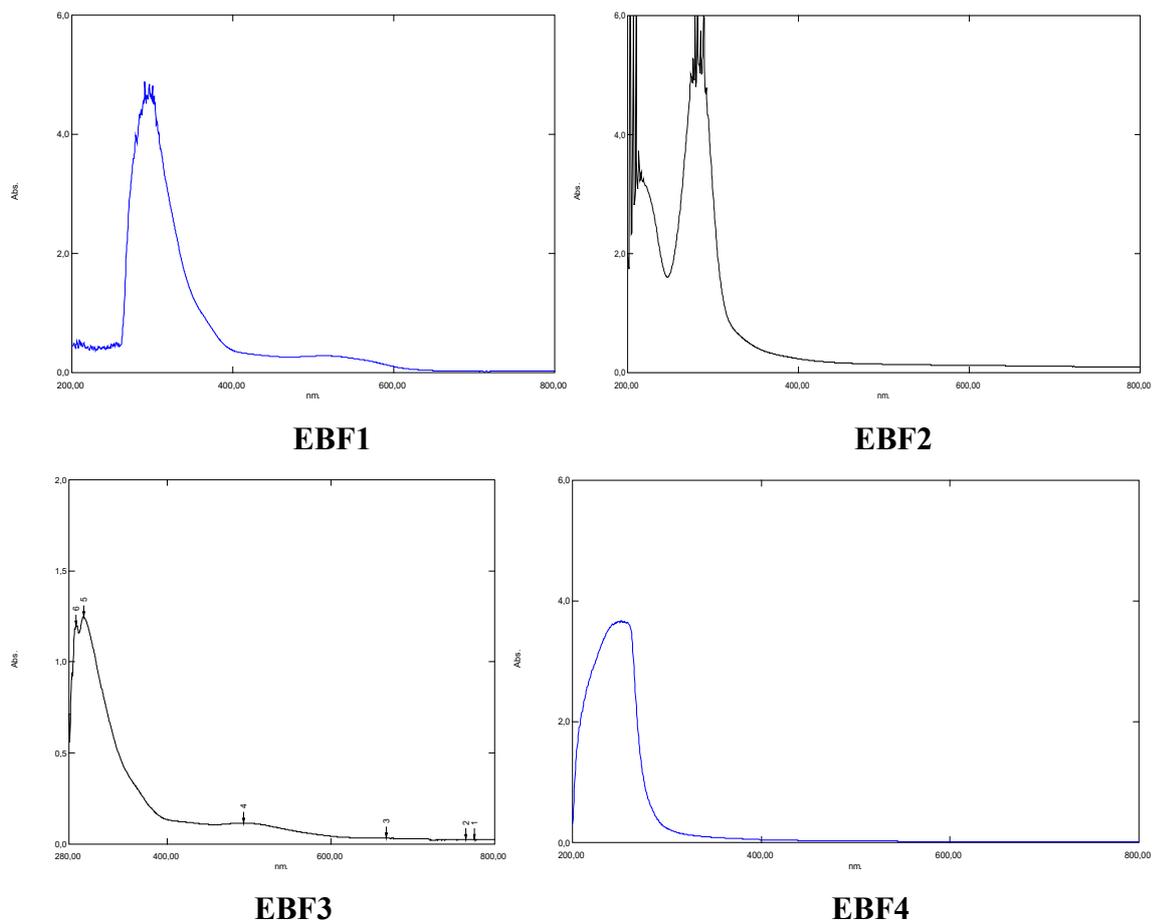


Figure 179 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait ACOEt de fraise.

Le spectre UV de l'extrait EBF1 est similaire au spectre UV du composé E et laisse prévoir qu'il s'agit de l'acide hydroxybenzoïque.

le spectre UV de cette molécule ($\lambda_{\max} = 220$ et 275 nm) et la comparaison entre le spectre UV de l'acide benzoïque standard confirment ce résultat (Harkati . 2011).

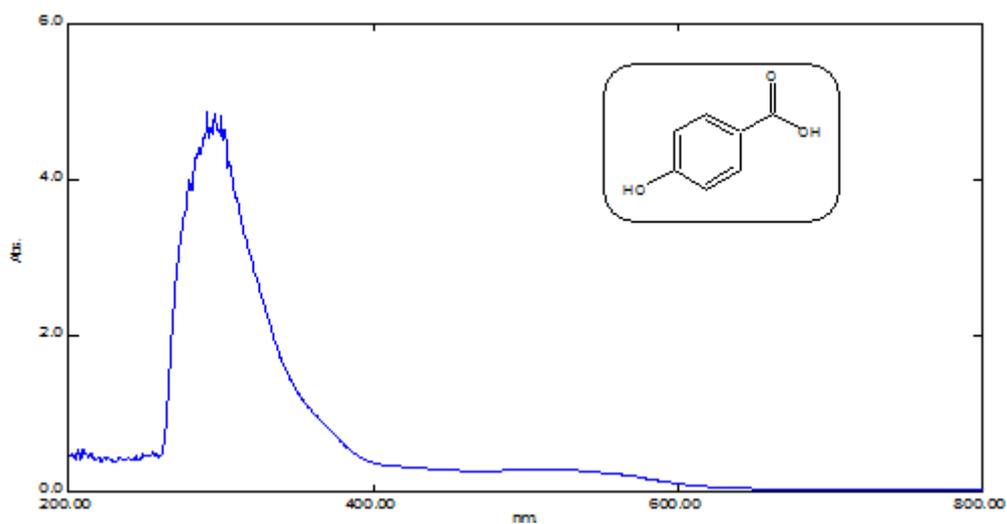


Figure 180 : Spectres UV de l'acide p-hydroxybenzoïque..

L'extrait EBF2 possède le profil de spectre UV ($\lambda_{\max} = 220, 270 \text{ nm}$ et 310 nm). Ces caractéristiques suggèrent que nous sommes en présence d'acides phénoliques (Michel, 2011) et (Bae et al., 2015). Le spectre UV de l'extrait EBF2 est similaire au spectre UV du composé standard H (figure 181). Ceci nous laisse prétendre que son spectre UV pourrait correspondre à celui de l'acide syringique, un composé trouvé dans plusieurs espèces de fraise.

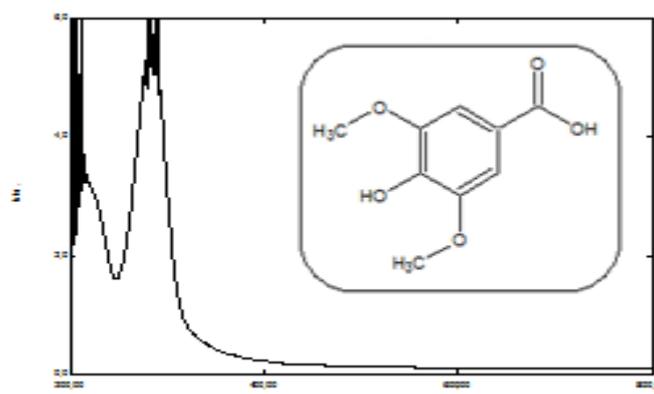


Figure 181 : Spectre UV-vis de l'acide syringique

Le spectre UV de l'extrait EBF3 nous amène à dire qu'il s'agit d'un acide phénolique. Les longueurs d'onde ($\lambda_{\max} = 285$ et 295 nm) caractéristiques de l'acide shikimique ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$) (figure 182) ; (Schutz, 2004) et (Zheng, X., S.2014).

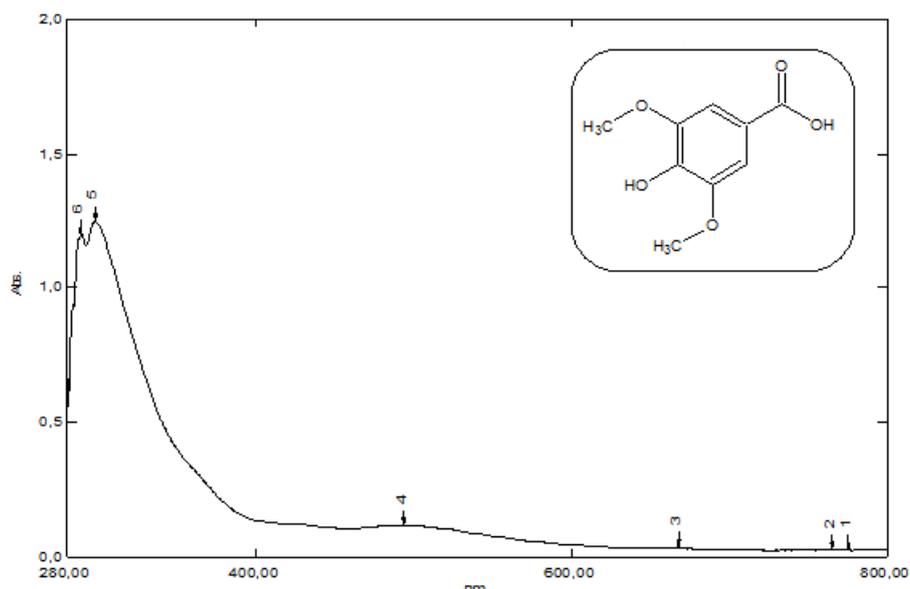


Figure 182 : Spectre UV de l'acide shikimique.

Nous n'avons pas pu identifier l'extrait et EBF4 et cela est dû au manque du composé standard.

2.4.2–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait éthanolique de fraise

Les spectres enregistrés de nos extraits ont été comparés aux spectres des flavonoïdes standards, (Kowalski.R et Wolski.T., 2003) et (Aaby.K, 2012).

Cette analyse nous a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des deux constituants majoritaires de cet extrait. Pour les deux composés EBF6 et EBF7, leurs spectres UV sont typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses à 354-375 nm et 425-514 nm (Mabry, 1970).

Les spectres UV des composés EBF6, EBF7 font apparaître deux maxima vers 354-364 nm et 512-514 nm et deux épaulements vers 300-380 nm et 512-514 nm caractéristiques des dérivés des composés de la quercétine et de la rutine respectivement (Schutz, 2004).

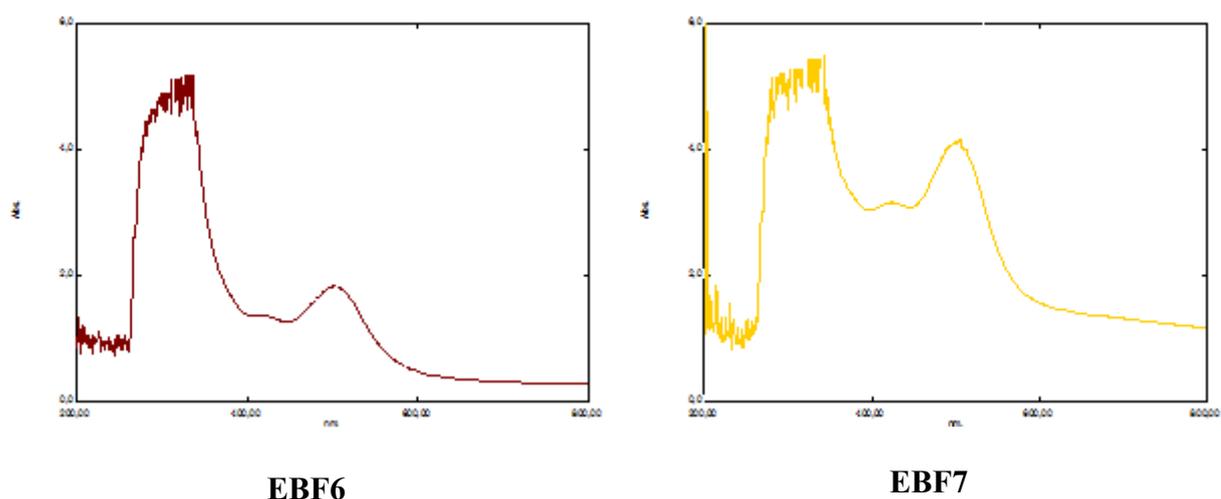


Figure 183 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de fraise.

2.4.3–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait méthanolique de fraise

Cette analyse nous a permis aussi d'obtenir les premières indications sur la nature des constituants majoritaires de cet extrait éthanolique. Les spectres UV des composés EBF8 et EBF9 font apparaître deux maxima vers 271-275 nm et 512-514 nm. Pour le premier maxima on constate deux épaulements vers 275-285 et 300-310. Pour le second maxima un épaulement vers 512-514 nm caractéristiques des dérivés anthocyaniques une sous famille des flavonoïdes (Schutz, 2004).

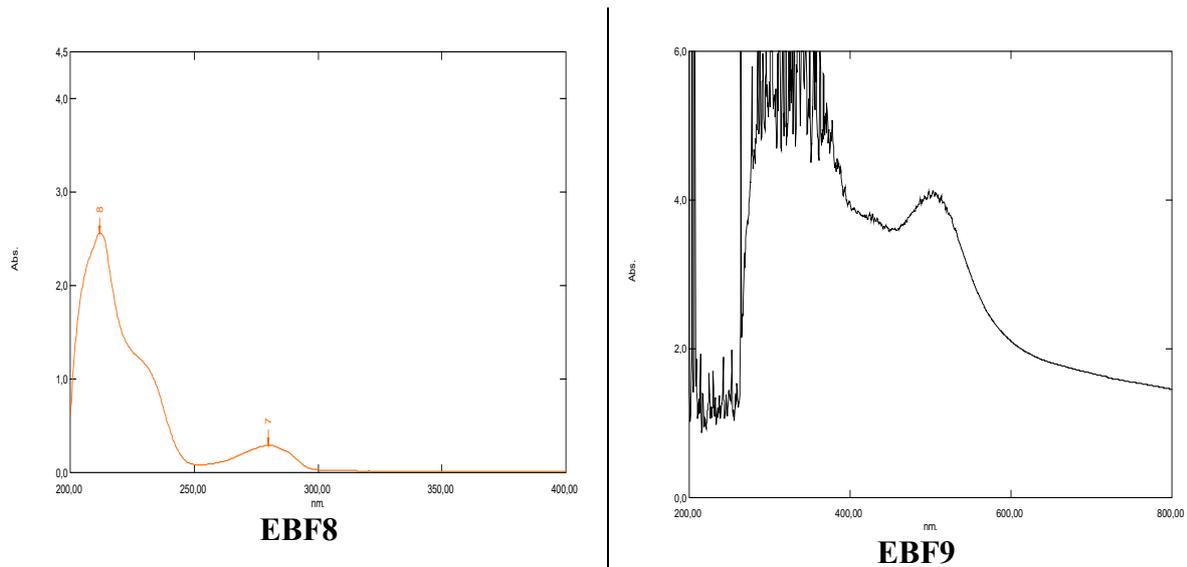


Figure 184 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait méthanolique de fraise.

Le spectre UV de l'extrait EBF8 ($\lambda_{\text{max}} = 220$ et 275 nm) est caractéristique de celui de la catéchine. La comparaison entre le spectre UV de notre extrait et celui de la catéchine standard confirme ce résultat (Mabry, 1970).

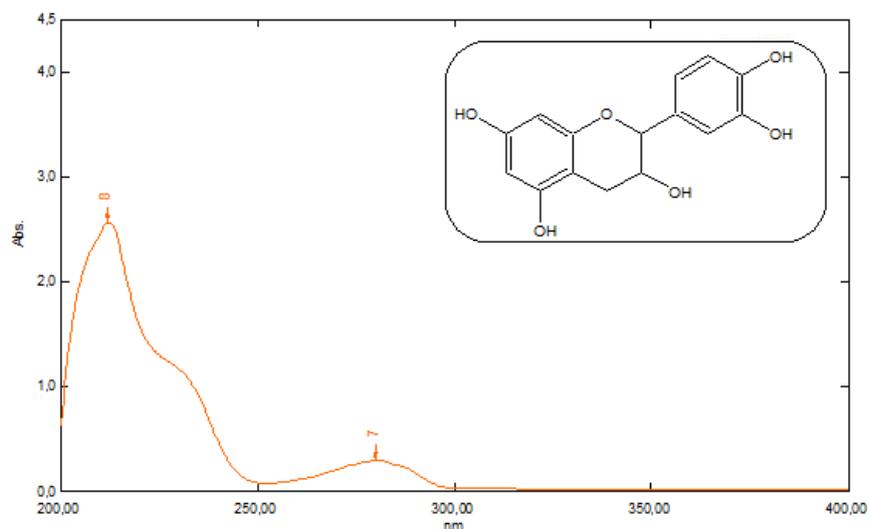


Figure 185 : Spectres UV de la catéchine.

Concernant l'extrait EBF9, il présente un épaulement vers 512-514 nm caractéristiques des dérivés anthocyaniques une sous famille des flavonoïdes (Schutz, 2004).

2.4.4–Identification de quelques composés flavonoïques dans l'extrait acétonique de fraise

Cette analyse nous a permis aussi d'obtenir les premières indications sur la nature des constituants majoritaires de cet extrait acétonique. Pour les deux composés (EBF10 et EBF11), les spectres UV sont typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 210-345 nm et 425-515nm (Mabry,1970).

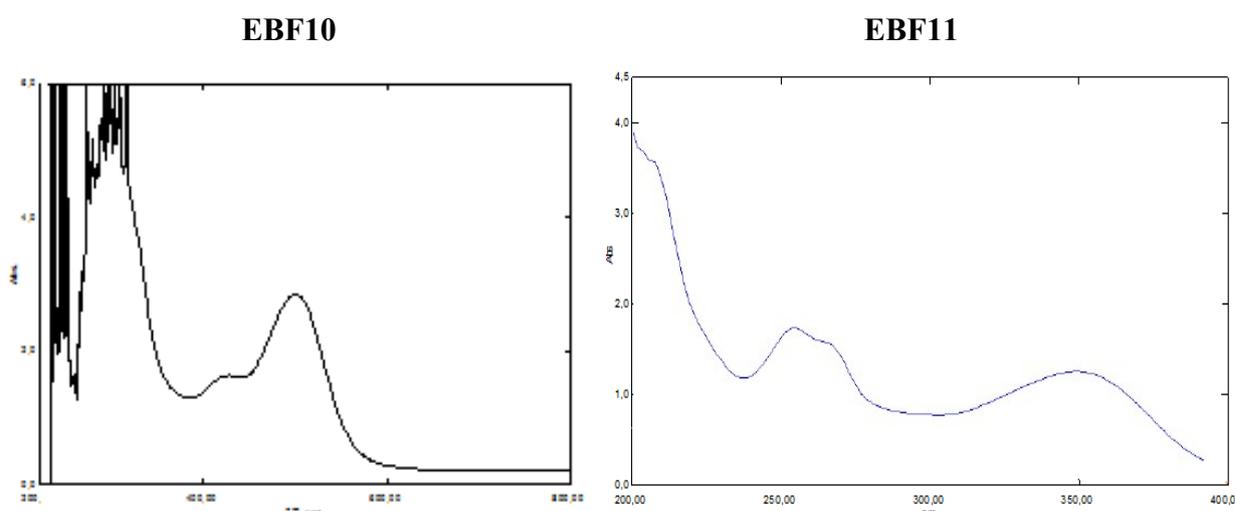


Figure 186 : Spectres UV des composés identifiés dans l'extrait acétonique de fraise.

Les spectres UV des composés **EBF10** et **EBF11** font apparaître deux maxima vers 210-345 nm et 512-514 nm. Pour le premier maxima on constate deux épaulements vers 275-285 et 300-310 et pour le second maxima un épaulement vers 512-514 nm caractéristiques des dérivés flavonoïques (Schutz, 2004).

Le spectre UV de l'extrait EBF11 ($\lambda_{\text{max}} = 203$ nm, 265 et 365 nm) suggère que nous sommes en présence d'un composé flavonoïques de la famille des flavonols (Amiot, M.J., et al., 1989) et (Bulama et al., 2015). Ces résultats laissent prévoir qu'il s'agit des caractéristiques de Kampferol. Par contre l'extrait EBF10 n'a pas été identifié et cela est dû au manque de composés standards.

2.5–Identification des minéraux par fluorescence aux rayons X (XRF)

Dans cette partie, nous avons essayé de déterminer les teneurs en éléments majeurs (Mg, Si, Mn, Fe, P, K, Ca,) et en oligo-éléments (Zn, Cu, I₂) dans la fraise. De plus nous avons aussi essayé d'identifier quelques métaux lourds toxiques (Pb, Hg, Cd) qui peuvent exister dans ce fruit vu la pollution de l'environnement, des eaux et l'utilisation abusive des pesticides. Tous ces éléments ont été analysés par spectrométrie de fluorescence aux rayons X.

Les éléments majeurs sont généralement nécessaires en assez grande quantité et les oligo-éléments en quantité infime.

Mg, Si, Mn, Fe, P, K, Ca, et Zn, Cu, I₂, ont été détectés dans nos échantillons de fraise.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 41 ci-dessous :

Tableau 41 : détermination des teneurs en éléments majeurs, en oligo-éléments et en métaux lourds dans la fraise

Minéraux	% en masse	Masse (mg/100g matière seche)	Valeurs Min/Max(*)
Magnésium	6.36	15.9 mg	0.13 – 0.75 mg
Silicium	1.54	3.88 mg	-----
Fer	1.31	3.28 mg	0.11 – 1.31 mg
Potassium	61.2	135 mg	77 – 344 mg
Manganese	0.84	2.09 mg	8 – 20 mg
phosphore	9.65	24.12 mg	9 – 39 mg
Calcium	26.40	66.01 mg	8 – 35 mg
Zinc	0.34	0.8 mg	0.04 – 0.59 mg
Cuivre	0.36	0.89 mg	0.01 – 0.17 mg
Iode	3.53	8.83 mg	0.05 – 9 µg
Plomb	-----	-----	-----
Mercure	-----	-----	-----
Cadmium	-----	-----	-----

(*) : les valeurs maximales et minimales en minéraux contenus dans 100 g de fraise selon (Mikulic-petkovsek et al, 2012.) et Giampieri et al (2015)).

On peut observer que les fraises sont particulièrement riches en Mg, P, Ca, K, Si et en Fe, suivis de Mn, Cu et Zn. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études (Martínez et al., 2010). Des recherches antérieures, visant à déterminer la teneur en éléments et en antioxydants des fraises cultivées en Hongrie ont identifié Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P et Zn, K, P, Ca et Mg étant les éléments les plus détectés dans les échantillons (Hegadüs et al., 2018) et (Golubkina N, et al; 2018). De même, et selon la littérature, des éléments tels que Ca, P, Zn, Na, Mg et K, qui sont fortement détectés dans les fraises, ont une grande importance pour la santé humaine (Wojcieszek J, Ruzik L. 2016) et (Etzbach et al., 2018).

Les éléments K et Ca dans nos échantillons de fraise ont présenté les teneurs les plus élevées, suivis de P et Mg.

Les teneurs en Zinc en Cuivre en Calcium et en Fer dans nos fraises ont été supérieures aux valeurs maximales fixées par Mikulic-petkovsek et al, (2012) et sont en accord avec celles obtenus par Giampieri et al (2015). La teneur en iode a dépassé la barre de 9 µg fixée par plusieurs auteurs (Mikulic-petkovsek et al, 2012).

On a constaté une valeur anormalement élevée pour l'iode (trop supérieure à 9 µg), une valeur maximale fixée par Mikulic-petkovsek et al, (2012) et cela est du probablement à l'utilisation des pesticides à base d'iode.

La présence de métaux lourds dans les produits de récolte est un risque de santé publique qu'il faut contrôler. Cependant nos échantillons de fraises sont exempts en minéraux lourds toxiques tels que Pb, Hg et Cd.

3 – Conclusion

La nouvelle méthode d'analyse spectrophotométrique UV est spécifique et sélective pour le dosage de la catéchine et de l'acide ascorbique. La méthode développée s'est avérée simple, précise, et économique pour une utilisation de routine.

La catéchine dans la fraise pourrait être quantifiée avec précision par spectrophotométrie d'absorption dans UV-Visible. Dans notre recherche scientifique, nous avons montré qu'à une certaine dilution de l'extrait de fraise, le spectre dominant est celui des catéchines. En conséquence le dosage est possible par cette méthode.

Les concentrations trouvées dans la littérature ont été comparées aux résultats trouvés de notre extrait de fraise.

Nous avons, aussi, rendu possible la quantification des substances chimiques dissoutes

caractérisées par un déplacement spectral lors de la dilution. La loi de Beer-Lambert pourrait être utilisée en tenant compte de la longueur d'onde absorbée. Autrement dit, l'absorbance serait dépendante de la concentration et de la longueur d'onde absorbée.

Dans cette étude, il a été déterminé qu'un certain nombre d'éléments importants pour la santé existent dans les fraises. Sur ce point, la présence de Mg et de Mn pourrait être corrélée au contrôle du diabète par les PP car ces éléments ont été détectés à des niveaux considérables. Les analyses chimiques sont généralement des approches longues et coûteuses pour l'analyse élémentaire d'échantillons de légumes et fruits ; en revanche, la technique XRF utilisée dans cette étude est relativement bon marché, non destructive et rapide et peut être utilisée pour une analyse élémentaire de ce type.

4^{EME} PARTIE : IDENTIFICATION DES ANTIOXYDANTS NATURELS POLYPHENOLIQUES PAR CCM et HPLC/MS DE LA FRAISE.

1. Essai d'identification des antioxydants polyphénoliques par chromatographie sur couche mince CCM

La plaque de CCM utilisée est une plaque d'aluminium constituée d'un gel de silice « La phase stationnaire ». La migration est faite dans huit systèmes de solvants « phase mobile ». Les substances de faibles polarités migrent plus que les composants polaires. Les résultats d'analyses chromatographiques par CCM des différents extraits de fraises obtenus sont illustrés dans les figures et les tableaux ci-dessous.

Après observation des plaques sous U.V à 254 nm dans une chambre noire et en s'appuyant sur les données de la littérature (Kolai et al, 2006), quant à la séparation des composés phénoliques par C.C.M et leur observation sous U.V, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de nos extraits de fraises.

Système 1 : MeOH/AcOEt/CHCl₃/Eau (35/35/30/0.1)

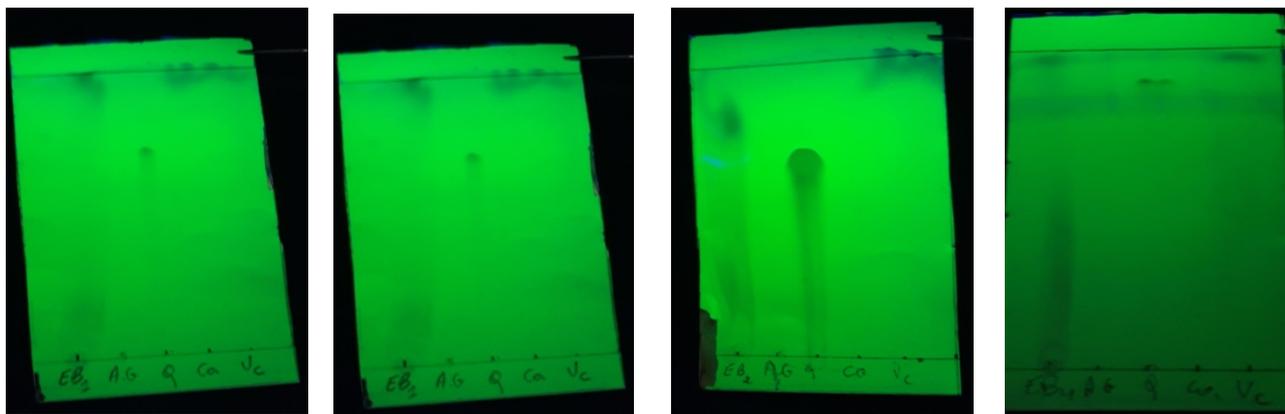


Figure 187 : Chromatogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 1.

Tableau 42 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 1.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau	0,94	—	0.68	—	—
	0,80				
Méthanol-eau	0,63	—	0.61	—	—
	0,68				
	0,81				
Acétone-eau	0,91	—	0.89	—	—
	0,55				
	0,23				
Acétate d'éthyle-eau	0.93	—	0.85	—	—

(-) : absence de tâches

Système 2 : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOEt}/\text{Eau}$ (20/50/30/0.2)

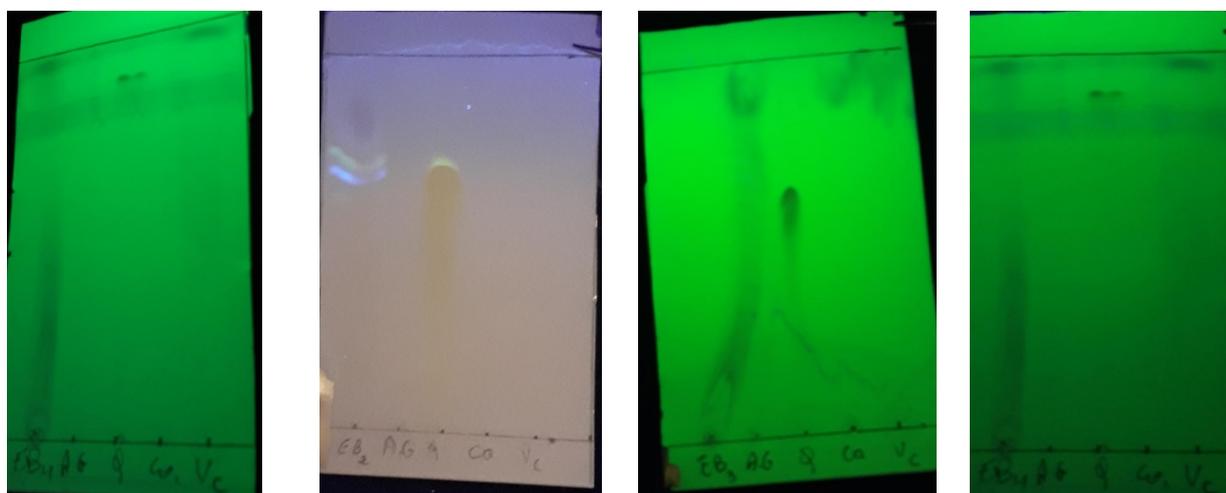


Figure 188 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 2.

Tableau 43 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 2.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau	0,78	0.575	0.76	—	—
	0,26				
Méthanol-eau	0,20	—	—	—	—
Acétone-eau	0,69	—	0.70	—	—
	0,16				
Acétate d'éthyle-eau	0.74	—	0.25	—	—
	0.11				

(-) absence de tâches

Système 3 : CHCl₃/MeOH/AcOEt/Eau (30 /50/20/0.2)

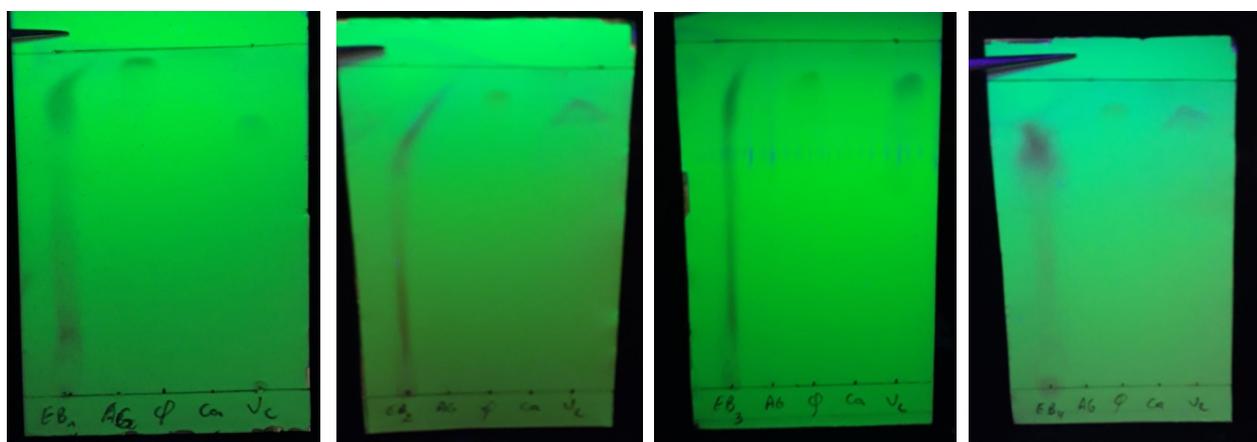


Figure 189: Chromathogramme de l'extract brut sur CCM élué par le système 3.

Tableau 44 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 3.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau	0,80 0,16	—	0.925	—	0.725
Méthanol -eau	0,80	—	0.86	—	—
Acétone -eau	0,80	—	0.85	—	—
Acétate d'éthyle-eau	0.76 0.14	—	0.85	—	—

(-) absence de tâches

Système 4 : AcOEt/CHCl₃/ MeOH (80/23.5/20)

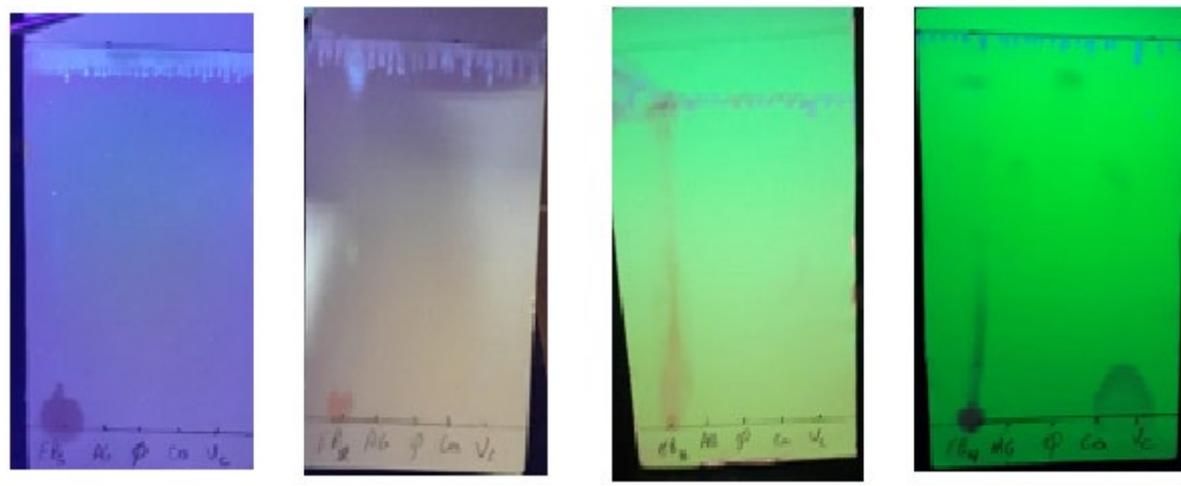


Figure 190 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 4.

Tableau 45 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 4.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau	0,66	—	—	—	—
Méthanol -eau	0,20	0.90	—	—	0.71
	0,81				
Acétone -eau	0,46	—	—	—	—
	0,77				
Acétate d'éthyle-eau	0.86	0.65	0.85	0.61	—
	0.69				
	0.45				
	0.13				

(-) absence de tâches.

Système 5 : AcOEt/CHCl₃/HCOOH (40/50/10)

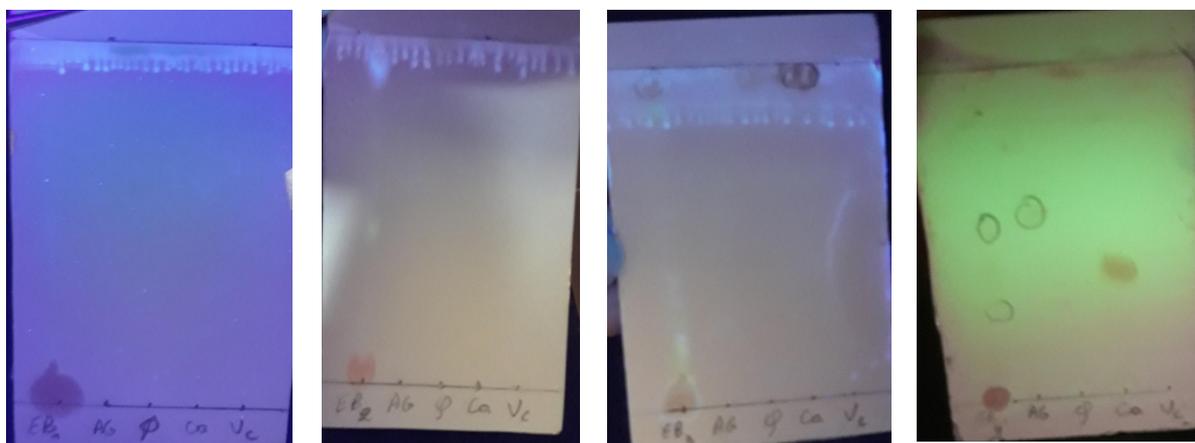


Figure 191 : Chromathogramme de l'extract brut sur CCM élué par le système 5.

Tableau 46 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 5.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau	0,86 0,41	0,90	0.45	0.43	—
Méthanol-eau	0,81 0,41	—	0.90	—	—
Acétone-eau	0,90	—	0.90	—	—
Acétate d'éthyle-eau	0.26 0.50	0,52	—	0.35	—

(-) absence du tâches.

Système 6 : AcOEt/CHCl₃/MeOH/HCOOH (20/70/10/0.1)

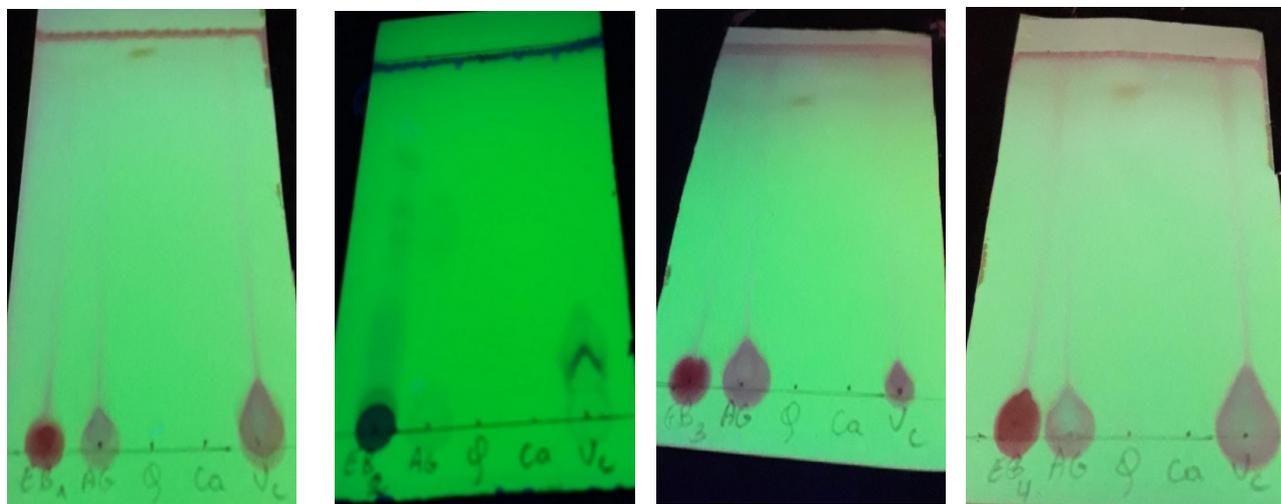


Figure 192 : Chromathogramme de l'extrait brut sur CCM élué par le système 6.

Tableau 47 : Résultats des R_f des analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fraise du système 6.

Extraits	R_f				
	taches	Acide gallique	Quercitrine	Catéchine	Vitamine C
Éthanol-eau		—	0.90	0.45	—
Méthanol -eau	0,71 0,63 0,46 0,40 0,19	—	0.61	—	—
Acétone -eau	0,70	0.75		0.31	—
Acétate d'éthyle-eau	—	—	0.81	0.37	—

(—) absence du tâches.

Les valeurs relativement importantes concernant le dosage des polyphénols, de la Vit C et les minéraux dans nos extraits bruts des fraises, nous ont mené à réaliser une analyse chromatographique par CCM afin de déterminer la composition de nos extraits en utilisant certains composés phénoliques de références utilisés comme témoins.

Concernant la séparation des extraits bruts des fraises *fragaria vesca*, une chromatographie sur couche mince à été effectuée en utilisant huit systèmes d'éluion différents ont été testés.

Selon les résultats obtenus, on peut noter que :

La migration des composants antioxydants est différente d'un système à autre. En effet, la migration se fait selon la polarité du substances et solvant utilisé pour l'éluion. Les substances de faibles polarité migrent plus facilement que les substances plus polaires car elles sont moins adsorbées par la phase stationnaire..

Les plaques CCM obtenues présentent un nombre variable de taches, ce dernier peut augmenter ou diminuer selon l'éluant utilisé et le solvant d'extraction utilisé

Le système 6 utilisé pour les extraits hydro-éthanoliques et les extraits à l'acétate d'éthyle-eau n'ont révélé aucune tâche.

Les systèmes 1 et 6 concernant l'extrait hydro-méthanolique ont révélé plus que de deux tâches.

Pour l'extrait acétate d'éthyle-eau élué par le système 4 et l'extrait hydro-éthanoliques élué par le système 6 révèlent de nombreuses taches sur la plaque de CCM. Ceci nous amène à dire que ces extraits sont très riches en antioxydants naturels.

La séparation par MeOH/ acétate d'éthyle /chloroforme/ eau (35 :35 :30 : 0.1) et acétate d'éthyle/CHCl₃ / MeOH / (80 :23.5 :20) et acétate d'éthyle/CHCl₃ / MeOH / HCOOH (20 :70 :10/ 0.1) a révélé plus de taches. Ils représentent les meilleurs systèmes d'élution pour la séparation des composés phénoliques, comparés aux autres systèmes. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la littérature.

Le premier, le quatrième et le sixième système donnent une bonne résolution pour les extraits bruts de notre fruit la fraise tenant compte du nombreux taches révélés dans le chromatogramme. Pour l'essai d'identification des composés par CCM, nous avons utilisé quatre témoins, sur les six systèmes d'élution.

En se basant sur la comparaison des R_f des standards utilisés et les tâches des extraits, on peut dire que les tâches de même R_f que les standards utilisés correspondent aux mêmes composés. En effet, les extraits hydro-méthanolique et hydro-éthanolique contiennent de la Quercétine, la catéchine et l'acide gallique plus de la vitamine C. De plus, l'extrait acétone-eau et acétate d'éthyle -eau contiennent de la Quercétine la catéchine et de l'acide gallique par contre ils ne contiennent pas de vitamine C. Ces extraits sont considérés comme de très bons solvants d'extraction et sont très riches en antioxydants naturels (Schmidtlein.H et Herman.K., 1975).

2- Identification des composés flavonoïques des fraises

Les travaux antérieurs nous ont encouragés pour effectuer une nouvelle CCM avec de nouveaux systèmes d'éluion pour l'identification des composés flavonoïques contenus dans les fraises

2.1 Identification des composés flavonoïques des fraises avant hydrolyse

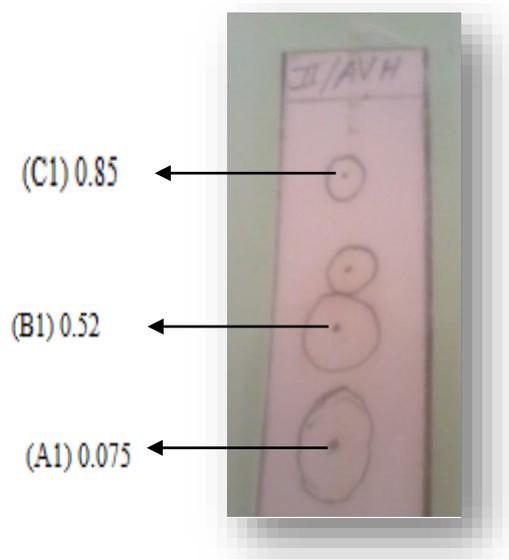


Figure 193: C.C.M de l'extrait brut des fraises avant l'hydrolyse par le système 7

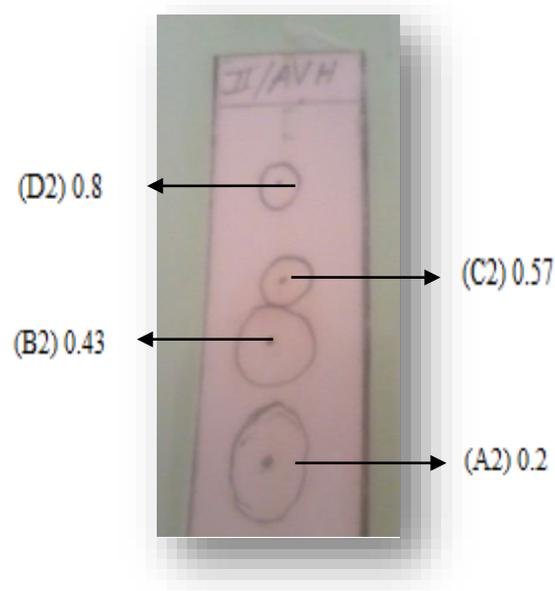


Figure 194: C.C.M de l'extrait brut des fraises avant l'hydrolyse par le système 8

En s'appuyant sur la C.C.M et en utilisant le mélange du système 7 (**Figure 193**), on pu être séparés trois pigments roses presque identiques (A1, B1, C1) de forme plus ou moins circulaire et de R_f respectifs : 0.075 ; 0.52 ; 0.85

En ce qui concerne le mélange de solvant 8 (**Figure 194**), on pu être séparés quatre pigments roses de tailles différentes et de forme ovale et circulaire dont deux sont majoritaires (A2, B2) et deux minoritaires (C2, D2) de R_f respectifs : (A2, B2) $R_f = 0.2 ; 0.43$ (C2, D2) $R_f = 0.57 ; 0.8$

D'après ces résultats, le système qui a donné la meilleure séparation est celui de l'acétate d'éthyle/ méthanol/ eau (Système 7) par ce qu'il a permis de séparer trois taches de R_f très distincts, ce qui explique la solubilité différentielle des flavonoïdes dans le système 7.

En se basant sur la comparaison des R_f d'un standard telle que la quercétine ($R_f = 0.853$) et les taches de l'extrait brut, la présence de quercétrine est confirmée dans les deux systèmes de solvants 7 et 8, et correspond aux produits C1 et D2 (Mabry et al., 1970).

Après une simple comparaison entre le système 7 et le système 8, il apparaît clair et évident que la tache rose des produits B1 et C2 est une tache commune et correspond probablement aux anthocyanidine,3-glucosides. Par contre les taches des produits A1, A2 et B2 peuvent indiquer respectivement la présence des flavonols et/ ou des flavones et/ ou des pigments anthocyanidine (3,5)-diglucosides (Idrissi Hassani, 1985, Touati, 1985).

2.2 Identification par C.C.M des composés flavonoïques des fraises après hydrolyse

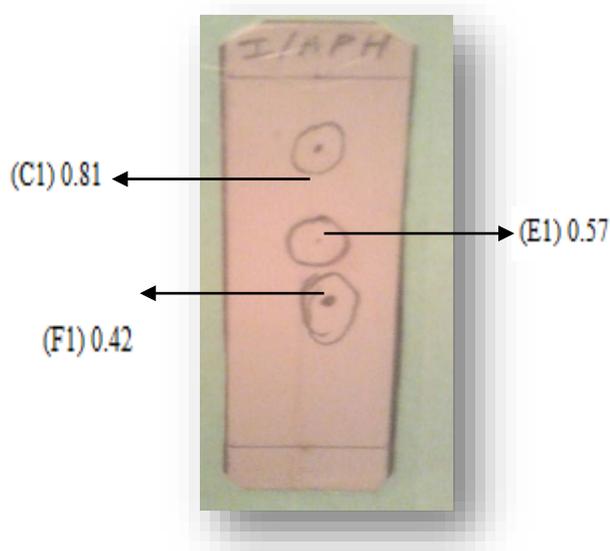


Figure 195: C.C.M de l'extrait brut des fraises après hydrolyse par le système 7

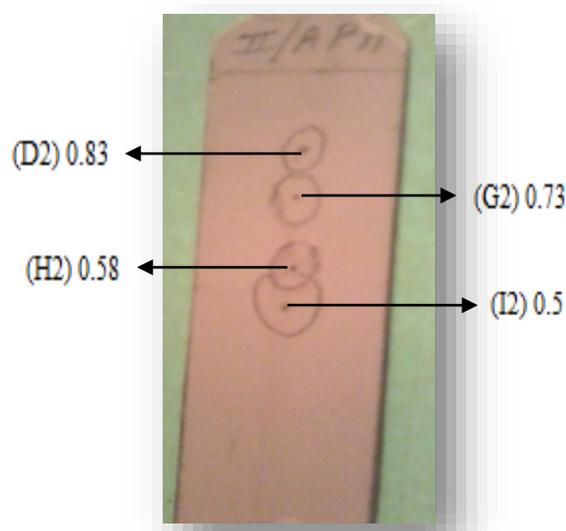


Figure 196: C.C.M de l'extrait brut des fraises après hydrolyse par le système 8

Grace à la C.C.M et en utilisant le mélange du système VII (**Figure 195**), on a pu obtenir trois pigments dont des proportions égales, de couleur roses, de forme circulaires et de R_f plus ou moins rapprochés : R_f (système 7) : 0.42 ; 0.57 ; 0.81

En utilisant le mélange du système 8 (**Figure 196**), on a pu séparer quatre pigments de couleur rose dont un est majoritaire (I2 est la substance la plus abondante) de R_f égale à 0.5 et trois autres de mêmes proportions et qui sont minoritaires (H2, G2 et D2) dont les R_f sont respectivement : 0.58 ; 0.73 ; 0.83.

D'après une simple lecture de ces (C.C.M), on constate que les R_f des produits après hydrolyse sont supérieures à ceux des produits avant hydrolyse, donc on peut conclure facilement que les produits obtenus après hydrolyse sont moins polaires (car on a éliminé le groupement R3) et migrent facilement sur la plaque (Paris, R et Stchepare. R, 1964), ceci prouve avec exactitude et sans ambiguïté que les différents produits de l'extrait brut ont été réellement hydrolysés à l'exception de la quercétine (C1 et D2) qui n'a pas subi l'hydrolyse car son R_f n'a pas changé.

La bonne séparation des produits apparaît toujours dans le système de solvant : Acétate d'éthyle/ méthanol/ eau et ceci même après hydrolyse, contrairement à l'étude faite en (2001) par Males et Médic-Saric, qui ont testé treize systèmes de solvants et ils ont trouvé que le système : Acétate d'éthyle/ acide formique/ eau présente la meilleure séparation. Ce ci prouve que les produits extraits sont de nature plus solubles dans le méthanol que dans l'acide acétique, la chose qui facilite leur élution.

En l'absence de témoins authentiques, il nous est pas possible à ce stade, de confirmer avec exactitude leurs identités. Néanmoins, on peut dire qu'il pourrait s'agir soit de Flavonol de type kaempférol, isorhamnétine soit de flavones de type apigénine (Wagner.H., Sabine B.,1996).

Le premier flavonol sa fluorescence est rose en lumière U.V son comportement chromatographique révèle un $R_f = 0.73$ et qui pourrait correspondre au kaempférol ou à l'isorhamnétine.

Le deuxième flavone sa fluorescence est jaune en lumière U.V son comportement chromatographique révèle un $R_f = 0.50$ et qui pourrait correspondre à l'apigénine (Wagner H. et Bladt S., 1996).

L'analyse de l'extrait au méthanol semble indiquer la présence d'un troisième flavonoïde (G2) sa fluorescence est rose un peu foncée en lumière U.V son comportement chromatographique révèle un $R_f = 0.58$, mais ce dernier n'a pas été identifié et il nous est impossible, de confirmer son identité (absence de standard et de témoins authentiques). Le chromatogramme de la figure 174 montre un spot ($R_f = 0,58$) qui n'a pas été identifié mais il semble être identique à celui de la rutine dans l'extrait méthanoïque, mais cela reste à vérifier par des témoins authentiques.

Ces flavonoïdes ont déjà été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Lee et al (2005) ont montré la présence d'isorhamnétine-3-O-glucoside lors de la préparation d'extraits au méthanol de la plante *Salicornia herbacea*. Afin d'identifier le

contenu en flavonoïdes des pommes, Schieber et al (2002) ont réalisé une extraction à l'acétone de broyats de pommes. Après centrifugation de l'extrait obtenu le culot a été repris dans l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue a ensuite été extraite à l'acétate d'éthyle dans lequel la présence d'isorhamnétine-3-O-glucoside et d'autres flavonoïdes a pu être mise en évidence. Une autre étude a montré la présence de l'isorhamnétine-3-O-glucoside dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de la plante *Amyena scandens* (Gariboldi et al., 1998). Zhang et al (2007) ont effectué une extraction au méthanol de feuilles de *Ginkgo biloba* afin de concentrer les flavonoïdes parmi lesquels ils ont pu identifier l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Rigano et al (2007) ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait au méthanol de la plante *Marrubium globosum* dont l'isorhamnétine-3-O-glucoside et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Ces deux flavonoïdes ont été également identifiés et purifiés à partir de l'extrait au méthanol de *Melilotus neapolitana* par Fiorentino et al (2007).

En fin, après l'analyse de nos résultats obtenus, la C.C.M confirme la présence et la richesse des fraises en produits flavonoïques déjà mis en évidence préalablement par des tests phytochimiques par d'autres travaux antérieurs (Ribéreau-Gayon. P, 1968) et par les techniques spectroscopiques les plus sophistiquées telle que (RMN ¹H RMN ¹³C et GC/SM) (Voirin, B. 1983).

3 – Analyse par HPLC/MS des extraits bruts de fraise.

Dans cette partie expérimentale, nous allons essayer de présenter certaines substances chimiques de l'extrait de fraise et montrer par analyse instrumentale l'existence des principaux composés chimiques et même identifier la structure chimique, par exemple la catéchine qui est considérée comme un important antioxydant. L'analyse instrumentale présentée ci-dessous est la LC-MS d'un extrait de fraise.

Tout d'abord, la fraise est avant tout composée d'eau (90% de la matière fraîche). Les principaux nutriments (lipides, glucides, protéines) sont présents en faible quantité. Les esters, tels les butanoates et les hexanoates de méthyle et d'éthyle, seraient également d'importants contributeurs à l'arôme de ce fruit.

La maturation de la fraise entraîne une accumulation de plusieurs sucres et d'acides organiques en plus des composés volatils qui constituent son arôme. La petite note acidulée est due à la présence plus ou moins importante d'acides organiques, principalement les acides citriques et maliques.

D'une manière générale, les acides phénoliques (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques) sont majoritaires dans la fraise, suivis des anthocyanes, des flavonols et des flavan-3-ols. Parmi les acides phénoliques, l'acide ellagique et les dérivés de l'acide coumarique sont généralement prépondérants. Si la pelargonidine-3-glucoside est l'anthocyane majeur dans la fraise, la présence de cyanidine-3-glucoside et de pelargonidine-3-acétyl glucoside a également été rapporté.

Parmi les autres composés, figurent généralement des dérivés de la quercétine et du kampférol (flavonols), ainsi que de la catéchine et des procyanidines (flavan-3-ols). Ces derniers composés peuvent également être présents en grande quantité mais sous forme condensée (proanthocyanidines).

3.1 – Analyse par couplage instrumentale : LC-MS

Une des techniques les plus utilisées pour l'analyse des formes chimiques des éléments trace est le couplage en ligne d'une séparation par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) avec une détection par spectrométrie de masse (LC-MS). Cette technique est en train de se généraliser dans de nombreux laboratoires car elle permet de répondre aux impératifs environnementaux, industriels et réglementaires, notamment en termes de performances analytiques.

En premier temps et pour montrer ce que l'instrumentation de chromatographie liquide couplée au spectromètre d'un mélange inconnu, nous avons pris un extrait d'analyse

chromatographique et le terminer par une analyse de l'histogramme de masse de deux substances du mélange supposé inconnu.

La spectrométrie de masse est une technique analytique qualitative de choix pour les composés organiques. Elle permet de recueillir des informations en vue d'élucider la structure des espèces présentes même en faible quantité dans un échantillon. Nous disposons d'un spectromètre de masse TQ 8050 couplé à un chromatographe en phase liquide (HPLC/MS) fonctionnant en routine, depuis 2017. Les analyses sont réalisées par Impact Electronique (EI). La durée moyenne d'une analyse est de trente minutes. Cet appareil peut également analyser des composés non volatiles par introduction directe au niveau de la source, sans passage par le chromatographe.

Le profil chromatographique de deux extraits bruts de fraise a été effectué grâce à des analyses par chromatographie liquide haute performance couplée à la masse (HPLC/MS). Ces tests sur les extraits bruts nous ont permis de visualiser quelques acides phénoliques et quelques composés flavonoïques.

Grâce à l'analyse en HPLC-SM, les spectres de masse des composés détectables ont été obtenus. Au total, douze molécules, appartenant aux familles des acides phénoliques et flavonoïdes, ont été potentiellement identifiées par leur masse et le temps de rétention (fig :).

La comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux présents dans une base de données constitue une aide à l'identification des composés. Les molécules arrivant dans la source sont ionisées par impact avec les électrons émis par le système d'excitation électrique. Les ions sont enfin détectés par un multiplicateur d'électrons.

3.2 – Echantillonnage analysé par LC-MS

Les analyses par HPLC/MS ont été réalisées en mode négatif. Deux extraits différents selon la méthode d'extraction appliquée ont été filtrés et analysés sur un système LC-MS de la série Shimadzu TQ 8050, équipé d'un échantillonneur automatique, un détecteur optique à balayage de longueurs d'ondes.

Les extraits ont été séparés sur une colonne remplie de 25 cm avec des phases mobiles composées d'eau ultra-pure et d'acétonitrile (2/98 v/v). La colonne a été autorisée à équilibrer 6 min entre les injections. Le débit de solvant était 0,25 ml / min et la température de la colonne était de 40 °C.

4 – Interprétation et comparaison de l'analyse LC-MS

Les chromatogrammes obtenus ont montré que le nombre de substances existantes sont à environ 12 composés. Ceci est pour les deux extraits. La différence est purement quantitative. L'extrait 1 est présenté sur la figure suivante. Par contre la séparation de l'extrait

2 est exprimée sur la deuxième figure.

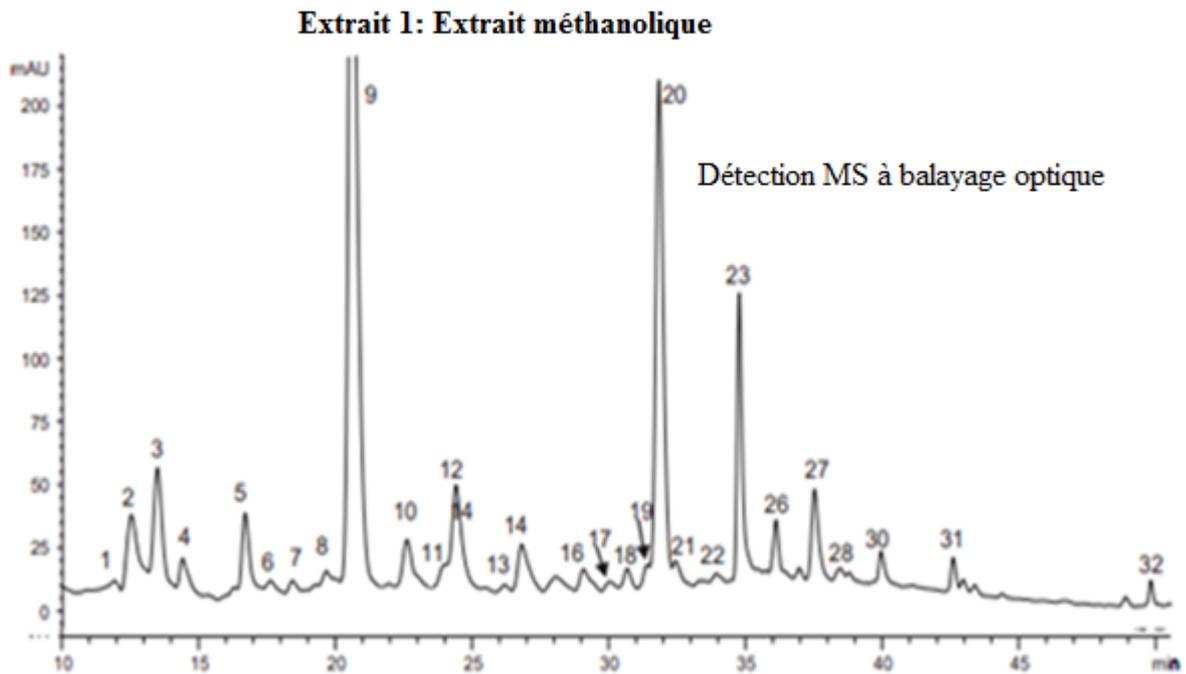


Figure 197 : Chromatogramme de l'extrait de fraise (1) obtenue par LC-MS à balayage d'ondes optiques.

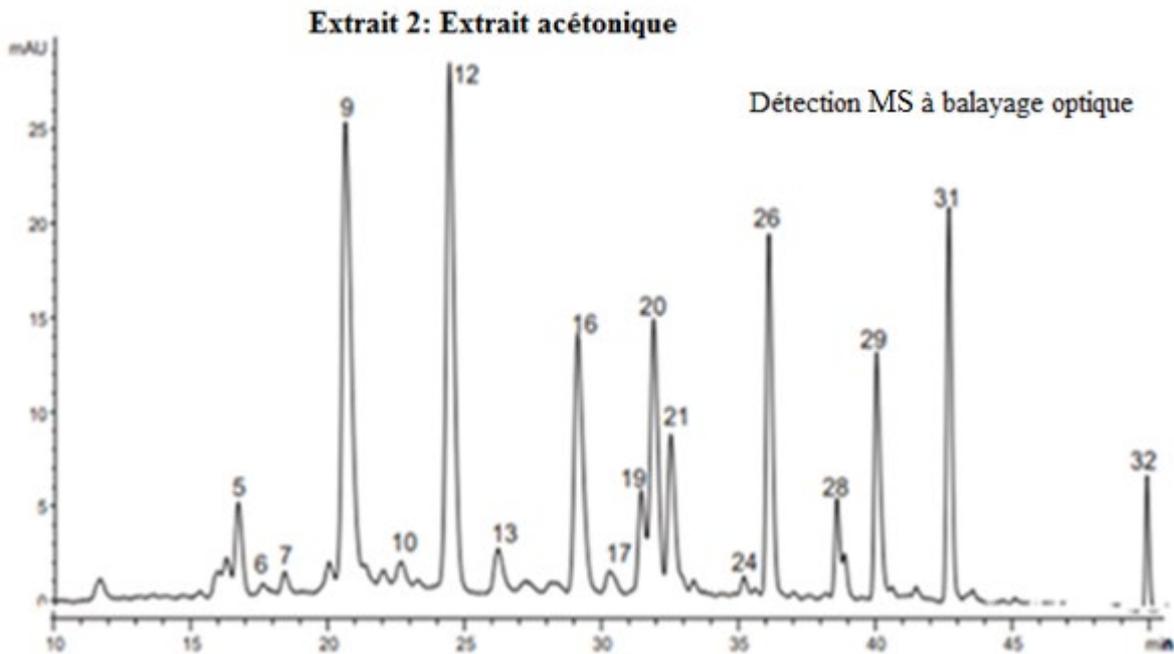


Figure 198 : Chromatogramme de l'extrait de fraise (2) obtenue par LC-MS à balayage d'ondes optiques.

Selon les deux figures, le nombre de substances est commun, 32 substances chimiques, mais nous devons le dire, que l'identification était vraiment difficile. Le tableau

ci-dessous contient un certains nombre limite de substances.

L'extrait de fraise est considéré comme des composés phénoliques qui ont été quantifiés par LC-MS. Selon les chromatogrammes et spectrogrammes obtenus, les anthocyanes ont été quantifiées comme pélagonidine-3-glucoside (à 520 nm), flavonols comme rutine (à 360 nm).

Les glycosides acides comme acide ellagique (à 360 nm), (+) - catéchine et anthocyanidines comme (+) - catéchine (à 280 nm), et les ellagitannines comme acide gallique (à 260 nm). Les hexoses de coumaroyl (à 320 nm) et le glucose Namoyl Cin (à 280 nm) ont été quantifiés en acide chlorogénique (à 320 nm).

La caractérisation des composés phénoliques ont été caractérisés et provisoirement identifiés sur la base de leurs spectres MS et la comparaison effectuée avec les références citées. Les chromatogrammes obtenues pour les deux extraits montrent l'ordre d'éluion des composés phénoliques et illustrent également la différence de profil phénolique entre les deux extraits de fraise.

Concernant les anthocyanes détectées (pics 6, 9, 10, 15, 20 et 25) étaient glucoside et malonylglucoside de la pélagonidine et de la cyanidine. L'analyse MS, cependant, a révélé la présence de (+) - catéchine (pic 4), trois dimères de procyanidine (masse 578, pics 1, 2 et 8), deux procyanidines trimères (masse 866, pics 3 et 4) et une procyanidine pentamère (masse 1442, pic 11). Les proanthocyanidines ont également été détectés (dans les pics 5 et 6). Aussi, quercétine - et kaempférol-3-glucuronide, pics 26 et 30, respectivement,

Six ellagitannins (pics 12, 13, 14, 18, 22 et 23) ont été détenus dans les fraises. Les ellagitannins de la fraise se composent de glucose estérifié avec de l'acide hexahydroxydiphène (HHDP) et de l'acide gallique

Nous avons trouvé également, un pentoside d'acide ellagique (pic 17), un côté désoxyhexo acide ellagique (pic 19), de l'acide ellagique (pic 21) et un acide méthyl ellagique. Le désoxyhexoside (pic 29) a été détecté dans les fraises.

Cette interprétation est soutenue par plusieurs références bibliographiques (Gu . L., 2003 ; Cheel.J., 2005 ; Anttonen.M.J, 2006 ; Aaby.R., 2007 ; Buendia.B., 2010 ; Michel, 2011, et Bulama et al., 2015). Les profils chromatographiques et ceux de la spectrométrie MS ont été comparés avec ceux cités dans la littérature et dans les banques de données disponibles, ainsi qu'une bibliothèque de molécules isolées et déjà identifiées (Mabry, 1970 ; Markham, 1982 ; Harkati,2011), afin d'attribuer les formules chimiques et les masses moléculaires de chacune des molécules susceptibles d'être retrouvées chez la fraise. La majorité des spectrogrammes des 32 substances ont été présentés dans ces références

bibliographiques.

Le tableau ci-dessous contient certaines caractérisations de quelques substances chimiques de l'extrait de fraise.

Tableau 48 : Caractérisation de certains composés de l'extrait de fraise

N° du pic	t_R (min)	λ_{max} (nm)	m/z	Identification	Référence
02	12.4	282	577	Procyanidin dimer	Gu . L., 2003 ; Cheel.J.,2005 Buendia.B., 2010
03	13.4	279	865	Procyanidin trimer	Gu . L., 2003 ; Cheel.J.,2005 Buendia.B., 2010
05	16.6	315	325	p-commaryol hexose	Anttonen.M.J, ,2006 Aaby.R., 2007 Buendia.B., 2010
09	20.6	501	433	Pelargonidin dimer	Buendia.B., 2010
12	24.3	240	449	Ferulic acid hexose	Gu . L., 2003 ;
23	34.7	243	934	Agrimoniin dimer	Gu . L., 2003 ;
26	36.0	256	477	Quercetine-3 glucuronide	Michel, 2011, et Bulama et al., 2015).
27	37.5	284	355	Cinamoysl glucose	(Mabry, 1970 ; Markham, 1982 ; Harkati,2011)

Ce tableau de valeurs contient les temps de rétention des substances, leurs masses et les longueurs d'ondes d'absorption pour chaque substance chimique de l'extrait.

4.1 – Exemple d'identification par SM de la catéchine

Ce type de molécule parmi les plus simples à identifier. La figure suivante représente un spectrogramme de masse d'une molécule de nature, purement, hydrocarbure oxygéné. L'extrait de notre fraise obtenu contient ce composé chimique.

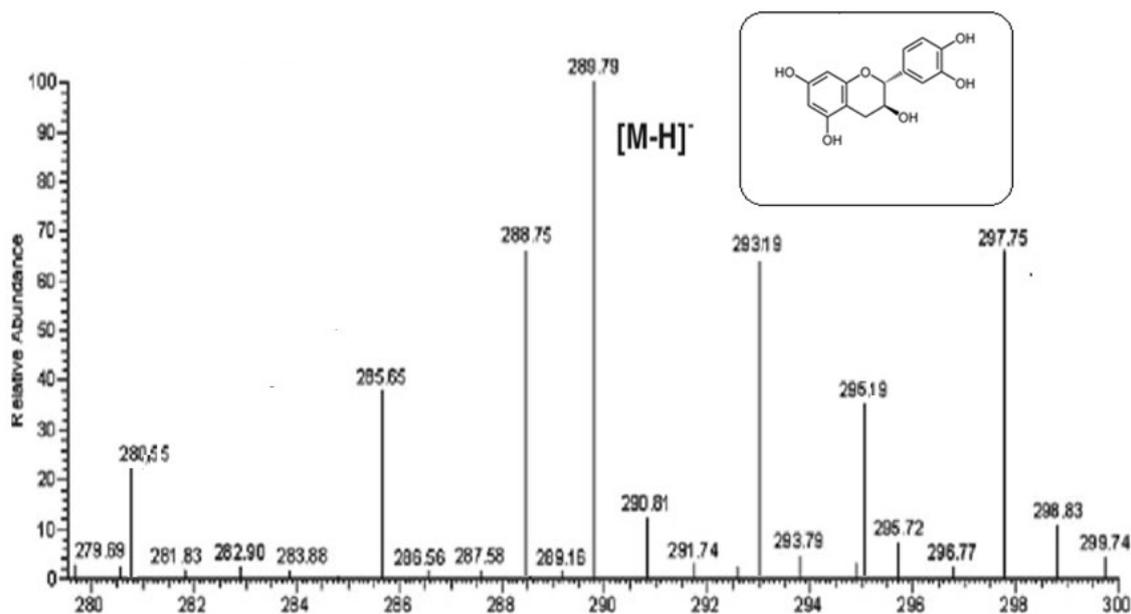


Figure 199 : Spectrogramme de la catéchine séparée par LC-MS.

Le tableau suivant rassemble les masses et abondances des fragments enregistrés.

Tableau 49 : Masses et abondances des fragments détectés par LC-MS de la catéchine.

m/z	A%	m/z	A%	m/z	A%	m/z	A%
17	4.7	53	3.3	78	3.5	110	5.9
18	28.7	54	2.7	79	1.2	118	1.4
26	2.0	55	7.9	80	1.0	122	3.0
27	4.4	56	1.2	81	2.6	123	51.8
28	7.3	57	2.7	82	2.6	124	20.6
29	2.4	60	1.2	83	1.6	126	5.2
32	1.2	63	2.9	84	1.4	138	5.0
34	2.4	64	1.2	85	1.4	139	100
38	1.7	65	4.3	91	1.6	140	8.7
39	7.6	66	2.4	93	2.3	157	47.1
40	5.6	67	2.7	94	2.2	153	4.4
41	4.7	68	2.6	95	2.6	163	2.9
42	3.6	69	9.5	96	1.4	167	4.4
43	3.9	71	1.1	97	1.8	290	26.5
44	2.3	73	1.0	98	1.1	291	4.1
50	2.7	75	1.0	105	2.3	292	0.65
51	9.0	76	1.5	106	1.3		
52	3.0	77	9.7	107	2.1		

L'étude de ces résultats pourraient nous mener à déterminer la masse molaire de la substance chimique, sa formule brute et même sa structure chimique.

4.1.1 – Détermination de la masse molaire de la molécule

Dans l'ensemble choisi, le pic M est pratiquement toujours supérieur en abondance devant le pic M^{+1} . Nous allons choisir, momentanément, l'ensemble des pics derniers, car le pic M est au-dessus de celui du M^{+1} .

Le tableau suivant rassemble les masses nécessaires avec les abondances relatives correspondantes. Une correction des abondances est effectuée parce que le pic de base (A% = 100%) n'est pas celui de la molécule inconnue.

Tableau 50 : Masses molaires et abondances de la molécule

	M	M^{+1}	M^{+2}
Masse molaire (g/mole)	290	291	292
Abondance relative %	26.5	4.1	0.65
Abondance relative corrigée %	100	15.47	2.45

4.1.2 – Détermination de la formule brute de la molécule

La procédure d'analyse numérique d'un spectromètre de masse peut être de la manière suivante :

4.1.2.1 – Existence des atomes spécifiques

Apparemment et pour une première analyse numérique, nous considérons qu'il n'existe ~~pas~~ un atome spécifique, parce que le pic $M+2$ a une abondance relative 2.45 %. Nous rappelons que les atomes spécifiques sont tous les atomes chimiques, sauf les suivants : C, H, O, N.

4.1.2.2 – Existence de l'atome d'azote (N)

Puisque la masse molaire de la molécule est paire, l'azote a des possibilités d'existence dans la formule brute comme chiffre paire : $N = 0, 2, \dots$. Nous commençons par $N = 0$.

4.1.2.3 – Estimation du nombre d'atomes de carbone (C)

L'atome de carbone a un effet d'abondance au niveau du pic ($M+1$). Chaque atome pourrait provoquer une abondance relative sur l'isotope carbone 13, estimée à 1.1 %.

Tableau 51 : Liste des abondances de quelques atomes chimiques.

Élément	Isotope le plus abondant		Abondance naturelle relative des autres isotopes			
Carbone	¹² C	100%	¹³ C	1.1%		
Hydrogène	¹ H	100%	² H	0.016%		
Azote	¹⁴ N	100%	¹⁵ N	0.38%		
Oxygène	¹⁶ O	100%	¹⁷ O	0.04%	¹⁸ O	0.20%
Fluor	¹⁹ F	100%				
Silicium	²⁸ Si	100%	²⁹ Si	5.10%	³⁰ Si	3.35%
Phosphore	³¹ P	100%				
Soufre	³² S	100%	³³ S	0.78%	³⁴ S	4.40%
Chlore	³⁵ Cl	100%			³⁷ Cl	32.5%
Brome	⁷⁹ Br	100%			⁸¹ Br	98.0%
Iode	¹²⁷ I	100%				

Par contre, l'abondance relative de l'hydrogène au niveau du même pic est environ 0.015%, seulement. Pour cette raison, on néglige l'hydrogène au niveau de ce pic. Donc, normalement, le nombre d'atomes de carbone se calcul de la manière suivante :

$$Nb(C) = \frac{15.47}{1.1}$$

Selon cette dernière valeur, le nombre de carbone pourrait être 15 ou 16. Nous commençons par le nombre 15.

4.1.2.4 – Existence des atomes d'oxygène (O)

Il existe des atomes d'oxygène dans notre molécule parce que l'abondance relative de l'isotope oxygène est à environ 0.2% seulement, et parce que il y a un pic M+2 dont son abondance est à 2.45 %. Puisqu'au niveau de ce pic, l'abondance relative d'un atome d'oxygène est estimée à 0.2 %. Donc, normalement, le nombre d'atomes d'oxygène se calcul de la manière suivante :

$$A\%(M + 2) = \frac{[Nb(C) * A\%(C)]^2}{200} + Nb(O) * A\%(O)$$

De cette relation, nous pourrions estimer le nombre d'atomes d'oxygène de la molécule tout en connaissant l'abondance du pic M+2 et le nombre de carbone avec leur abondance.

$$Nb(O) = \frac{1}{A\%(O)} \left[A\%(M + 2) - \frac{Nb(C) * A\%(C)^2}{200} \right]$$

Si nous effectuons le calcul suivant :

$$Nb(O) = \frac{1}{0.2} \left[2.45 - \frac{(15 * 1.1)^2}{200} \right]$$

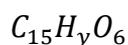
Donc, le nombre d'atomes d'oxygène est égal à :

$$N(O) = 6.0$$

Le nombre d'atomes d'oxygène soit égal à 6.

4.1.2.5 – Estimation du nombre d'atome d'hydrogène

La détermination du nombre d'hydrogène se faisait par la masse molaire de lamolécule. Nous rappelons que la formule brute devrait être de la forme suivante :

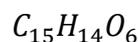


$$(C_{15}H_yO_6) = 15 * 12 + y + 6 * 16 = 276 + y = 290$$

En conséquence, le nombre d'atomes d'hydrogène soit :

$$y = 14$$

La formule brute provisoire est comme suivante :



4.1.3 – Détermination de la structure de la molécule

Nous prenons les masses molaires de certains fragments et par la suite, déduire les masses molaires de leurs radicaux libres, ensuite prédire selon ces dernières masses molaires les structures partielles de notre molécule.

Une étude approfondie du tableau de fragmentations, ainsi un complément d'information comme le nombre d'insaturations, nous a ramené à conclure que la structure chimique de la molécule est la suivante :

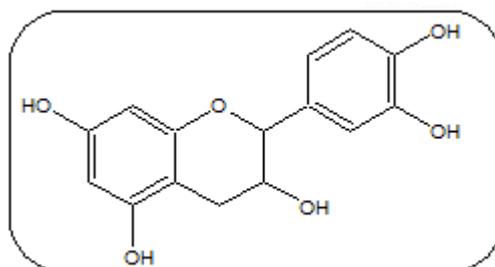


Figure 200 : Structure chimique de la molécule identifiée (catéchine)

5 – Conclusion

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'isolement et l'identification de quelques antioxydants naturels d'intérêt pharmacologique et biologique à partir des fraises. Ces composés ont des rôles très importants ce sont des antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux, anticancéreux et anti-spasmodiques.

Nos données analytiques ont montré la présence de différentes classes de composés phénoliques aussi bien par le fractionnement par chromatographie sur couche mince (CCM) que par l'analyse HPLC-MS.

Dans notre travail expérimental, nous avons aussi présenté une méthode de séparation et d'analyse moderne LC-MS. Notre extrait de fraise a été étudié et nous avons trouvé, environ, 32 substances chimiques. Mais nous avons trouvé des difficultés à interpréter les spectrogrammes MS. Une seule substance a été étudiée, il s'agit de la catéchine.

Seule la chromatographie qui a donnée une très bonne séparation des composés sous des conditions bien déterminées. Nous rappelons, aussi, que l'appareillage LC-MS n'est pas équipé des logiciels de reconnaissance des molécules comme la GS-MS.

Rappelons, aussi, que l'analyse GC-MS est pratiquement impossible avec ce type de solution, car il contient des substances qui ne sont pas volatils comme les sucres et ce type d'appareil a un système de chauffage des échantillons liquides jusqu'à la volatilisation pour effectuer une séparation en phase gazeuse.

La richesse en acides phénoliques ainsi que celle des flavonoïdes est remarquable. En effet, la séparation par CCM et par HPLC-MS des extraits de fraises ont montré la présence de composés de type flavonoïdes (catéchine, Kampférol et quercétine) et acides phénoliques et d'autres composés non-identifiés.

Ce travail mérite d'être approfondie afin d'optimiser les rendements d'extraction des composés phénoliques d'une part et d'autre part identifier les fractions obtenues par CCM, et par LC/SM, en adoptant de fines méthodes chromatographiques et spectroscopiques (GC/SM, TFIR et RMN ^1H et ^{13}C ...).

**5^{EME} PARTIE : EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'EMBALLAGE
SUR LES TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX, FLAVONOIDES,
TANNINS, ANTHOCYANES ET VIT C DE LA FRAISE.**

Cette partie englobe les résultats des différentes expériences réalisées ayant trait aux analyses quantitatives effectuées concernant l'effet de la température et de l'emballage sur les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins, anthocyanes et vitamine C. Par la suite nous allons vous faire part de l'ensemble de nos discussions concernant cette étude.

1-Aspect des fraises au cours du stockage :

Nous avons observé la variation de l'aspect extérieur des fraises au cours du stockage selon les différentes conditions. Nous nous sommes intéressés à deux critères, le premier concerne le moment de l'apparition des moisissures et le second l'apparition des rides par dessèchement. Nous résumons cet aspect économique critique dans le tableau suivant :

Tableau 52 : Variation de l'aspect extérieur des fraises avec le temps selon les différents modes de stockage.

<i>Mode de stockage</i>	<i>Apparition des moisissures</i>	<i>Apparition des rides</i>
FTA	3 jours	2 jours
FTAE	3 jours	2 jours
FR5	5 jours	4 jours
FR5E	3 jours	6 jours
FC20	-----	102 jours
FC20E	-----	112 jours

D'après ce tableau on remarque que :

Les fraises stockées à température ambiante (FTA et FTAE) et celles stockées au réfrigérateur avec emballage (FR5E) n'ont pas pu résister plus de 03 jours.

Les fraises stockées au réfrigérateur (5°C) sans emballage (FR5) ont pu résister 05 jours. Au-delà du 5^{ème} jour elles n'étaient plus consommables (Texture mole, apparition des moisissures et des rides).

Les fraises stockées à (-20°C) ont gardé leur aspect lisse et attirant jusqu'à la fin de la durée de nos expériences, après 110 jours les fraises ont été totalement dégradées et n'étaient plus utilisables (texture molle, noircissement, apparition des rides et dégradation totale) (voir Annexe 2).

2-analyses quantitatives

2.1- Dosage des Polyphénols totaux

2.1.1-Résultats du dosage des polyphénols totaux :

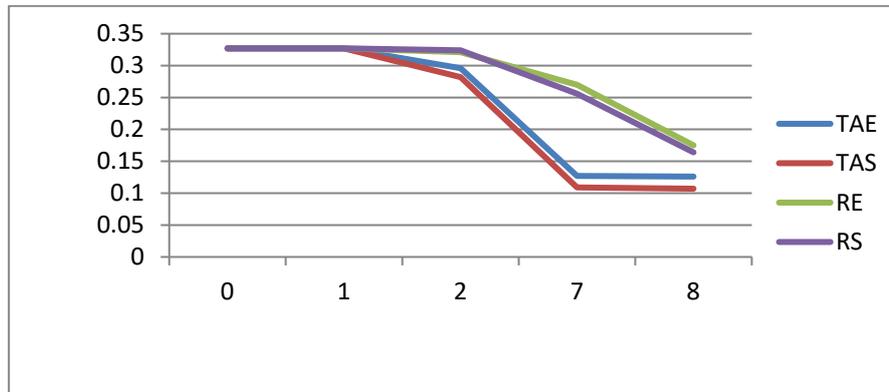


Figure 201 : variation du taux de polyphénols totaux des fraises stockées à température ambiante et à la réfrigération.

Concernant les résultats obtenus, pour le dosage des polyphénols totaux nous avons remarqué que les valeurs des taux en polyphénols ont diminué chez les fraises stockées à température ambiante, avec ou sans l'emballage à partir du premier jour (0.327 mg/ml) jusqu'au huitième jour (0.126 mg/ml et 0.107mg/ml) pour FTAE et FTAS respectivement.

Pour les fraises stockées à la température de réfrigération (+5°C) nous avons noté que les valeurs des taux en polyphénols ont diminué progressivement à partir de 0.327 mg/ml à 0.321mg/ml pour FRE et 0.324 mg/ml FRS au deuxième jour. Mais les valeurs initiales (1^{er} jour) ont atteint les plus basses teneurs en polyphénols totaux de 0.175 mg/ml et 0.164 mg/ml au huitième jour pour FRE et FRS respectivement.

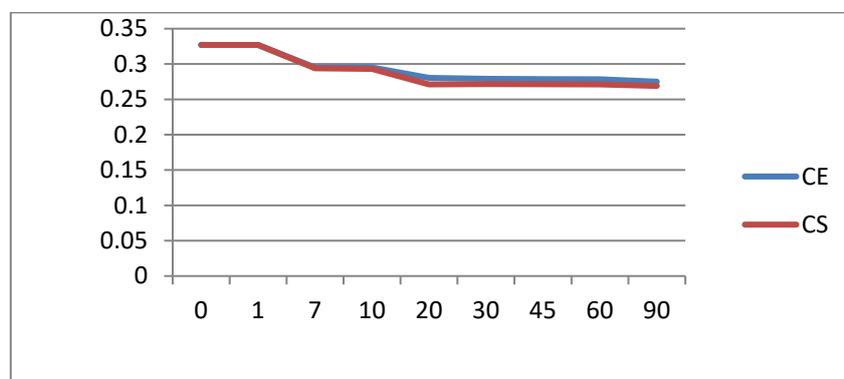


Figure 202 : variation du taux de polyphénols totaux des fraises stockées à (-15°C).

Pour les fraises stockées au congélateur où la température est de -15°C ; nous avons assisté à des diminutions de taux de polyphénols mais pas de grande quantité par rapport aux valeurs initiales. En effet, la valeur initiale a baissé de 0.327 mg/ml à 0.275 mg/ml et de 0.269mg/ml pour FCE et FCS respectivement.

2.1.2-Discussion des résultats du dosage des polyphénols totaux :

Nos résultats pour les polyphénols totaux, montrent que Les taux des polyphénols ont diminué avec le temps pour toutes les modalités de stockage, cependant ces résultats restent plus ou moins élevés. Ceci coïncide avec les résultats observés dans l'étude de **Pelayo et al. (2002)** pour 3 variétés de fraise étudiées (*Aromas, Diamante et Selva*) et pendant 2 semaines de stockage à $+5^{\circ}\text{C}$. Le résultat est le même pour les analyses qu'on a effectué et qui montrent que le temps a un effet très significatif dans toutes les modalités de conservation des fraises.

Selon **Babic et al, 1993** ; les produits phénoliques ont une faible accumulation dans le produit frais dans les conditions de production industrielle, Ceci est vrai dans nos résultats puisqu'aucune augmentation des composés phénoliques n'a eu lieu. Pour le stockage des fraises à la température ambiante et à réfrigération, le taux des polyphénols totaux a diminué pour atteindre des concentrations relativement basses à la fin de la durée du stockage.

Ancos et al. (2000a, b) ont montré qu'un stockage des baies au congélateur rapporte de légères diminutions du contenu phénoliques. Ce qui correspond à des valeurs proches des notre. En effet, les valeurs ont diminué de 0.327 mg/ml jusqu'à environ 0.275 mg/ml (une diminution d'environ 16%) donc même après 90 jours les taux n'étaient pas très bas par rapport aux taux initiaux, et cela avec ou sans emballage. Mais plus la durée augmente, plus les fraises stockées au réfrigérateur perdent plus de polyphénols que celles au congélateur.

En ce qui concerne les fraises stockées à -15°C , leurs concentrations en polyphénols totaux ont largement variées avec le conditionnement. Pour le mode sans emballage, les concentrations sont inférieures à celles qui étaient stockées avec emballage, mais cette différence n'est pas significative. Elle peut être due à la différence de lot ou à la maturité, puisque les concentrations des polyphénols sont généralement plus élevées dans les fruits non mûres à l'exception des composés d'anthocyanes qui sont généralement accumulés avec la maturation des fruits rouges (**Macheix et al, 1990**).

Nos résultats sont confirmés aussi par nos analyses statistiques, en effet dans tous les cas on a trouvé que l'emballage n'a aucun effet significatif sur le taux de polyphénols.

2.2. Dosage des flavonoïdes

2.2.1. Résultats du dosage des flavonoïdes :

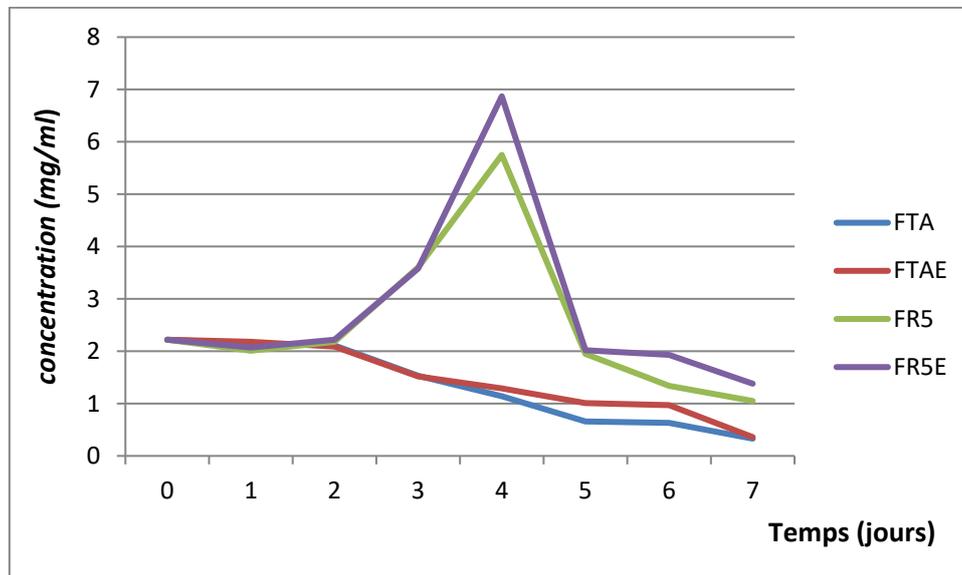


Figure 203: variation des teneurs en flavonoïdes (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)

Concernant la teneur en flavonoïdes, nous remarquons que leur contenu a diminué de manière significative après le 1^{er} jour pour atteindre des valeurs minimales au 7^{ème} jour (0.33 et 0.36 mg/ml) pour les deux modalités de stockage FTA et FTAE. Cependant nous remarquons aussi que l'emballage a peu influencé les résultats car les valeurs de FTA sont voisines de celles de FTAE.

Pour les fraises stockées au réfrigérateur (FR5 et FR5E) le taux reste à peu près stable pendant les deux premiers jours, néanmoins à partir du 3^{ème} jour une augmentation significative est constatée jusqu'à une valeur maximale de 5.75mg/ml pour FR5 et 6.87 mg/ml pour FR5E.

Au-delà du 3^{ème} jour, on a observé une chute de la teneur en flavonoïdes jusqu'au 7^{ème} jour de notre expérience et cela pour les deux modalités de stockage FR5 et FR5E. Cependant les fraises emballées avaient des teneurs un peu supérieures à celles non emballées.

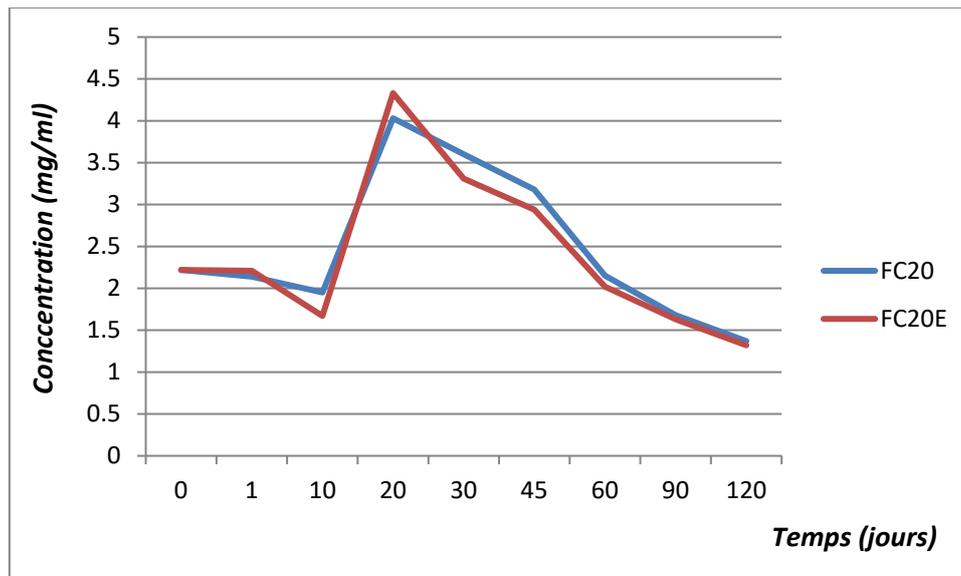


Figure 204 : Variation des teneurs en flavonoïdes (mg/ml) des fraises stockées à (-20° C)

Pour ce qui est des fraises stockées à la température (-20° C), on a noté une diminution non significative des teneurs en flavonoïdes avant le 10^{ème} jour. Cependant à partir de ce jour le taux des flavonoïdes augmente avec le temps et dépasse la valeur initiale pour atteindre 4.03 et 4.33 mg/ml pour FC20 et FC20E respectivement

A partir du 20^{ème} jour on a constaté une diminution sensible jusqu'au dernier jour de stockage pour les fraises emballées et non emballées.

Néanmoins, les fraises stockées à cette température (-20° C) sans emballage avaient des teneurs en flavonoïdes plus ou moins supérieures à celles stockées avec emballage.

2.2.2. Discussion des résultats du dosage des flavonoïdes

Il est important de signaler que les teneurs en composés phénoliques sont quelque fois élevés dans les organes jeunes et diminuent ensuite au cours de la croissance c'est le cas par exemple de l'acide caféoyltratrique du raisin dans la teneur passe par un maximum dans le jeune fruit puis décroît ensuite jusqu'à la maturation) et donc cette dernière est caractérisé par l'accumulation de plusieurs composés comme l'eau et les flavonoïdes ...etc. (Roudau. H, 2005 ; Macheix. J et al, 2005)

Nos résultats montrent clairement que le mode de traitement et le temps ont un effet significatif sur le taux des flavonoïdes dans les fraises.

Nos analyses montrent que pour la plupart des modalités étudiées il y avait une faible diminution de la teneur en flavonoïdes au premier jour suivie d'une augmentation de ce contenu avec le temps, surtout pour la réfrigération et la congélation.

Une diminution significative de la concentration des flavonoïdes apparaît pendant les huit jours de stockage pour les fraises stockées à température ambiante. De plus on a remarqué qu'il ya une légère différence de ce contenu entre les fraises emballées et non emballées.

A la température négative (-20° C) le taux des flavonoïdes a diminué le premier jour (avec et sans emballage) pour ensuite augmenter ver le 20^{ème} jour, cette augmentation pourrait être due à l'effet de concentration dans les fraises stockées au congélateur. Une étude entreprise par **Macheix. J et al en 1990**, affirme que des basses températures peuvent augmenter l'accumulation des flavonoïdes dans les fraises.

Les fraises sans emballage présentent de meilleures teneurs en flavonoïdes que les fraises avec emballage, mais cela n'a pas d'effet sur la durée de vie des fruits car les deux pouvaient résister plus de 110 jour. Ceci est peut être dû à la perte en eau dans les fraises non emballées, qui pourrait fausser ces résultats car les valeurs seraient augmentées par effet de concentration. Ceci affirme la théorie de (**Cordenunsi. B et al, 2003**) qui dit que l'évolution des flavonoïdes chez les fraises congelées dépend aussi de l'activité de l'eau du produit. De plus l'emballage n'est pas conseillé car nos résultats montrent que l'emballage n'influe pas ou peu sur le taux des flavonoïdes et n'a aucun effet sur le mode de traitement.

D'après nos résultats, un entreposage à (-20° C) semblerait être la température idéale pour maintenir une bonne apparence et une bonne qualité commerciale des fraises (**Collins. J et Perkins. P, 1993**)

2.3.Dosage des tannins

2.3.1.Dosage des tannins condensés

2.3.1.1.Résultats du dosage des tannins condensés

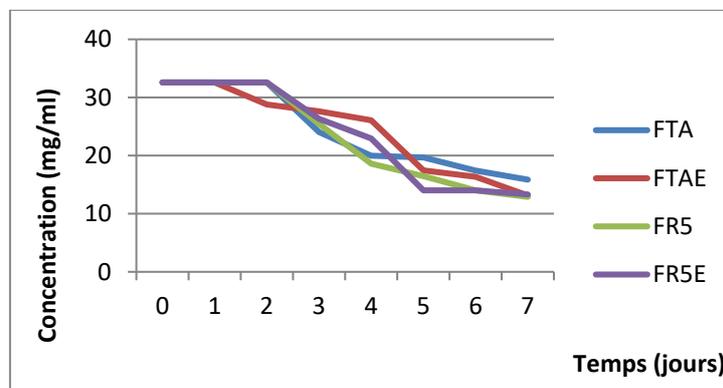


Figure 205 : variation des teneurs en tanins condensés (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)

Pour les fraises stockées à des températures positives, on note que le contenu en tannins condensés diminue avec le temps à partir du premier jour 32.58 mg/ml jusqu' au dernier jour de l'expérience où il atteint des valeurs très minimales (13.13 mg/ml, 15.86mg/ml et 12.90mg/ml, 13.31mg/ml). Vu la fluctuation des valeurs pour les différentes modalités de stockage (FTA- FTAE et FR5- FR5E), on peut conclure que l'emballage n'a aucun effet.

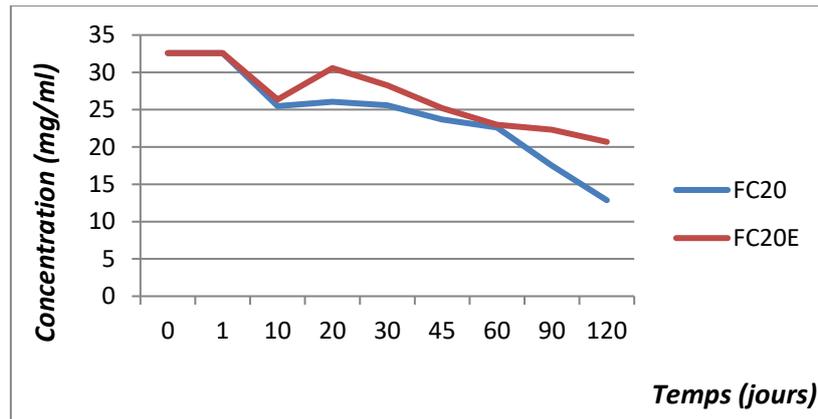


Figure 206 : Variation des teneurs en tanins condensées (mg/ml) des fraises stockées à (-20°C)

Pour les fraises stockées à la température négative (-20° C) on a remarqué que ce contenu en tanins condensés commence à diminuer jusqu'au 10^{ème} jour (25.48 mg/ml et 26.35 mg/ml) pour FC20 et FC20E.

Cependant une légère augmentation est relevée jusqu' à une valeur ne dépassant pas la valeur initiale. Il est à noter qu'une diminution en teneur de tanins condensés est observée durant le reste de temps.

Cependant les teneurs en tanins condensés des fraises emballées restent supérieures à celles non emballées contrairement aux flavonoïdes. Dans ce cas l'emballage a un effet sur la variation des taux en tanins condensés dans les fraises et doit être pris en considération.

2.3.2. Dosage des tanins hydrolysables :

2.3.2.1. Résultats du dosage des tanins hydrolysables :

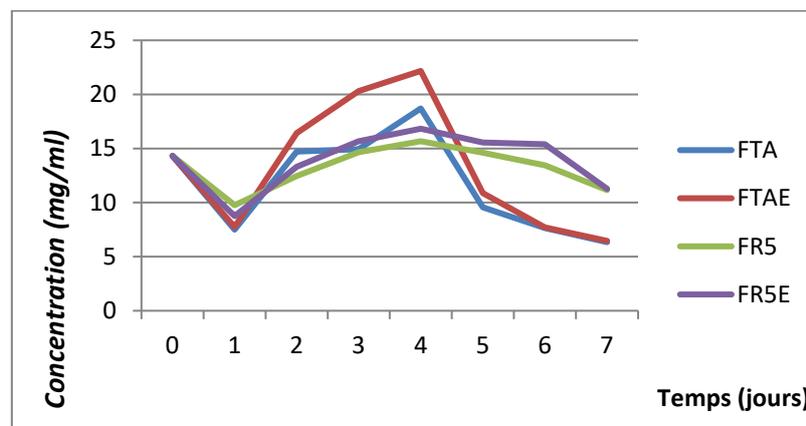


Figure 207: variation des teneurs en tanins hydrolysables (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à (+5°C)

Il est à noter qu'en ce qui concerne les fraises des modalités FTA et FTAE, FR5 et FR5E, accusent une réduction de taux des tannins hydrolysables au dessous de la valeur initiale 14.31 mg/ml, mais à partir du 2^{ème} jour de stockage ce contenu commence à augmenter jusqu'à une valeur maximale au 5^{ème} jour. Par la suite on assistera à une diminution des taux en tannins hydrolysables jusqu'au dernier jour.

Cependant les valeurs en teneurs des tannins hydrolysables des fraises emballées à température ambiante sont supérieures à celles non emballées et dans ce cas l'emballage est conseillé surtout pour une faible durée. Par contre les valeurs en teneur des tannins hydrolysables des fraises stockées au réfrigérateur (+5°C) sans emballage sont voisines de celles stockées avec emballage à la même température. Dans ce cas l'emballage est déconseillé même pour une faible durée d'entreposage.

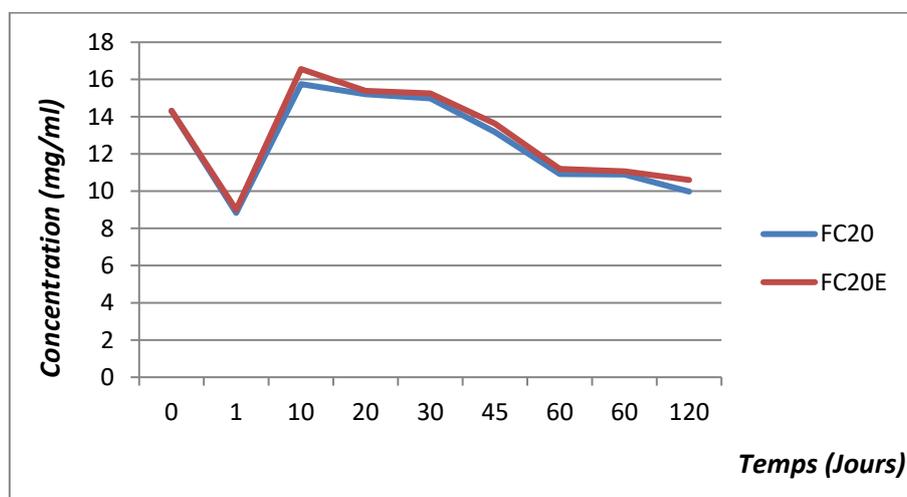


Figure 208 : Variation des teneurs en tannins hydrolysables (mg/ml) des fraises stockées à (-20°C)

Une diminution de taux des tannins hydrolysables est observée pour les modalités de stockage FC20 et FC20E dans le premier jour de stockage 8.34 mg/ml et 9mg/ml respectivement, mais à partir du 10^{ème} jour on observe une augmentation progressive jusqu'à un seuil de 15.75 mg/ml et 16.56 mg/ml. Au-delà du 10^{ème} jour une chute en teneur en tannins hydrolysables est observée jusqu'à la fin de nos expériences.

Les valeurs en taux de tannins hydrolysables restent très voisines pour les deux modalités de stockage (FC20 et FC20E) et l'emballage dans ce cas n'a aucun effet et n'est pas conseillé même pour une durée d'entreposage très longue (4 mois), sauf si l'aspect commercial est pris en considération, car les fraises avec emballage sont meilleures du point du vue forme et aspect (Texture des fruits).

2.3.3. Discussion des résultats du dosage des tanins

Sur le plan théorique la teneur en composés phénolique dans les fruits et les légumes peuvent variés de façon plus au moins importantes en fonction des conditions environnementales telle que la température et le rayonnement et le mode de production, le mode de stockage...etc. **(Combris. P et al, 2008)**

Dans notre étude on a observé que le taux en tanins condensés diminue avec le temps pour les fraises stockées à des températures positives durant toute la période de stockage, par contre on a remarqué une réduction dans les premiers jours suivie d'une augmentation de la teneur en tanins hydrolysables ensuite une diminution une fois encore de ce contenu jusqu'au dernier jour de stockage.

La forte accumulation de ces composés et la diminution simultanément des tanins au cours de la maturation sont à l'origine de la chute remarquable de l'astringence qui intervient lors de cette période de la vie de fruit. **(Macheix. J et al, 2005)**

La diminution de l'astringence peut également résulter de l'immobilisation des tanins avec l'acétaldéhyde qui s'accumule dans certains fruits au cours des phases terminales des fruits **(Macheix. J et al, 2005)** et selon une étude faite par **Goldstein et Swain en 1963**, ils concluent qu'au cours de la maturation, la réduction de l'astringence s'explique par une augmentation de la polymérisation. De plus la présence des moisissures entraîne la dégradation des tanins condensés.

En ce qui concerne les fraises stockées à température négative (-20° C) on a assisté à une chute des teneurs en tanins condensés et hydrolysables dans les premiers jours de dosage pour être ensuite augmenté vers une valeur maximale à partir du 20^{ème} jour de l'expérience et ce ci est confirmé par nos résultats.

La teneur élevée en tanins dans les fruits et les plantes leur confèrent de nombreuses vertus médicinales (effets contre les états d'inflammation). Très légèrement antiseptiques, ils peuvent gêner le développement de certaines maladies **(Schmelzer. G et al, 2008)**

Cependant le choix de la température du stockage avec ou sans emballage devrait être réalisé, après avoir défini l'usage ultérieur des fruits et le nombre de jour nécessaire pour le stockage.

2.4. Dosages des anthocyanes

2.4.1- Résultats des dosages des anthocyanes :

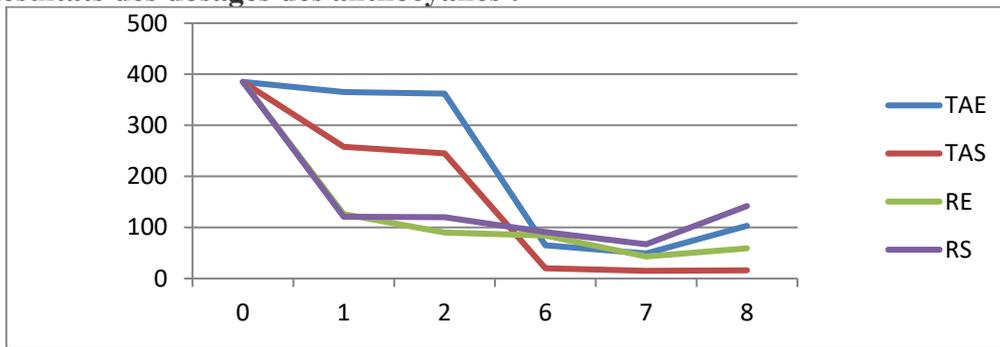


Figure 209 : variation du taux des anthocyanes des fraises stockées à température ambiante et à la réfrigération

En ce qui concerne la teneur en anthocyanes, le contenu a diminué de manière significative après le premier jour (385 mg/ml) pour les fraises stockées à la température ambiante avec ou sans emballage.

Pour les fraises stockées à +5°C, on note aussi une diminution du taux des anthocyanes pendant toute la durée du stockage (jusqu'au huitième jour : 59 mg/ml et 142 mg/ml avec et sans emballage respectivement) où les fraises n'étaient plus utilisables. Cependant les fraises non emballées avaient des teneurs largement supérieures à celles emballées

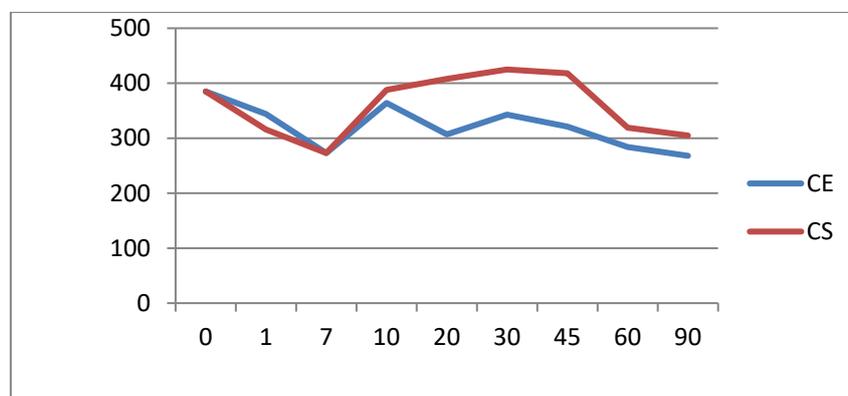


Figure 210 : variation du taux des anthocyanes des fraises stockées à la congélation (-20°C)

Pour les fraises stockées au congélateur, on note une diminution de l'anthocyane dans les premiers jours (de 385 mg/ml à 273 mg/ml au septième jour), mais à partir du 10 jour, le taux des anthocyanes augmente avec le temps et dépasse la valeur initiale pour atteindre 388 mg/ml. Cependant à partir de 90 jour les fraises n'étaient plus utilisables pour nos expériences

car elles avaient perdu leurs aspects attirants et ne sont plus commercialisables. Il est à noter que pour les FCS, les valeurs étaient largement supérieures aux autres modalités.

2.4.2- Discussion des résultats du dosage des anthocyanes :

Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits, atteignant un maximum puis diminuent (**Beatriz. R, 2004**). Nos analyses statistiques montrent que le mode de traitement et le temps ont un effet significatif sur le taux d'anthocyane.

Nos résultats montrent clairement, que pour la plupart de nos modalités, il y avait une baisse de la teneur en anthocyane au premier jour, suivie d'une augmentation des taux d'anthocyane (pour la congélation).

Cette augmentation pourrait être due à l'effet de concentration dans les fraises stockées au congélateur. **Macheix et al, 1990** ; affirment que des basses températures peuvent augmenter l'accumulation des anthocyanes dans les fruits. Avec ou sans emballage, d'après l'observation générale des modalités, nous pouvons dire que les basses températures, maintiennent des teneurs stables en anthocyanes.

Une diminution apparente de la concentration d'anthocyanes est visible pendant les 8 premiers jours à température ambiante et à la réfrigération (+5°C). Il est à noter que les fraises stockées au réfrigérateur sans emballage avaient des taux légèrement différents de ceux avec emballage.

On assiste à une terrible chute des teneurs en anthocyanes des fraises stockées à 5°C et cela avec ou sans emballage dès le premier jour pour atteindre enfin des valeurs très minimales vers le 8^{ème} jour. Il semble donc que le choix de cette température n'est pas efficace pour les fraises même pour une petite durée de conservation.

A -20°C, le taux d'anthocyane a diminué le premier jour (fraises avec et sans emballage) pour ensuite augmenter vers le 20^{ème} jour.

Les fraises sans emballage présentaient de meilleures teneurs en anthocyanes que les fraises avec emballage, mais cela n'a pas eu d'effets sur la durée de vie des fruits, car les deux pouvaient rester plus que 90 jours. Ceci est peut être dû à la perte en eau dans les fraises non emballées, qui pourrait fausser ces résultats car les valeurs seraient augmentées par effet de

concentration. Ceci affirme la théorie de **Cordenunsi et al. 2003** ; qui dit que l'évolution des anthocyanes chez les fraises congelées dépend aussi de l'activité de l'eau du produit.

L'emballage dans ce cas n'est pas conseillé car les valeurs sans emballage sont supérieures à celles avec emballage sauf si l'aspect commercial est pris en compte ; les fraises avec emballage sont meilleures du point de vue forme et aspect.

Nos résultats sont en accord avec nos analyses statistiques, on trouve que l'emballage n'influe pas ou peu sur le taux d'anthocyanes, et n'a aucun effet sur le mode de traitement.

D'après nos résultats, un entreposage à -15°C semblerait être la température optimale pour maintenir une bonne apparence et une bonne qualité commerciale des fraises (**Collins et Perkins, 1993**). Cependant le choix de la température du stockage avec ou sans emballage, devrait être réalisé, après avoir défini l'usage ultérieur des fruits et le nombre de jour nécessaire pour le stockage. Par exemple ce n'est pas nécessaire de stocker des fraises à -20°C et -30°C car ce n'est pas un choix économiquement rentable. Nos résultats suggèrent que pour l'anthocyane, un stockage à très basses température (à -30°C) n'est pas très nécessaire, car un stockage à -20°C avait presque les mêmes effets que celui à de très basses températures.

2.5. Dosage de la vitamine C par spectrophotométrie (UV)

2.5.1. Résultats du dosage de la vitamine C par spectrophotométrie (UV)

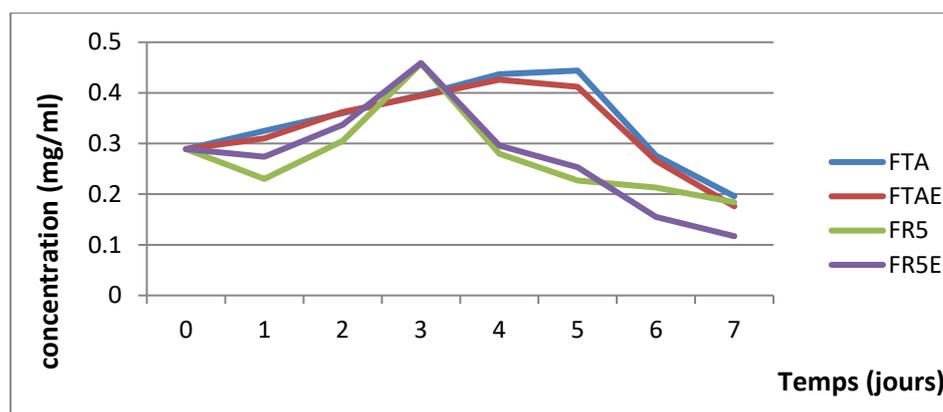


Figure 211 : Variation des teneurs en vitamine C (mg/ml) des fraises stockées à température ambiante et à ($+5^{\circ}\text{C}$).

Pour les fraises stockées à température ambiante, le taux de vitamine C a augmenté progressivement après le premier jour de 0,289 mg/ml jusqu'au cinquième jour de l'expérience, puis on a observé une diminution progressive jusqu'au dernier jour pour

atteindre des valeurs de 0.196 et 0.176 mg/ml pour les modalités FTA et FTAE respectivement (Figure 211).

Concernant, les fraises stockées à température (5°C), nous constatons une diminution progressive dès le premier jour de dosage jusqu'à des valeurs au dessous de celles initialement remarquées, notamment pour les fraises stockées sans emballage. Par la suite, on note une augmentation du taux de vitamine C jusqu'au troisième jour à des valeurs maximales de 0.458 mg/ml et 0.459 mg/ml pour les deux modalités sans et avec emballage (FR5 et FR5E). Ce taux en vitamine C va être réduit une fois encore jusqu'au dernier jour de dosage pour atteindre des valeurs très inférieures à celles observées le 1^{er} jour (Figure 211).

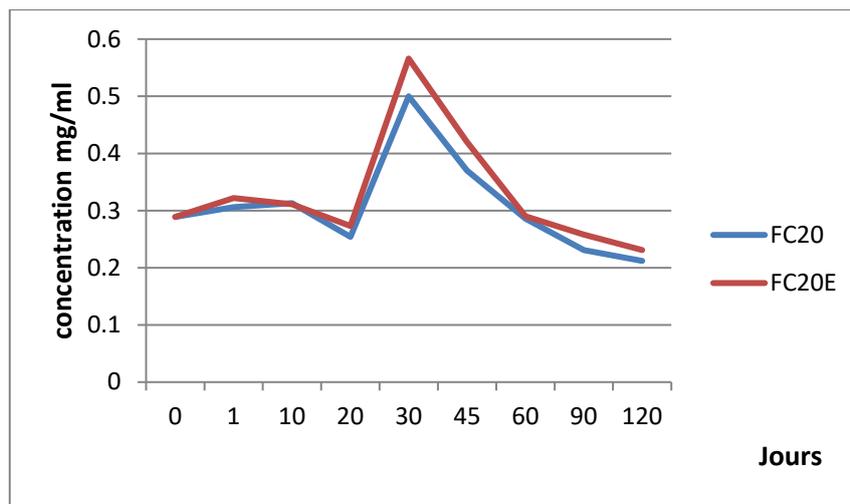


Figure 212: Variation des teneurs en vitamine C (mg/ml) des fraises stockées à (-20° C).

D'après nos résultats, nous remarquons une augmentation du contenu en vitamine C du 1^{er} jour au 10^{ème} jour. Au-delà de ce jour nous avons assisté à des baisses significatives en vitamine C jusqu'au 20^{ème} jour pour atteindre des valeurs inférieures aux taux initiaux (Figure 212).

Un maximum en taux de vitamine C a été obtenu vers le 30^{ème} jour pour les deux modalités de stockage (FC20 et FC20E). Nous remarquons aussi, qu'après 45 jours de stockage le contenu en vitamine C, commence à diminuer progressivement jusqu'au dernier jour de nos expériences.

Nos résultats montrent clairement qu'à (-20°C) les taux obtenus sont largement supérieures par rapport aux autres modalités surtout pour la modalité (FC20E) de plus les valeurs restent supérieures aux autres modalités même après 90 jours de stockage (Figure 212). Atkinson C. J 2006.

2.5.2 – Discussion des résultats du dosage de la vitamine C :

Généralement plus la température diminue plus la durée de conservation est prolongée. En effet, les fraises stockées à température ambiante n'ont pas pu résister plus de 03 jours (72 heures) et pour les modalités FR5 et FR5E les fraises n'étaient plus consommables après 8 jours par contre une durée de vie de 120 jours a été obtenue chez les fraises stockées à (-20°

C) avec et sans emballage. Nous avons remarqué que l'emballage n'était pas important pour toutes les modalités de stockage.

En raison de l'importance de la fraise comme une excellence source de vitamine C dans le régime alimentaire humain, la vitamine C a été analysée et d'après nos résultats, nous avons remarqué que les taux de vitamine C varient de façon significative selon les températures utilisées, et suite aux analyses que nous avons effectuées sur la variation du contenu des fraises en vitamine C, nous avons constaté qu'à température ambiante nous avons obtenu une augmentation durable de ce contenu. Ainsi, il y'a lieu de signaler que ces fraises n'ont pas pu résister plus de trois jours à cette température (T.A) : la prolifération des moisissures en est la cause (Ezell. B ; Wilcox. M, 1959).

En ce qui concerne les fraises stockées à température de (+5°C) nous avons assisté à une diminution progressive jusqu'à des valeurs au dessous des valeurs initiales notamment pour la modalité FR5. Cette réduction est confirmée par une étude entreprise par Hakkinen et *al* en 1999 et qui stipule que ces pertes sont associées aux réactions de brunissement enzymatiques ainsi qu'à l'oxydation et la destruction de L-AA et sa transformation en autres formes oxydées comme ADA et ACGA et à la sensibilité de la vitamine C comme on l'a déjà mentionné précédemment que cette vitamine est facilement oxydable par de nombreux oxydants, en particulier le dioxygène de l'air (Davide k et *al*, 1990 et Latham. C. M, 2001).

Nos résultats montrent clairement qu'un stockage à (-20°C) est la meilleure méthode qui préserve le taux de la vitamine C, puisque les taux obtenus sont largement supérieurs aux autres modalités et surtout pour FC20E (la différence n'est pas significative). De même confirment nos résultats et proposent de stocker les fraises à des basses températures, pratique très avantageuse afin de conserver le contenu en vitamine C.

Pour la modalité FC20E l'augmentation du taux en vitamine C ne peut pas être attribuée aux pertes en eau, puisque les fraises étaient emballées (Nunes et *al*, 1995) et (Perez et *al*, 1998).

Nunes et *al* en 1995, ont précisé que les pertes en eau semblent avoir un effet négatif sur le contenu en vitamine C. Ils ont attribué ces pertes à l'oxydation de la vitamine C.

Barth et *al* en 1990, ont observé que chez les brocolis, les teneurs en vitamine C diminuent avec le temps de l'entreposage. Ils ont aussi observé une plus grande perte chez les brocolis non emballées que celles emballées.

D'après une étude entreprise en 1996 par Katsaboxakis et Papanicolaou, les deux chercheurs ont signalé que la conservation des fruits et légumes soit à l'état frais, soit à l'état congelé, entraîne des pertes plus ou moins importantes en vitamine C. Ceci est en accord, en partie avec nos résultats dans la plus part des cas pour nos différentes modalités.

De plus et d'après nos résultats, nous sommes arrivés à conclure que l'emballage n'a pas ou peu affecté les résultats puisque les allures des différentes modalités sont les mêmes pour les deux méthodes qu'on a adopté pour le dosage de la vitamine C.



Conclusion

générale

Durant cette étude, l'influence du solvant et de la méthode d'extraction a été observée sur les teneurs en antioxydants naturels ainsi que sur les composés phénoliques et l'évaluation de leur activité antioxydante dans la fraise, un fruit largement cultivé en Algérie.

Les échantillons ont d'abord été préparés puis extraits par des solvants de polarité différente, ce qui a permis de déterminer l'affinité des composés phénoliques pour le solvant utilisé ainsi que la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins et vit C.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'extraction assistée par ultrasons qui constitue un exemple de chimie verte. Cette technique, de nos jours exclusivement utilisée au laboratoire permet d'obtenir de manière simple et rapide un extrait présentant une composition chimique supérieure à celle obtenue par les méthodes conventionnelles.

Nous avons déterminé quantitativement, dans un premier temps, la teneur en composés phénoliques dans des extraits hydrométhanoliques, hydroéthanoliques, hydroacétoniques et hydroacétatiques ; obtenus par un assemblage entre des méthodes classiques (chauffage à reflux, soxhlet) et d'autres modernes telle que l'extraction assistée par ultrasons (sonication). La comparaison entre les modes d'extraction classiques et modernes est parfois délicate car les rendements obtenus par ultrasons assistée par micro-ondes (0,07-0,09%) sont très voisins à ceux obtenus par les méthodes dites classiques (0,17-0,39%).

La spectrophotométrie UV- Vis et la technique chromatographique couplée à la spectrométrie de masse étaient satisfaisantes pour l'identification de certaines substances comme les antioxydants et d'autres corps chimiques citées dans la partie expérimentale. Dans cette étude, nous avons présenté une méthode de séparation et d'analyse moderne LC-MS. Seule la chromatographie qui a donnée une très bonne séparation des composés sous des conditions bien déterminées.

Les différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques ont permis d'identifier la composition en familles des antioxydants polyphénoliques des fraises. La comparaison entre ces méthodes a montré que la chromatographie Liquide à haute performance couplée à la masse LC/MS est la plus efficace alors que la chromatographie sur couche mince CCM a été la moins efficace.

Notre extrait de fraise a été étudié et nous avons trouvé, environ, 32 substances chimiques. Mais nous avons trouvé des difficultés à interpréter les spectrogrammes MS. Une seule substance a été étudiée, il s'agit de la catéchine un flavonoïde appartenant à la famille des flavanols et qui présente des propriétés biologiques et pharmacologiques remarquables.

L'étude de l'activité antioxydante (test DPPH) a été aussi évaluée au cours de ce travail. Les résultats obtenus montrent d'une part que l'extrait hydro-acétonique a présenté le

rendement le plus élevé pour les polyphénols totaux et les tannins condensés, par contre les extraits hydro-éthanoliques et hydro-méthanoliques ont montré les rendements les plus élevés concernant les flavonoïdes et les tannins hydrolysables respectivement., d'autre part les méthodes d'extraction par sonication et par soxhlet sont classées comme les méthodes les plus sélectives pour l'extraction des flavonoïdes, des tannins hydrolysables et condensés, suivi par la méthode d'extraction par chauffage au reflux concernant les polyphénols totaux.

De plus, la fraise s'est avérée riche en composés phénoliques principalement les polyphénols totaux. En effet les analyses quantitatives de nos extraits ont montré des résultats importants pour le dosage des flavonoïdes et les tannins. Le pouvoir antioxydant de nos extraits a montré que les valeurs des IC50 sont élevées par rapport à celles trouvées pour la vitamine C.

Par la suite nous nous sommes intéressés au dosage par spectrophotométrie UV-visible de la catéchine. Dans notre recherche scientifique, nous avons montré qu'à une certaine dilution de l'extrait de fraise, le spectre dominant est celui des catéchines. En conséquence le dosage est possible par cette méthode. Les concentrations trouvées dans la littérature ont été comparées aux résultats trouvés de notre extrait de fraise.

Nous avons aussi, rendu possible la quantification de quelques minéraux et oligo-éléments par le biais de la X-ray fluorescence (XRF) et il s'est avéré que les fraise est un fruit très riche en ces éléments.

La température et l'emballage sont deux paramètres très importants pour la conservation des fruits et des légumes. En effet la gestion de la température est considérée comme le facteur le plus critique dans le maintien de la qualité nutritive des fruits et légumes. Les résultats trouvés soulignent bien cette importance et ils indiquent que les basses températures ont prolongé la durée de conservation de nos fraises induisant quelques petits changements de certains des paramètres de qualité étudiées. En effet, nous avons remarqué tout en long de la durée du stockage (4 mois) que nos fraises ont gardé leur aspect lisse et attirant à des températures très basses à savoir (-20°C). Cependant à température positives (T.A et 5°C) on a assisté à une sénescence rapide de nos fraises, ces dernières n'ont pas pu résister plus de 07 jours, durant les quels on a observé la prolifération des moisissures et l'apparition des rides (texture molle).

En ce qui concerne la vitamine C il est connu que plus la température est basse, moins sont les pertes en vitamine C, et plus la durée de l'entreposage est prolongée. Ceci est en accord avec nos résultats. De plus nos résultats montrent clairement qu'un stockage à température (-20°C) est la meilleure méthode qui préserve un taux en vitamine C puisque les taux obtenus sont largement supérieurs aux autres modalités. De plus à température (5°C) les

fraises n'étaient plus consommables après 08 jours pour les modalités avec et sans emballage. Par contre les fraises stockées à basse température (-20°C) pouvaient résister plus de 120 jours. De plus nous avons remarqué que l'emballage n'a pas d'influence sur la variation des teneurs en vitamine C puisque les valeurs des différentes modalités de stockage qu'on a étudiées étaient très proches.

Nos résultats montrent clairement que le mode de traitement et la durée de stockage ont un effet significatif sur le taux des flavonoïdes contenus dans les fraises. On remarque clairement que pour la plupart des modalités étudiées il y avait une faible diminution de la teneur en flavonoïdes au premier jour de dosage suivie d'une augmentation de ce contenu avec le temps, surtout pour la réfrigération et la congélation.

Les fraises sans emballage présentent de meilleures teneurs en flavonoïdes que les fraises avec emballage donc on peut conclure que l'emballage dans ce cas n'a aucun effet sur les variations du contenu en flavonoïdes.

En ce qui concerne les tannins, nous avons assisté à une diminution de la concentration des tannins condensés pour les fraises stockées à des températures positives durant les 08 jours de dosage, mais pour le dosage des tannins hydrolysables dans les fraises emballées et non emballées les résultats ont fluctué.

Cependant les teneurs en tannins condensés des fraises emballées restent supérieures à celles non emballées contrairement aux flavonoïdes. Dans ce cas l'emballage a un effet sur la variation des taux en tannins condensés. Par contre Les valeurs en taux de tannins hydrolysables restent très voisines pour les deux modalités de stockage (FC20 et FC20E) et l'emballage dans ce cas n'a aucun effet.

Nos résultats suggèrent que pour assurer une meilleure qualité nutritive, un stockage à de très basses températures n'est pas très nécessaire pour une faible durée d'entreposage (une semaine) Cependant la diminution de la température a plus effet sur la durée de vie de la fraise que sur les taux des matières nutritives. L'emballage n'avait pas beaucoup d'influence sur les résultats, mais dans certain cas il pouvait augmenter la durée de vie de nos fraises.

Enfin, nous pouvons conclure que les fraises sont de bonnes sources d'antioxydants principalement les composés phénoliques possédant un pouvoir antioxydant important, la chose qui nous amène à dire que les fraises peuvent contribuer à prévenir les maladies cardiovasculaires, les cancers et les problèmes liés au vieillissement causées par le stress oxydant.

Concernant la conservation des fraises à des températures basses, Nous sommes donc arrivés à conclure que l'emballage à froid (-20°C) est une méthode très efficace pour conserver les

fraises, car aucun changement délétère n'a été observé concernant les qualités sensorielles et nutritionnelles. De plus le choix de la température et l'emballage, devrait être réalisé, après avoir défini l'usage ultérieur des fruits et le nombre de jours nécessaire pour le stockage.

Ce travail ouvre bien sur de nouveaux axes promoteurs dans un futur proche, pour essayer d'isoler et d'identifier par méthodes spectroscopiques et chromatographiques (GC/MS et LC/MS) les composés responsables de l'activité antioxydante et qui est fortement constatée chez les fraises. L'utilisation des méthodes chromatographiques et spectroscopiques dans l'identification des familles des antioxydants naturels polyphénoliques dans les extraits de fraises devra être poursuivie afin de normaliser ces méthodes qui pourraient constituer une alternative intéressante à la méthode de criblage phytochimique très utilisée actuellement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aaby, K., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4395–4406.
- Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4032–4040.
- Aaby, K., Wrolstad, R. E., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5156–5166.
- Anttonen, M. J., Hoppula, K. I., Nestby, R., Verheul, M. J., & Karjalainen, R. O. (2006). Influence of fertilization, mulch colour, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2614–2620.
- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11 (34): 261-265.
- Aghababae, S. K., *et al.* Effects of blackberry (*Morus nigra* L.) consumption on serum concentration of lipoproteins, apo A-I, apo B, and high-sensitivity-C-reactive protein and blood pressure in dyslipidemic patients. *J Res Med Sci*. 20, (7), 684-691 (2015).
- Amélie Gagné, Shu Qin Wei, William D. Fraser, Pierre Julien. Absorption, Transport, and Bioavailability of Vitamin E and its Role in Pregnant Women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2009, 31 (3) , 210-217. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34118-4](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34118-4)
- Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., Aguilar C N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78: 189-199.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l’oxygène et superoxyde dismutases μ rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. 74 : 636–643.
- Al-Harashseh, M. et Kingman, S.W. (2004). *Microwave-assisted leaching-a review*. *Hydrometallurgy*, 73(3-4) :189-203.
- Aliakbarian B., Fathi A., Perego P., & Dehghani F. (2012).** Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.
- Allaf k. , 1989 : Nouveau procédé de traitement par détente instantanée contrôlée de produits biologiques divers en vue de leur déshydratation. Recherche exploratoire. Abondement ANVAR – Gradient Publication de l’université de technologie de Compiègne N° SE/89/346. Rapport intermédiaire, décembre 1989.
- Allaf k. , louka n., bouvier j.m., parent f. et forget j.m. , 1994 : Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d’un tel procédé et produits ainsi réalisés, French patent n° 93/09728, 1993, International extension PCT FR 94/00975, 1994.
- Allaf, T., Mounirc, S., Tomao, V., Chemat, F., 2012. Instant controlled pressure drop combined to ultrasounds as innovative extraction process combination: Fundamental aspects. *Procedia Engineering*. 42, 1061-1078.

Allaf, A., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F., 2013. Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, 239-246.

Amiot MJ, Tacchini M, Aubert SY, Oleszek W. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1132–1137.

Arts I.C.W., Van de Putte B., Hollman P.C.H. (2000a). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1746-1751.

Arts I.C.W., Van de Putte B., Hollman P.C.H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit juices and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1752-1757.

Akhtar, N Ihsan-ul-Haq, Bushra Mirza. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/.../S187853521500032>.

Awor et Samseny R-R. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante traditionnellement utilisée comme poison d'épreuve au Gabon : le *Strychnos Icaja* Baillon (Mbundu), Loganiacée. Thèse, Université de Bamako, Faculté de Médecine, de Pharmacie Et d'Odonto - Stomatologie, Mali. 2003. Available on: http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis_Bamako/04P17.PDF. Available on : www.keneya.net/fmpos/theses/2006/pharma/pdf/06P18.pdf

Azar M, Verette E, Brun S. Identification of some phenolic compounds in bilberry juice *Vaccinium myrtillus*. *J Food Sci* 1987; 52: 1255–1257.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M, Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.A.H., Ghafoor, A., Norulaini, N.A.N., Omar, K.A.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117, 426-436.

B

Bacon J.D., Mabry T.J. and Mears J.A. 1976. UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Revue Latioam Quim*, 7: 83–86.

Bae, I.K., Ham, H.M., Jeong, M.H., Kim, D.H., Kim, H.J., 2015. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. *Food Chem*. 172, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.050>

Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M., 2006. Methods for the production of food grade extracts. *United States Patent Application*. 20060088627.

Bassomo, M.Y., Pegnyemb, D.E., Ngo Mbing, J. Atchade, D.T., Tih, R.G., Sondengam, B.L., Blond, A et Bodo, B. "flavonoides isolés des feuilles de *Ochna afzelii* et hémisynthèse des afzelodines a, b et c à partir de la dihydroflavone" *Science and Engineering Series Vol. 5, No. 1*, pp. 101 – 108 (2004)

Bakker, J., Bridle, P., & Bellworthy, S. J. (1994). Strawberry juice colour: A study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64, 31–37.

Buendia, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., et al. (2010). HPLC–MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916–3926.

Benamor, B. (2008). Maitrise de l'Aptitude Technologique de la Matière Végétale dans les Opérations d'Extraction de Principes Actifs; Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle.

Bhattacharya S. (2014). *Conventional and Advanced Food Processing Technologies*: John Wiley & Sons.

Bilyk A, Sapers GM. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry. *J Agric Food Chem* 1986; 34: 585–588.

Bonnaillie. C, Salacs. M, Vassiliova. E, Saykova. I ,Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L) *Revue de génie industriel* 2012, 7, 35-45

Boue, S., Wiese, T., Nehls, S., Burow, M., Elliott, S., Carter-Wientjes, C., Shih, B., McLachlan, J., Cleveland, T., « *Evaluation of the Estrogenic Effects of Legume Extracts Containing Phytoestrogens* », *Journal of Agriculture and Food Science*, vol. 53, n° 8, 2003, p. 2193–2199

Bruneton J, (1999) : pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition. Paris : édition médicinale internationales. Edition Tec & Doc Lavoisier. p1120.

Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Edition Lavoisier 2016. Available on : <https://rabelnutakuns.firebaseio.com/2743021659.pdf>

Badiaga M. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat 2011, P 74. Available on : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719564/document>.

BentabetLasgaa N. Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes *Fredolia aretioides* et *echium vulgare* de l'ouest algérien. Thèse de doctorat 2015, P 20-21. Available on : www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/.../6-1-53-637.pdf.

Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M et Dangles O, (1997): Molecular Interaction of phenolic compounds in relation to the color of fruits and vegetables. pp 30-49, in: phytochemistry fruits and vegetables proceeding of phytochemical society of Europe. Oxford, UK Clarendon Press.

Briante R., Patumib M., Febbriona F. et Nuccia R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed hyperthermophilic β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*. **111**(01): 67-77.

Bishnu P. Chapagain and Zeev Wiesman. MALDI-TOF/MS Fingerprinting of Triacylglycerols (TAGs) in Olive Oils Produced in the Israeli Negev Desert. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, **57** (4) , 1135-1142. <https://doi.org/10.1021/jf8025277>.

Bayala J., S. J. Ouédraogo, C. K. Ong. Early growth performance and water use of planted West African provenances of *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn (karité) in Gonsé, Burkina Faso. *Agroforestry Systems* 2009, **75** (2) , 117-127. <https://doi.org/10.1007/s10457-008-9167-9>.

Bruneton J. (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris*. pp 198-260.

Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. et Vlietink A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. **27**: 445-459.

Budić-Leto, I. and T. Lovrić (2002). "Identification of phenolic acids and changes in their content during fermentation and ageing of white wines Pošip and Rukatac." *Food Technology and Biotechnology* 40(3): 221.

- Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99** : 191–203.
- Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*, **2** (1): 43-52.
- Bors W., Michel C., Stettmaeir K., 1997. *Biofactors*., **6**, 343-355.
- Berset C., 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier, 29-50.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., 1990. *Method. Enzymol.*, **186**, 343-355.
- Bescançon P et al**, (2000) : Alimentation méditerranéenne et santé : actualités et perspectives. Jhon libbey Eurotex. Paris p110.
- Boussetta N. (2011)**. *Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de Champagne*. Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Boussetta N., Lanoisellé J., Bedel-Cloutour C., & Vorobiev E. (2009a)**. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, **95**(1), 192-198.
- Boussetta N., Lebovka N., Vorobiev E., Adenier H., Bedel-Cloutour C., & Lanoiselle J. (2009b)**. Electrically assisted extraction of soluble matter from Chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**(4), 1491-1497.
- Boussetta N., Lesaint O., & Vorobiev E. (2013a)**. A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **19**, 124-132.
- Boussetta N., Reess T., Vorobiev E., & Lanoisellé J. (2012a)**. Pulsed electric discharges: principles and applications to extraction of biocompounds. In Lebovka N., Vorobiev E. & Chemat F. (Eds.), *Enhancing extraction processes in the food industry* (pp. 145-172): Taylor & Francis - CRC press.
- Boussetta N., Turk M., De Taeye C., Larondelle Y., Lanoisellé J., & Vorobiev E. (2013b)**. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, **49**, 690-696.
- Boussetta N., & Vorobiev E. (2014)**. Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, **17**(3), 197-203.
- Boussetta N., Vorobiev E., Deloison V., Pochez F., Falcimaigne-Cordin A., & Lanoisellé J. (2011)**. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, **128**(2), 364-370.
- Boussetta N., Vorobiev E., Le L., Cordin-Falcimaigne A., & Lanoisellé J. (2012b)**. Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, **46**(1), 127-134.
- Boussetta N., Vorobiev E., Reess T., De Ferron A., Pecastaing L., Ruscassié R., & Lanoisellé J. (2012c)**. Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: Effect of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **16**(0), 129-136.
- Brat P., 2001** : Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation du fruits : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. URL : <http://technofruits2001.cirad.fr/fr/brat.htm> .
- Brazinha C., Cadima M., & Crespo J. G. (2014)**. Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Different Types of Grape Pomace Produced at Wineries and Distilleries. *Journal of Food Science*, **79**(6), E1142-E1149.
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M., & Velić D. (2007)**. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, **81**(1), 236-242.
- Bulama, J.S., Dangoggo, S.M., Mathias, S.N., 2015. Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of Terminalia glaucescens. *Int. J. Sci. Res. Publ.*

C

Cacace J., & Mazza G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68(1), 240-248.

Casas L., Mantell C., Rodríguez M., Ossa E., Roldán A., Ory I. D., Caro I., & Blandino A. (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 304-308.

Causse, M. and C. Renard (2008). "2. Les sources de variabilité des qualités nutritionnelles des fruits et légumes." Combris P. et al. Les fruits et légumes dans l'alimentation, enjeux et déterminants de la consommation. Paris: Ed Quae: 43-60.

Chira K., Such J., Saucier C., Teissèdre L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Ed :Springer*. 6 :75-82.

Carmen M. López-Ortiz, Soledad Prats-Moya, Ana Beltrán Sanahuja, Salvador E. Maestre-Pérez, Nuria Grané-Teruel, María L. Martín-Carratalá. Comparative study of tocopherol homologue content in four almond oil cultivars during two consecutive years. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008, 21 (2) , 144-151.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.09.004>. Vitamin E. 2007,, 119-191.
<https://doi.org/10.1201/9781420009750.ch3>

Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Saud, G., Caligari, P. D. S., & Schmeda- Hirschmann, G. (2005). E-cinnamic acid derivatives and phenolics from Chilean strawberry fruits, *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8512–8518.

César Kapseu, Divine Nde Bup, Clergé Tchiegang, Charles Fon Abi, Fernand Broto, Michel Parmentier. Effect of particle size and drying temperature on drying rate and oil extracted yields of *Bucchozia coriacea* (MVAN) and *Butyrospermum parkii* ENGL. *International Journal of Food Science & Technology* 2007, 42 (5) , 573-578.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01277.x>

Clifford M.N. (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida*. 41 (5): 393-397.

Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health*". *Ed. Goldberg*. pp: 27- 48.

Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.

Cuvelier M-E., 1992. *Thèse des Sciences ENSIA de Massy*.

Chacha. Musa, Gomotsang Bojase-Moleta, Majinda Runner R.T." Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stemwood of *Erythrina latissima* ". *Phytochemistry* 66 (2005) 99–104

Chakkaravarthi A., Math R., Walde S., & Rao D. (1993). Grinding characteristics of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Engineering*, 20(4), 381-389.

Chan E.W.C., Lim Y.Y., Chew Y.L., 2007. *J. Food Chem.*, 102, 1214-1222.

Cassidy, A., *et al.* High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation*. 127, (2), 188-196 (2013).

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.

Crout, D.H.G., Geissman, T.A., 1969. Organic chemistry of secondary plant metabolism. Freeman, Cooper and Co., San Francisco.

Crowell, P.L., Gould, M.N., 2004. Cancer Chemopreventive Activity of Monoterpenes and Other Isoprenoids, in: *Cancer Chemoprevention*. Springer, pp. 371–378.

Cheigh, C.I., Chung, E.Y., Chung, M.S., 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*. 110, 472-477.
Chemat F., Tomao V., Viot M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of Food analysis Instruments*. 85-103.

Chemat, F., Abert-Vian, M., Zill-e-Huma, 2009. Microwave assisted-separations: green chemistry in action. In: Pearlman, J.T. (Ed.), *Green Chemistry Research Trends. Nova Science Publishers Inc., United States*. 1-30.

Chemat F. (2011). *Éco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*: Dunod.

Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R., & Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.

Chen Y., Zhang X., Dai Y., & Yuan W. (2004). Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 34(1), 5-12.

Chen F., Sun Y., Zhao G., Liao X., Hu X., Wu J., Wang Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14 (6): 767-778.

Cho Y., Hong J., Chun H., Lee S., & Min H. (2006). Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 725-730.

Clevenger J.F., 1928 : Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, Vol. 17, pp : 336-341.

Choi, M. H., Shim, S. M., Kim, G. H. Protective effect of black raspberry seed containing anthocyanins against oxidative damage to DNA, protein, and lipid. *J Food Sci Technol*. 53, (2), 1214-1221 (2016).

Collin G. Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*, 2000; 13: 4-5.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technology*. 9, 85-91.

Craveiro A.A., Matos F.J.A., Alencar J.W. ET Plumel M.M., 1989 : Microwave oven extraction of an essential oil. *Flav. Fragr J*. 1989, Vol. 4, pp : 43 –44

Crublet Marie-Laure, long Christophe, venet, A.Hadi., Hamid ., Lavaud de Thierry Catherine . *Phytochemistry* 64 (2003) 589–594

Crouzet j. , 1998 : Arômes alimentaires. *Techniques de l'ingénieur F 4 100*, pp : 1 – 18

Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 590–595.

D

Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 23, (2), 174-181 (2012).

Dang Y. Y., Zhang H., & Xiu Z. L. (2013). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.

Daria Di Vincenzo,, Steve Maranz,, Arnaldo Serraiocco,, Raffaella Vito,, Zeev Wiesman, and, Giorgio Bianchi. Regional Variation in Shea Butter Lipid and Triterpene Composition in Four African Countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (19) , 7473-7479. <https://doi.org/10.1021/jf0509759>

Delattre, J., J.-L. Beaudoux, et al. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques)."

Divine Nde Bup, César Kapseu, Louis Matos, Bernard Mabiala, Zéphirin Mouloungui. Influence of physical pretreatments of sheanuts (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.) on butter quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, **113** (9) , 1152-1160. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100005>

Doat, J. (1978). "Les tanins dans les bois tropicaux." *BOIS & FORETS DES TROPIQUES* 182(182): 37-54.

Dohou N. Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de thymelaelythroïdes. Thèse de doctorat 2015, P 59. Available on : dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/7722/1/ABEDDOU.pdf

Dugas A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W., 2000. *J. Nat. Prod.*, **63**, 327-31.

Djoko, E. Tematio L.F. Nague, R. Chougouo, D. Wouessidjewe. Essai de formulation de suppositoires et ovules à base de beurre de karité comme excipient. *Phytothérapie* 2020, **18** (3-4) , 180-186. <https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0065>

Damian Tom-Dery, Franziska Eller, Christoph Reisdorff, Kai Jensen. Shea (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn.) at the crossroads: current knowledge and research gaps. *Agroforestry Systems* 2018, **92** (5) , 1353-1371. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0080-y>

Damián Maestri, Marcela Martínez, Romina Bodoira, Yanina Rossi, Alejandro Oviedo, Pierluigi Pierantozzi, Mariela Torres. Variability in almond oil chemical traits from traditional cultivars and native genetic resources from Argentina. *Food Chemistry* 2015, **170** , 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.073>

Delsart C., Ghidossi R., Poupot C., Cholet C., Grimi N., Vorobiev E., Milisic V., & Mietton-Peuchot M. (2012). Enhanced extraction of phenolic compounds from Merlot grapes by pulsed electric field treatment. *American journal of Enology and Viticulture*, **63**(2), 205-211.

Diaaz-Reinoso, B., Moure, S., Domínguez, H., Parajoa, J.C., 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 2441-2469.

Dick AJ, Redden PR, DeMarco AC, Lidster PD, Grindley TB. Flavonoid glycosides of spartan apple peel. *J Agric Food Chem* 1987; **35**: 529–531.

Divine Nde Bup, Charles Fon Abi, Dzudie Tenin, César Kapseu, Clergé Tchiegang, Zéphirin Mouloungui. Effect of Cooking on Moisture Sorption Isotherms of Shea Nut (*Vitellaria paradoxa* Gaertn.) Kernels Part II: Modelling and Properties of Sorbed Water. *Food and Bioprocess Technology* 2013, **6** (11) , 3273-3283. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0949-8>

Didier Fontanel. Total Content of Unsaponifiable Matter and Content of Corresponding Chemical Families in Various Plant Seed Oils: Species R to Z. 2013,, 253-316. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35710-7_7

Donsi F., Ferrari G., Frullo M., & Pataro G. (2010). Pulsed electric field-assisted vinification of Aglianico and Piediroso grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**(22), 11606-11615.

Draye, M., Estager, J., Malacria, M., Goddard, J.P., Ollivier, C. (2009) *Sonochimie Organique (K1250)*. Editions Techniques de l'Ingénieur, France.

Dugo G. et Di Giacomo A., 2002 : Citrus. The genus Citrus. Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.

E

El-Akhal F., Y. Ez zoubi , K. Essafi, A. El Ouali Lalami. Qualitative Phytochemicals Analysis and Larvicidal Activity of HydroEthanollic Extract of Moroccan *Mentha pulegium* Against Larvae Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Vector of Infectious Diseases. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016; 8(10): 1402-1406. https://www.researchgate.net/.../309428700_Qualitative_Phytochemic

El Darra N., Grimi N., Vorobiev E., Louka N., & Maroun R. (2012). Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food and Bioprocess Technology*, 1-9.

Erlund I, Alfthan G, Siren H, Ariniemi K, Aro A. Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 1999; 727: 179–189.

Escribano-Bailon M. T., & Santos-Buelga C. (2003). Polyphenol extraction from foods. *Methods in polyphenol analysis*, 1-16.

Ewald C, Fjelkner-Modig S, Johansson K, Sjöholm I, Åkesson B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chem* 1999; 64: 231–235.

Etzbach L, Pfeiffer A, Weber, F, Schieber, A. 2018. Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MSn. *Food Chem*. 245: 508-517. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.120

F

Farhat A., Fabiano-Tixier A.S., El Maataoui M., Maingonnat J.F., Romdhane M., Chemat F., 2011. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*. 125, 255-261.

Farkas O., Jakus J., Héberger K., 2004. *Molecules*, 9, 1079-1088

Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. 2001. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 14(3): 280-294. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx000208y>

Feresin, R. G., *et al.* Blackberry, raspberry and black raspberry polyphenol extracts attenuate angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells. *Food Funct.* 7, (10), 4175-4187 (2016).

Forbes-Hernandez, T. Y., *et al.* The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56, Suppl 1. S46-S59 (2016).

Figueira, M. E., *et al.* Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. Forbes-Hernandez, T. Y., *et al.* The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 56, Suppl 1. S46-S59 (2016).

Figueira, M. E., *et al.* Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat.

France-Ida J., 1996. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles. 3: 5-6.

Freeman . R " Molecular Smtlictireby Two-DimensionaL NMR specirscopy "Journal of Molecular Structure, 173 (1988) 17-30

Fernández de Simón B, Pérez-Ilzarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C, Esterella I. HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatogr* 1990; 30: 35–37.

Fernández de Simón B, Pérez-Ilzarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C, Estrella I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1531–1535.

Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 17: 501-512.

Fernande G. Honfo, Noel Akissoe, Anita R. Linnemann, Mohamed Soumanou, Martinus A. J. S. Van Boekel. Nutritional Composition of Shea Products and Chemical Properties of Shea Butter: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014, 54 (5) , 673-686. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.604142>

François Allal, Georges Piombo, Bokary A. Kelly, John B. L. Okullo, Massamba Thiam, Ousmane B. Diallo, George Nyarko, Fabrice Davrieux, Peter N. Lovett, Jean-Marc Bouvet. Fatty acid and tocopherol patterns of variation within the natural range of the shea tree (*Vitellaria paradoxa*). *Agroforestry Systems* 2013, 87 (5) , 1065-1082. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9621-1>

Fernande G. Honfo, Anita R. Linnemann, Noel Akissoe, Mohamed M. Soumanou, Martinus A. J. S. van Boekel. Characteristics of traditionally processed shea kernels and butter. *International Journal of Food Science & Technology* 2013, 48 (8) , 1714-1721. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12142>

Fidèle P. Tchobo, Armand K. Natta, Bruno Barea, Nathalie Barouh, Georges Piombo, Michel Pina, Pierre Villeneuve, Mohamed M. Soumanou, Dominique C. K. Sohounhlou. Characterization of *Pentadesma butyracea* sabine Butters of Different Production Regions in Benin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2007, 84 (8) , 755-760. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1102-0>

G

Gao M, Liu C-Z (2005) Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (8-9):1461-1463

García-Marino M., Rivas-Gonzalo J. C., Ibáñez E., & García-Moreno C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica chimica acta*, 563(1), 44-50.

Giannuzzo, A.N., Boggetti, H.J., Nazareno, M.A., Mishima, H.T., 2003. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradise*. *Phytochemical Analysis*. 14, 221-223.

Gertenbach D.D., 2001 : Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In J. Shi, G. Mazza, & M. L. Maguer (Eds.), *Functional foods: biochemical and processing aspects* (pp. 331e366). Boca Raton, FL: CRC Press Inc.

Gong, M., Bassi, A., 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol Adv* 34, 1396-1412.

Golubkina N, Seredin MT, Antoshkina MS, Kosheleva OV, Teliban CG, Caruso G. 2018. Yield, Quality, Antioxidants and Elemental Composition of New Leek Cultivars under Greenhouse Organic or Conventional System. *Horticulturae*, 4 (4): 39. DOI:10.3390/horticulturae4040039

González-Centeno M., Comas-Serra F., Femenia A., Rosselló C., & Simal S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 506-514.

González-Centeno M. R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C., & Femenia A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis*

vinifera L.) – A response surface approach. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.

Ghedira K, (2005) : Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*.3 (4). pp 162-169.

Griendling, K. K., Taubman, M. B., Akers, M., Mendlowitz, M., Alexander, R. W. Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **266**, (23), 15498-15504 (1991).

Gilbert D.L., Colton C.A. (1999). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach.*, editors. New-York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.740 p.

Gramaza A. Khokhar S., Yoko S., Gliszczynska- Swiglo A., Hes M. Korczak J, 2006. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 108, 351-362

Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., Smith, B. Onions--a global benefit to health. *Phytother Res.* **16**, (7), 603-615 (2002).

Goulas V., Manganaris, G.A., 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry.* 131, 39-47.

Grigonis. D., Venskutonis P.R, Sivik B., Sandahl M. and. Eskilsson C.S, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*), *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3) (2005) 223-233.

Guerrero M. S., Torres J. S., & Nuñez M. J. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*, 99(5), 1311-1318.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., et al. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC–MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7513–7521.

Gullberg,J, Pär Jonsson, Anders Nordström,Michael Sjöström, and ThomasMoritz,Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry,*Analytical Biochemistry* 331 (2004) 283–295

H

Harborne JB. Plant polyphenols XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochem* 1965; 4: 107–120.

Harborne JB. The flavonoids: recent advances. In: Goodwin TW, ed. *Plant Pigments*. London, England: Academic Press, 1988, p. 299–343.

Harborne JB. Plant phenolics. In: Dey PM, Harborne, JB, eds. *Methods in PlantBiochemistry*, Vol 1.London, UK: Academic Press, 1989.

Harkati, B., 2011. Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae. Thèse de doctorat. Université de Mentouri-Constantine.

Hegedűs A, Balogh E, Engel R, Sipos, BZ, Papp J, Blázovics A, Stefanovits-Bányai É. 2008. Comparative nutrient element and antioxidant characterization of berry fruit species and cultivars grown in Hungary. *HortScience.*, 43(6): 1711-1715.

Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London, UK: Chapman & Hall,1994.

Harborne JB. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London, UK: Chapman & Hall, 1998.

Handa, S.S. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *In*: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) *Extraction Technologies, for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy, p :21-54.

He, J.Z., Shao, P., Liu, J.H., Ru, Q.M., 2012. Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 13065-13078.

Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4107–4112.

Herrmann K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* 1976; 11: 433–448.

Herrmann K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables: a review. *Z Lebensm-Unters Forsch* 1988; 186: 1–5.

Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989; 28: 315–347.

Haleng, J., J. Pincemail, et al. (2007). "Le stress oxydant." *Revue médicale de Liège* 62(10): 628-638.

Hisham Moharram, Julie Ray, Sibel Ozbas, Hector Juliani, and James Simon. *Shea Butter: Chemistry, Quality, and New Market Potentials*. 2006,,, 326-340. <https://doi.org/10.1021/bk-2006-0925.ch025>

Hanson, J.R., 2003. Natural products: the secondary metabolites. Royal Society of Chemistry. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants* 24, 1250–1319.

Harborne JB. The flavonoids: recent advances. *In*: Goodwin TW, ed. *Plant Pigments*. London, England: Academic Press, 1988, p. 299–343.

Harborne JB. Plant phenolics. *In*: Dey PM, Harborne, JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1. London, UK: Academic Press, 1989.

Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London, UK: Chapman & Hall, 1994.

Harborne JB. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London, UK: Chapman & Hall, 1998. Harborne, J.B., 2013. *The flavonoids: advances in research since 1980*. Springer.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.

Hollman P.C. & M.B. Katan. 1999. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radical Res.* 3A : S75-S80

Hügel, H. M., Jackson, N., May, B., Zhang, A. L., Xue, C. C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*. 23, (2), 220-231 (2016).

Hertog, M. G., *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 155, (4), 381-386 (1995).

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381–386.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992b; 40: 2379–2383.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 1993a; 342: 1007–1011.

Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993b; 41: 1242–1246.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer* 1994; 22: 175–184.

Hertog MGL, Hollman PCH, Venema, DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992a; 40: 1591–1598.

Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1489–1494.

Hee Seung NahmH. Rodolfo JulianiJames E. Simon. Quality Characteristics of Shea Butter, *Vitellaria paradoxa*. 2013,, 167-184. <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1127.ch012>

Halliwell B., Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 715S-725S.

Heart and Circulatory Physiology 282(6): H2414-H2421.

Herrera, E. and C. Barbas (2001). "Vitamin E: action, metabolism and perspectives." *Journal of physiology and biochemistry* 57(1): 43-56.

Higdon J.V., Frei B., 2003. *Crit .Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 89-143.

Herodez. S. S., M. Hadolinb, M. Skergeta and Zeljko Knez, Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *FoodChemistry*, 80 (2003) 275– 282.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J.A., Ibanez, E., 2013. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trac-Trend Anal Chem* 43, 67-83.

Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibanez, E., 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J Chromatogr A* 1217, 2495-2511.

Herrero, M., Ibanez, E., 2015. Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae. *J Supercrit Fluid* 96, 211-216.

Herrera M.C., Luque de Castro M.D. (2005). Ultrasound-assited extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100(1): 1-7.

Hertog MGL, Hollman PCH, Venema, DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992a; 40: 1591– 1598.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992b; 40: 2379–2383.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 1993a; 342: 1007–1011.

Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993b; 41: 1242–1246.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer* 1994; 22: 175–184.

Hollman PCH, Venema DP. The content of the potentially anticarcinogenic ellagic acid in plant foods. In: Waldron KW, Johnson IT, Fenwick GR, eds. Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1993, p. 203–208.

Hong N., Yaylayan V., Raghavan G., Paré J., & Bélanger J. (2001). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed. *Natural product letters*, 15(3), 197-204.

Howard, L., Pandjaitan, N., 2008. Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. *J Food Sci* 73, C151-157.

Huang, Y.S., Ho, S.C., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*. 119, 868-873.

Huie C (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (1-2):23-30

I

Igor Passi L B. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako ; 133 P

Ilboudo S., Ouedraogo M., Some N., et Guissou PI. Criblage phytochimique et évaluation de la toxicité aigüe de *Pisolithustinctorius* (Basidiomycète). *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques*. 2009; 10(2):6-13. Available on : http://www.ufrspb.ci/cf/doc2_87.pdf.

Inoue, T., Tsubaki, S., Ogawa, B., Onishi, K., Azuma, J.I., 2010. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. 123, 542-547.

Isabella Sundl, Michael Murkovic, Donata Bandoniene, Brigitte M. Winklhofer-Roob. Vitamin E content of foods: Comparison of results obtained from food composition tables and HPLC analysis. *Clinical Nutrition* 2007, 26 (1) , 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.06.003>

J

Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P. R., Rathod V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Engineering*. 93 (4): 421-426.

Jaime, L., Rodriguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibanez, E., Senorans, F.J., 2010. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Lwt-Food Sci Technol* 43, 105-112.

Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J.M., Luque de Castro M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. 1108 (1): 76-82.

Jayaprakasha G., Singh R., & Sakariah K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.

Jawad, A., Langrish, T.A.G., 2012. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*. 109, 162-174.

Jones WP, Kinghorn AD (2005) Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (eds) *Natural Products Isolation*, vol 20. Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, pp 323-351

Jacques, P. F., Cassidy, A., Rogers, G., Peterson, J. J., Dwyer, J. T. Dietary flavonoid intakes and CVD incidence in the Framingham Offspring Cohort. *Br J Nutr.* 114, (9), 1496-1503 (2015).

Jeong, H. S., *et al.* Effects of *Rubus occidentalis* extract on blood pressure in patients with prehypertension: Randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Nutrition*. **32**, (4), 461-467 (2016).

Jia, H., *et al.* The antihypertensive effect of ethyl acetate extract from red raspberry fruit in hypertensive rats. *Pharmacogn Mag.* **7**, (25), 19-24 (2011).

Jin Yi Wong, Patricia Matanjun, Yasmin Beng Houi Ooi, Kah Fei Chia. Evaluation of Antioxidant Activities in Relation to Total Phenolics and Flavonoids Content of Selected Malaysian Wild Edible Plants by Multivariate Analysis. *International Journal of Food Properties* 2014, **17** (8) , 1763-1778. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.724756>

Jules Bayala, Niéyidouba Lamien, Innocent Butare, Sibiri Jean Ouédraogo, Oscar Eyog-Matig. Editorial. *New Forests* 2011, **41** (3) , 277-279. <https://doi.org/10.1007/s11056-011-9261-0>

Joseph. J.A., B. Shukitt-hale, N.A. Denisova, *er al.* 1998. Long-term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onsel of age-related neuronal signaltransduction and cognitive behavioral deficits. *J. Neurosci.* **16** : 8047-8055

Joseph J.A., B. Shukitt-hale, N.A. Denisova, *er al.* 1999. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioral deficits with diets suppleated with blueberry, spinach or strawberry dietary supplementation. *J. Neurosci.* **19** : 8111-8121.

Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998; **799**: 101–110.

K

Kallithraka S., Garcia-Viguera C., Bridle P., & Bakker J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, **6**(5), 265-267.

Kalt w., Forney c. F., Martin a., Prior r. L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin c, Phenolics and anthocyanins after storage of small fruits, *journal of agricultural and food chemistry* **47**, 4638-464

Kassi, B.A.B., 2013. Contribution à l'étude phytochimique des amandes de *Mangifera Indica* et des Feuilles, écorces, graines de *Santaloides Afzelii*. Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan Côte d'Ivoire.

Kanes K, Tisserat B, Berhow M, Vandercook C. Phenolic composition in various tissues of Rutaceae species. *Phytochem* 1993; **32**: 967–974.

Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. **119**, 851-858.

Khanal R. C., Howard L. R., & Prior R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, **43**(5), 1464-1469.

Kim, J.W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S.C., 2009. Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from *Citrus pomaces*. *Separation Science and Technology*. **44**, 2598-2608.

Kingston M.M. *et Haswell S.J.*, 1997 :Microwave – Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation, and applications. Edition American Chemistry Society, Washignton, DC, p.772

Kowalski R., 2001. Analiza składu chemicznego organów nadziemnych i podziemnych różnika przerośniętego *Silphium perfoliatum* L. [Chemical analysis of above-ground and underground organs of *Silphium perfoliatum* L.]. Rozprawa doktorska (Doctoral disertation). Univ. of Agric. Lublin, 1-219 [in Polish].

Kowalski R., 2002. Ocena zawartości oleanozydów w organach nadziemnych i podziemnych różnika przerośniętego *Silphium perfoliatum* L. [Evaluation of oleanosides content in above and underground organs of

Silphium perfoliatum L.]. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 1(2), 5-15 [in Polish].

Kowalski R., Wolski T., 2001. Charakterystyka wzrostu i rozwoju roznika przerośniętego *Silphium perfoliatum* L. w pierwszych latach uprawy [Characteristics of growth and development of *Silphium perfoliatum* L. in the first years of cultivation]. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sec. EEE, 9, Supl., 311-317 [in Polish].

Kratchanova, M., Pavlova, E. et Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrates Polymers*, 56 :181-185.

Kuninori T, Nishiyama J. Separation and quantitation of ferulic acid and tyrosine in wheat seeds (*Triticum aestivum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986; 362: 255–262.

Kim, S., et al. Aqueous extract of unripe *Rubus coreanus* fruit attenuates atherosclerosis by improving blood lipid profile and inhibiting NF- κ B activation via phase II gene expression. *J Ethnopharmacol.* **146**, (2), 515-524 (2013).

Kim, D. O., Lee, C. Y. Extraction and Isolation of Polyphenolics. *Curr Protoc Food Analyt Chem.* **1**, John Wiley & Sons. New York. 2.1-2.12 (2002).

Kresty, L. A., Mallery, S. R., Stoner, G. D. Black raspberries in cancer clinical trials: Past, present and future. *J Berry Res.* **6**, (2), 251-261 (2016).

Khudhair A. M. Abed AL Ani. Primary Phytochemical Identification and some Biochemical Parameters Study of Ethanolic Extract of *Mentha spicata* Leaves in Mice. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 2016; 8(7):818-822. Available on : www.jocpr.com/.../primary-phytochemical-identification-and-some-b...

Kalyani Barve, Apurva Dighe. Hair Conditioner. 2016,, 37-44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29419-3_4

Kerrihard A.L., Pegg R.B.. Utilizing the bioactive contents of specialty oils and fats. 2015,, 317-348. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-376-8.00013-2>

Kodad, O. Estopañán, G. T. Juan, J.M. Alonso, M.T. Espiau, R. Socias i Company. Oil content, fatty acid composition and tocopherol concentration in the Spanish almond genebank collection. *Scientia Horticulturae* 2014, **177** , 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.045>

Kumar. S., et Pandey.A. K., (2013) ‘Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview’ The ScientificWorld Journal. Volume 20, Article ID 162750, 16 pages.

L

Lafka T. L., Sinanoglou V., & Lazos E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, **104**(3), 1206-1214.

Lapornik B., Prošek M., & Golc Wondra A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, **71**(2), 214-222.

Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-A practical review. *Talanta.* **53**, 771-782.

Lattanzio V., Lattanzio V. M., & Cardinali A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, **661**, 23-67.

Lee HS, Widmer BW. Phenolic compounds. In: Nollet LML, ed. Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 1996, Vol 1, p. 821–894.

Lee, Y.H., Charles, A.L., Kung, H.F., Ho, H.F., Huang, T.C., 2010. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Industrial Crops and Products.* **31**, 59-64.

Leybros J., & Frémeaux P. (1990). Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2, J2780. 2781-J2780. 2721.

Li B. B., Smith B., Hossain Md. M., 2006a. Extraction of phenolics from citrus peels. I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48, 182-188.

Li B.B., Smith B, Hossain M.M., 2006b. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48, 189- 196.

Li, Q., Wang, X., Chen, J., Liu, C., Li, T., McClements, D.J., Dai, T., Liu, J., 2016. Antioxidant activity of proanthocyanidins-rich fractions from *Choerospondias axillaris* peels using a combination of chemical-based methods and cellular-based assay. *Food Chem.* 208, 309–317.

Linden et Lorient D. (1994). Pigments et arômes .In : Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. *Ed : Masson.* 338-340.

Larson R. A., 1988. *Phytochemistry* ,27, 969-978.

Lopes-da-silva f., De pascual-Teresa s. *Et al.*, 2002. Identification of anthocyanin Pigments in strawberry (cv camarosa) by lc using dad and esi-ms detection, *European food research and technology* **214**, 248-253

Lugazi A., Hvari J., Sagi K.V et biro L, (2003): the role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica Szegediensis.* 47 (1-4), pp 119-125.

Lu, H., Li, J., Zhang, D., Stoner, G. D., Huang, C. Molecular mechanisms involved in chemoprevention of black raspberry extracts: from transcription factors to their target genes. *Nutr Cancer.* **54**, (1), 69-78 (2006).

Li W., Wang Z., Wang Y.P., Qun Liu C.J., Sun Y.S., Zheng Y.N., 2012. Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ (Guangchenpi). *Food Chemistry.* 130, 1044-1049.

Li, Y., Jiao, B., Zhao, Q., Wang, C., Gong, Y., Zhang, Y., Chen, W., 2012. Effect of commercial processing on pesticide residues in orange products. *European Food Research and Technology.* 234, 449-456.

Li Y., Skouroumounis G. K., Elsey G. M., & Taylor D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.

Liazid A., Guerrero R., Cantos E., Palma M., & Barroso C. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124(3), 1238-1243.

López N., Puértolas E., Condón S., Alvarez I., & Raso J. (2008a). Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1099-1107.

López N., Puértolas E., Condón S., Álvarez I., & Raso J. (2008b). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 477-482.

López N., Puértolas E., Hernández-Orte P., Álvarez I., & Raso J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT-Food Science and Technology*, 42(7), 1225-1231.

Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F., 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering.* 79, 1079-1086

Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J., 2013. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science Emerging Technologies*. 17, 79-84.

Luque de Castro M.D. and Garcia-Ayuso, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 110.

Luque de Castro M.D. et Friego-Capote F., 2007 : Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction : A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 583, pp : 2 – 9.

Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J Chromatogr A* 1217, 2383-2389.

M

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Ultraviolet Spectra of Isoflavones, Flavanones and Dihydroflavonols, in: *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 165–226. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0_6

Machado Marcos B., Lopes Lucia M.X.. "Chalcone–flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*". *Phytochemistry* 66 (2005) 669–674

Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. *Fruit Phenolics*. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990.

Malik F., S. Hussain, A. Sadiq, G. Parveen, A. Wajid, S. Shafat, R. A. Channa, R. Mahmood, H. Riaz, M. Ismail & F. Yasin Raja. Phyto-chemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6(9):613-619. www.academicjournals.org/journal/AJPP/article.../C347DAC33059

Manach C. (1998). Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse: Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal.

Miller N.J, Rice-Evans C.A, Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., 1993. *Clin. Sci.* ,84, 407-412.

Mariko Funasaki, Ingrid Sabino Menezes, Hiléia dos Santos Barroso, Sandra Patricia Zanotto, Cláudia Regina Ferreira Carioca. Tocopherol profile of Brazil nut oil from different geographic areas of the Amazon region. *Acta Amazonica* 2013, 43 (4) , 505-509. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672013000400012>

Mak, S., Z. Egri, et al. (2002). "Vitamin C prevents hyperoxia-mediated vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasodilation." *American Journal of Physiology*-

Mandel S. & Youdim M B.H, 2004. *Free Radical. Biol. Med.*, 37, 304-317.

Muir A.D., 1996. *The American Oil Chemists' Society Press*, Champaign. 204-212.

Magalhaes, Aderbal F., Tozzi, Ana Maria A. Magalhaes, Eva G. Nogueira, Marisa A. Sonia C.N. Queiroz. "Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots " *Phytochemistry* 55 (2000) 787-792

Makris D. P., Boskou G., & Andrikopoulos N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98(15), 2963-2967.

Manach C, Morand C, Crespy V, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 1998; 426: 331–336.

Mandal, V., Mohan, Y. et Hemalatha, S.,(2007). Microwave assisted extraction-Aninnovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*,1 :7-18.

Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. New York, USA: Academic Press, 1982.

Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. Dey PM, Harborne JB, eds. Methods in Plant Biochemistry, Vol 1, Plant Phenolics. London, UK: Academic Press, 1989, p. 197–235.

Markham KR, Bloor SJ. Analysis and identification of flavonoids in practice. In: Rice-Evans CA, Packer L, eds. Flavonoids in Health and Disease. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1998, p. 1–33.

Martínez-Ballesta MC, Dominguez-Perles R, Moreno DA, Muries B, Alcaraz-López C, Bastías E, Viguera CG, Carvajal, M. 2010. Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 30(2): 295-309.

Mason T. J. et Lorimer J. P. (2002). Applied Sonochemistry. *Wiley-VCH*. Weinheim,Allemagne

Mason T. J., & Lorimer J. P. (2002). Applied sonochemistry. *The uses of power ultrasound in chemistry and processing*, 1-48.

Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H., Ye X.Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16(1): 57-62.

Mattea, F., Martin, A., Matias-Gago, A., Cocero, M.J., 2009. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: beta-Carotene nanoparticle formation. *J Supercrit Fluid* 51,238-247.

Morton, L. W., Abu-Amsha Caccetta, R., Puddey, I. B., Croft, K. D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 27, (3), 152-159 (2000).

Makalao MM, Savadogo A, Zongo C, Traore AS. 2015. Composition nutritionnelle de 10 fruits sauvages consommés dans trois départements du Tchad. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 9(5): 2385-2400. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i5.11>.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79, (5), 727-747 (2004).

Mazzoni, L., et al. The genetic aspects of berries: from field to health. *J Sci Food Agric*. 96, (2), 365-371 (2016).

Mila, I., Scalbert, A. et Expert, D. (1996) Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 42, 1551-1555.

McRae KB, Lidster PD, DeMarco AC, Dick AJ. Comparison of the polyphenol profiles of apple fruit cultivars by correspondence analysis. *J Sci Food Agric* 1990; 50: 329–342.

Mhemdi H. (2013a). *Technologie d'extraction froide assistée par champ électrique pulsé pour une utilisation économe et propre des agroressources: Cas de la betterave à sucre (étude multi-échelles)*. Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.

Mhemdi H., Grimi N., Bals O., Lebovka N., & Vorobiev E. (2013b). Effect of apparent density of sliced food particles on the efficiency of pulsed electric field treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18(0), 115-119.

Michel, T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (PhD Thesis). Université d'Orléans.

Möller K., 2008 : La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO.152 P.

Monrad J. K., Srinivas K., Howard L. R., & King J. W. (2012). Design and optimization of a semicontinuous

hot cold extraction of polyphenols from grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(22), 5571-5582.

Moreira, Davyson de L. Guimaraes Elsie F. et Kaplan Maria Auxiliadora C. " A CglucosylFavone from leaves of *Piper lhotzkyanum* " *Phytochemistry* 55 (2000) 783-786

Moulin J.-P., Pareau D., Rakib M. et Stambouli M., 2002 : Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. *Techniques de l'ingénieur* J1073, pp : 1 – 13.

Murga R., Ruiz R., Beltrán S., & Cabezas J. L. (2000). Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3408-3412.

N

Nadia P., Niculescu V., & Tamaian R. (2010). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Grapes. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 67(1-2).

Naidu, J.R.; Ismail, R.B.; Yeng, C.; Sasidharan, S.; Kumar, P. Chemical composition and antioxidant activity of the crude methanolic extracts of *Mentha spicata*. *J. Phytol.* 2012, 4, 13–18. Available on : <https://pdfs.semanticscholar.org/.../bedb0668cc1e694523b9fb32529...>

Navarro, M., Moreira, I., Arnaez, E., Quesada, S., Azofeifa, G., Alvarado, D., Monagas, M.J., 2017. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. *Plants* 6, 50.

Ndzelikibi, .B et al . constituants chimiques de l'huile essentielle de *Mentha piperita*.L (Lamiacea) du congo. *Journal of Applied Biosciences*. 2015 ; 92 :8578-8585 . Available on : m.elewa.org/Journals/wp-content/uploads/2015/08/2.likibi2.pdf

Ngadjui Bonaventure T., Watchueng Jean, Keumedjio Felix, Ngameni Bathelemy , Simo Ingrid K., Abegaz Berhanu M.. " Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*". *Phytochemistry* 66 (2005) 687–692

Ngamnikom P., & Songsermpong S. (2011). The effects of freeze, dry, and wet grinding processes on rice flour properties and their energy consumption. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 632-638.

Niare A. Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtaceae). Thèse de doctorat en pharmacie. 2006, 43- 47.<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2006/pharma/pdf/06P24.pdf>

Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., Rath, M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*. 8, (9), E552 (2016).

Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation μ Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. *Avignon*. p. 327.

Novak I., Janeiro P., Seruga M., & Oliveira-Brett A. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta*, 630(2), 107-115.

O

O'Connell J.E., Fox P.F. (2001). Signification and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. **11**(3): 103-120.

Okullo JBL, Omujal F, Agea JG, Vuzi PC, Namutebi A, Okello JBA, Nyanzi SA. 2010. Physico-chemical characteristics of shea butter (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.) oil from the shea districts of Uganda. *Afr. J. Food Agric. Nutrition and Development*, **10**(1): 2070-2084. DOI: <https://doi.org/10.4314/ajfand.v10i1.51484>

Olimpia Masetti, Alessandra Ciampa, Luigi Nisini, Massimiliano Valentini, Paolo Sequi, Maria Teresa Dell'Abate. Cherry tomatoes metabolic profile determined by 1H-High Resolution-NMR spectroscopy as influenced by growing season. *Food Chemistry* 2014, **162**, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.066>

Orit Segman, Zeev Wiesman, Leonid Yarmolinsky. Methods and Technologies Related to Shea Butter Chemophysical Properties and to the Delivery of Bioactives in Chocolate and Related Products. 2012,, 417-441. <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-2-5.50020-7>

Ossama Kodad, Gloria Estopañán, Teresa Juan, Ali Mamouni, and Rafel Socias i Company . Tocopherol Concentration in Almond Oil: Genetic Variation and Environmental Effects under Warm Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, **59** (11) , 6137-6141. <https://doi.org/10.1021/jf200323c>

Ossama Kodad, Rafel Socias i Company, José Alonso. Genotypic and Environmental Effects on Tocopherol Content in Almond. *Antioxidants* 2018, **7** (1) , 6. <https://doi.org/10.3390/antiox7010006>

Ossama Kodad, Gloria Estopañán, Teresa Juan, Rafel Socias i Company. Tocopherol concentration in almond oil from Moroccan seedlings: Geographical origin and post-harvest implications. *Journal of Food Composition and Analysis* 2014, **33** (2) , 161-165. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.12.010>

P

Palma M., Barroso C.G. (2002). Ultrasounds-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analitica Chimica Acta*. **458**(1): 119-130.

Pan X., Niu G., Liu H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea 32 caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Proc* **42**: 129-133.

PARE J.R.J. et BELANGER J.M.R., 1997 : Instrumental methods in foods analysis. Elsevier, Amsterdam.

Paré J.R.J., 1994 : Microwave extraction of volatile oils. Brevet américain , US 5 338 557.

Paré J.R.J., Sigouin M. et Lapointe J., 1990 : Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. Brevet européen , EP 398798.

Paré J.R.J., Sigouin M., et Lapointe J., 1991 : Microwave assisted natural product extraction. Brevet américain , US 5 002 784.

Paris M., Hurabeillen M. (1981). Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. *Ed: Masson*. 210-215.

Prasad, K.N., Yang, B., Shi, J., Yu, C., Zhao, M., Xue, S., Jiang, Y.,. Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressureassisted extraction. *J Pharm Biomed Anal*. 2010; **51**, 471–477. Available on : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345542>

Prakash Kochhar S.. Minor and Speciality Oils. 2011,, 291-341. <https://doi.org/10.1002/9781444339925.ch11>

Podsedeck A., Wilska-Jeszka J., Anders B., Markowski J. (2000). Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. **210**: 268-272.

Pietta P. G., 2000. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035-1042.

Rice-Evans C.A., Miller N. J., Paganga G., 1996. *Free Radical. Biol. Med.* ,20, 933-956.

Pekić B., Kovač V., Alonso E., & Revilla E. (1998). Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry*, 61(1), 201-206.

Peleg H, Naim M, Roussef RL, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 1991; 57: 417–426.

Pellerin P., 2001 : Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim. V. 94*, N°954 – pp : 51-62.

Psotová.J., Lasovský.J., Vicar. J., 2004. Metal- chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics.. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 147(2):147-53

Pascal S.M., Cheynier V, (2006) : les polyphénols dans les industries agroalimentaires. Paris

Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F., McCullough, M. L. Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr Rev.* **70**, (9), 491-508 (2012).

Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., Sautebin, L. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide.* **15**, (1), 30-39 (2006).

Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci.* **11**, (4), 1679-1703 (2010).

PenaM. R., Barciela J., Herrero C. et Garcia-Martin S. (2005). Comparison of Ultrasound assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine. *Talanta.* **67** (1): 129-135.

Pereira C.G., Meireles, M.A.A., 2010. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technology.* 3, 340-372.

Pérez-Serradilla J., & Luque de Castro M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124(4), 1652-1659.

Pétrier, C., Gondrexon N., Boldo P. (2008). Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur AF6310.* 1-14.

Peyron L., 1992 : Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238. Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinateurs Richard H. et Multo J.-L. Ed. Tec & Doc-Lavoisier etApria. 438 p.

Pico, Y., 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends Analytical Chemistry.* 43, 84-99.

Pinelo M., Fabbro P. D., Manzocco L., Nuñez M. J., & Nicoli M. C. (2005a). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109-117.

Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J., & Núñez M. J. (2005b). 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2111-2117.

Pinelo M., Ruiz-Rodríguez A., Sineiro J., Señoráns F. J., Reglero G., & Núñez M. J. (2007). Supercritical fluid and solid–liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 199-205.

Plesa C, Hadaruga D, Hadaruga N, Branic A, Ardelean A, Lupea A (2011) Juniperus communis and Juniperus virginiana hydrophobic extracts: a multivariate analysis approach. *Revista de Chimie* 62 (9):941-946

Ponce Maria A., Scervino José M., Erra-Balsells Rosa, Ocampo Juan A., Godeas Alicia M.. *Phytochemistry* 65 (2004) 3131–3134

Prasad, dK. N., Hao, J., Shi, J., Liu, T., Li, J., Wei, X.Y., 2010. Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10, 4, 413- 419.

Price KR, Casascelli F, Colquhoun IJ, Rhodes MJC. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *J Sci Food Agric* 1998a; 77: 468–472.

Price KR, Colquhoun IJ, Barnes KA, Rhodes MJC. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. *J Agric Food Chem* 1998b; 46: 4898–4903.

Price KR, Prosser T, Richetin AMF, Rhodes MJC. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem* 1999; 66: 489–494.

Puértolas E., Cregenzán O., Luengo E., Álvarez I., & Raso J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1330-1336.

Q

Queires, L. C., *et al.* Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Res.* 26, (1A), 379-387 (2006).

R

Rajha H., Boussetta N., Louka N., Maroun R., & Vorobiev E. (2015a). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*, 146, 243-251.

Rajha H., Chacar S., Afif C., Vorobiev E., Louka N., & Maroun R. (2015b). β -Cyclodextrin-Assisted Extraction of Polyphenols from Vine Shoot Cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(13), 3387-3393.

Ratnasooriya C. C., & Rupasinghe H. V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134(2), 625-631.

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Bruneton, N., 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: *Review of recent advances. Food Research International*. 44 (7), 1875-1887.

Raynie.D.E., .Modern extraction techniques: Analytical chemistry, Vol.76, No 12, June 19, 2006.

Reighard T. S. and S. V. Olesik, Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26 (2&3) (2006), 1-39.

Rezzoug S.A., B outekedjiret C. et A llaf K., 2005 : Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *J. Food Engin.* Vol. 71, pp : 9 – 17.

Rezzoug S.a., louka n., maache-rezzoug z., nouviaire a. et allaf k. , 1998 : Présentation du séchage couple à la

texturation par détente instantanée contrôlée. Application aux produits agro-alimentaires en morceaux, pp : 319 – 324. 10^{ème} rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, AGORAL, Ed. Lavoisier.

Retsky, K. L., K. Chen, et al. (1999). "Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation." *Free Radical Biology and Medicine* 26(1-2): 90-98.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod. Paris.* pp : 173-201.

Rivera-Vargas, L.I., Schmitthenner, A.F., Graham, T.L., 1993. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry* 32, 851–857. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85219-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85219-H)

Robards K, Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Anal* 1997; 122: 11R–34R.

Rodrigues S., Pinto G.A.S., Fernandes F.A.N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocosnucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15 (1): 95-100.

Rommel A, Wrolstad RE. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *J Agric Food Chem* 1993a; 41: 1237–1241.

Rommel A, Wrolstad RE. Composition of flavonols in red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors. *J Agric Food Chem* 1993b; 41: 1941–1950.

Rommel A, Wrolstad RE. Ellagic acid content of red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors. *J Agric Food Chem* 1993c; 41: 1951–1960.

Rouseff RL, Seetharaman K, Naim M, Nagy S, Zehavi U. Improved HPLC determination of hydroxycinnamic acids in orange juice using solvents containing THF. *J Agric Food Chem* 1992a; 40: 1139–1143.

Routray, W., Orsat, V., 2012. Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food Bioprocess Technology*. 5, 409-424.

S

Sauleau Christophe Long, Pierre, Bruno David, Lavaud Catherine, Cassabois Valérie, Ausseil Frédéric et Massiot Georges. *Phytochemistry* 64 (2003) 567–569.

Sharma V., Gulati A., Ravindranath S.D, 2005. *J. Food Chem.*, 93, 141-148. Schoefs, B., 2005. Plant pigments: properties, analysis, degradation. *Adv Food Nutr Res* 49, 41-91.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., Finlay, B. B. *Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev.* 90, (3), 859-904 (2010).

Scalbert A, et Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073S-2085S.

Sabine Krist, Stefanie Bail, Heidrun Unterweger, Martin B. Ngassoum, Ahmed M. Mohagir, Gerhard Buchbauer. Volatile compounds of original African black and white shea butter from Tchad and Cameroon. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006, 108 (7) , 583-588. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500340>

Steven Maranz. An Alternative Paradigm for the Role of Antimalarial Plants in Africa. *The Scientific World Journal* 2012, 2012 , 1-9. <https://doi.org/10.1100/2012/978913>

Stefanie Bail, Sabine Krist, Eliot Masters, Heidrun Unterweger, Gerhard Buchbauer. Volatile compounds of shea butter samples made under different production conditions in western, central and eastern Africa. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009, **22** (7-8) , 738-744. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.02.011>

Sujana, P., Sridhar, T.M., Josthna, P., Naidu, C.V. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint) – an important multipurpose medicinal plant. *Am. J.PlantSci.*2013;4:77–83.https://www.researchgate.net/.../318712690_Antibacterial_Activities

Szymanowska, U., Złotek, U., Karaś, M., Baraniak, B., 2015. Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chem.* 172, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.043>

Sarni-Manchado, P. and V. Cheynier (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Techniques & documentation.

Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **89**: 191-198.

Silva S., Gomes L., Leitao F., Bronse M., Caelho A.V. et Boas V. (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grassasy Aceittes*. **61** (02): 157-164.

Strack, D., Wray, V., Metzger, J.W., Grosse, W., 1992. Two anthocyanins acylated with gallic acid from the leaves of *Victoria amazonica*. *Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry* 31, 989–991. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80054-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80054-I)

Shirsatha, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing*. 53, 10-23.

Seo A, Morr CV. Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J Agric Food Chem* 1984; 32: 530-533.

Seung-Cheol Lee, So-Young Kim, Seok-Moon Jeong, Ji-Hee Park, 2006. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 399-403.

Sharma S., Sangwan n.s. et Sangwan R.S., 2003 : Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current sci.* Vol. 84 N°25 pp : 544 – 550.

Soliman Fathy M., Shehata Afaf H., Khaleel Amel E. et Ezzat. Shahera M. *Molucules* (2002), 7, 245-25

Spigno G., Tramelli L., & De Faveri D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208.

Sreedevi E. et Rao. J.T. *Fitoterapia* 71 (2000) 392-394

Stalikas.C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoïdes : Wiley Analytical Science Journals. December 11, 2007. www.jss-journal.com.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E. et Martinez J.R., 2004: Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopa aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chroma. A.*, Vol. 1025, pp : 105-113.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E. et Martinez J.R., 2004: Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J.Chroma. A.*, Vol. 1025, pp : 93 -103.

Schutz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DADESI/ MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4090-4096.

Suslick K.S., Price G.J. (1999). Application of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review on Mterial Science*. **29**: 295-326.

T

Tephly T. R. (1991). The toxicity of methanol. *Life sciences*, 48(11), 1031-1041.

Tessier F., Marconnet P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*. **10**: 01-13.

Thumann V.F. & Herrman K.,1980. *Deut Lebensm-Rundsch* ,76, 344-347.

Toledo-Guillén, A.R., Higuera-Ciajara, I., García-Navarrete, G., De la Fuente, J.C., 2010. Extraction of bioactive flavonoid compounds from orange (*Citrus sinensis*) peel using supercritical CO₂. *Journal of Biotechnology*. 150-576.

Tomás-Lorente F, García-Viguera C, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuineness. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1800-1804.

Torres AM, Mau-Lastovicka T, Rezaaiyan R. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *J Agric Food Chem* 1987; 35: 921-925.

Treutter D. Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various Prunus tissues by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988; 436: 490-496.

Tumbas, V.T., Četkovic, G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Vulic, J.J., Knez, Z., 2010. Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Biblid*. 40, 195-203.

Tzu-Kai Lin, Lily Zhong, Juan Santiago. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, **19** (1) , 70. <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>

U

Ullah N, M Khurram, M Usman Amin, H HAfridi, F A Khan, S M Umar Khayam, S Ullah, U Najeeb, J Hussain and M Asif Khan. Comparison of Phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Mentha spicata* from four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 01(07):72-76. Available on : https://toubkal.imist.ma/bitstream/handle/123456789/11320/THESE_ZEKRI.pdf.

Unno T., Sugimoto A., Kakuda T, 2001. *J. Sci. Food Agric.*, 80,601-606.

V

Vahid M. Aissi, Fidèle P. Tchobo, Armand K. Natta, Georges Piombo, Pierre Villeneuve, Dominique C. K. Sohounhloue, Mohamed M. Soumanou. Effet des prétraitements post-récolte des amandes de *Pentadesma butyracea* (Sabine) sur la technologie d'extraction en milieu réel et la qualité du beurre. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 2011, **18** (6) , 384-392. <https://doi.org/10.1051/ocl.2011.0423>

Van Sumere CF, van Brussel W, vande Castele K, van Rompaey. Recent advances in the separation of plant phenolics. In: Swain T, Harborne JB, van Sumere CF, eds. *Biochemistry of Plant Phenolics: Recent Advances in Phytochemistry*, Vol 12. New York, USA: Plenum Press, 1978, p. 1-28.

Vatai T., Škerget M., & Knez Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 246-254.

Virginia A. Jones, Payal M. Patel, Claire Wilson, Hongnan Wang, Kurt A. Ashack. Complementary and alternative medicine treatments for common skin diseases: A systematic review and meta-analysis. *JAAD International* 2021, **2**, 76-93. <https://doi.org/10.1016/j.jdin.2020.11.001>

Vuong, T., *et al.* Role of a polyphenol-enriched preparation on chemoprevention of mammary carcinoma through cancer stem cells and inflammatory pathways modulation. *J Transl Med.* **14**, (2016).

W

Waksmundzka-Hajnos M. Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *JChromatogr B* 1998; 717: 93–118.

Walde S., Balaswamy K., Velu V., & Rao D. (2002). Microwave drying and grinding characteristics of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Engineering*, *55*(3), 271-276.

Wang L., et Weller C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(6), 300-312.

Wang, X., Chen, Q., & Lu, X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*. *38*, 129-137.

Wang, S. Y., Jiao, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J Agric Food Chem.* **48**, (11), 5677-5684 (2000). *Biomed Pharmacother.* **83**, 1191-1202 (2016).

Wang, J., Mazza, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.* **50**, (15), 4183-4189 (2002)

Waterman PG, Mole S. In: Lawton JH, Likens GE, eds. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. The Methods in Ecology Series. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1994.

Wildanger W, Herrmann K. The phenolics of fruits. II. The flavonols of fruits. *Z Lebensm Unters Forsch* 1973; *151*: 103–108.

Williams, C.A., Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* *21*, 539–573. <https://doi.org/10.1039/B311404J>

Wiseman S.A., Balentine A., Frei B., Malvy D., Remesy C., 2000. *Cah. Nutr. Diet.*, *35*, 1S23-1S33.

Wojcieszek J, Ruzik L. 2016. Operationally defined species characterization and bioaccessibility evaluation of cobalt, copper and selenium in Cape gooseberry (*Physalis Peruviana L.*) by SEC-ICP MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, *34*: 15-21. DOI: 10.1016/j.jtemb.2015.12.001.

X

Xu, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D., 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* *55*, 330-335.

Xu, G.H, Chen, J.C., Zhang, Y.H., Iang, P.J., Ye, X.Q., 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of Citrus peel extract by hot water. *Food Chemistry.* *73*, 1, 11-17.

Xuejun Pan, Huizhou Liu, Guanghe Jia, Youn Yuen Shu "Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root". *Biochemical Engineering Journal* *5* (2000) 173–177

Y

Yenesew .Abiy, Induli. Martha, Derese. Solomon, Midiwo .Jacob O., Matthias Heydenreich, Martin G. Peter, Hoseah Akala, Julia Wangui, Pamela Liyala, Norman C. Waters. *Phytochemistry* 65 (2004) 3029–3032

Yeoh, S., Shi, J.et Langrish, T.A.G.(2008). Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218:229-237.

Yilmaz Y., & Toledo R. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.

Yim, K.H., Stambouli, M., Pareau, D., 2014. Solvent and Emulsion Extractions of Gallic Acid by Tributylphosphate: Mechanisms and Parametric Study. *Solvent Extr Ion Exc* 32, 749-762.

Yonas A. Gezahegn, Shimelis A. Emire, Sisay F. Asfaw. Optimization of Shea (*Vitellaria paradoxa*) butter quality using screw expeller extraction. *Food Science & Nutrition* 2016, 4 (6) , 840-847. <https://doi.org/10.1002/fsn3.351>

Youdim K.A., B. Shukitt-hale,, A. Martin, er al. 2000. Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics : beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue fonction. *Nutr. Neurosci.* 3 : 383-397.

Yukiaki K. Yukihiro H., 1999. *Rev. Mutat.Res.*, 436, 69-97.

Z

Zaidi, F.; Voirin, B.; Jay, M.; Viricel, M.R. Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pulegium* and *Mentha suaveoles* (Labiatae). *Phytochemistry* 1998, 48, 991–994. Available on : <https://eurekamag.com/research/003/146/003146446.php>

Zhang G., Hu M., He L., Fu P., Wang L., & Zhou J. (2013). Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. *Food and Bioproducts Processing*, 91(2), 158-168.

Zhang, M., Ma, J., Bi, H., Song, J., Yang, H., Xia, Z., Du, Y., Gao, T., Wei, L., 2017. Characterization and cardioprotective activity of anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. by-products. *Food Funct.* 8, 2771–2782. <https://doi.org/10.1039/C7FO00569E>

Zhong Z. S., Feng Y., & Sun L.-j. (2005). Extraction of Proanthocyanidins from Grape Seeds with Ultrasonic Wave [J]. *Fine Chemicals*, 1, 013.

Zhu, Y., Shi, Z., Yao, Y., Hao, Y., Ren, G., 2017. Antioxidant and anti-cancer activities of proanthocyanidin-rich extracts from three varieties of sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. *Food Agric. Immunol.* 28, 1530–1543.

Zia-ur-Rehman., 2006. Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*. 99, 450-454.

Ziaul.M. Amin, Tahera Islam, M. Rasel Uddin, M. Jashim Uddin, M. Mashiar Rahman, M. Abdus Satter. Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). *Heliyon* 2019, 5 (9) , e02462. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02462>

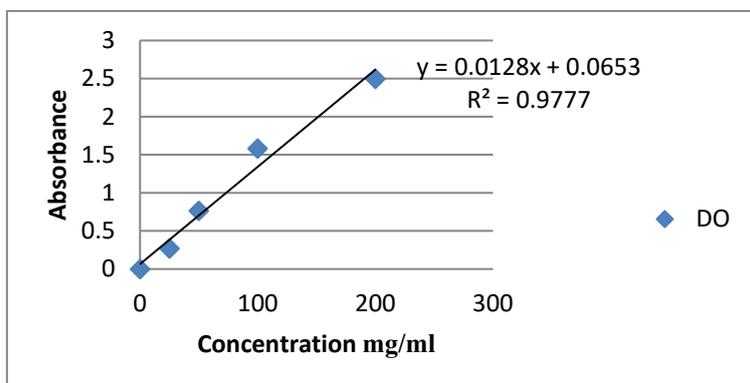
Zubair, M.F., Atolani, O., Ibrahim, S.O., Adebisi, O.O., Hamid, A.A., Sowunmi, R.A., 2017. Chemical constituents and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* (Schum & Thonn). *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 10, 238–246. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.35>



Annexes

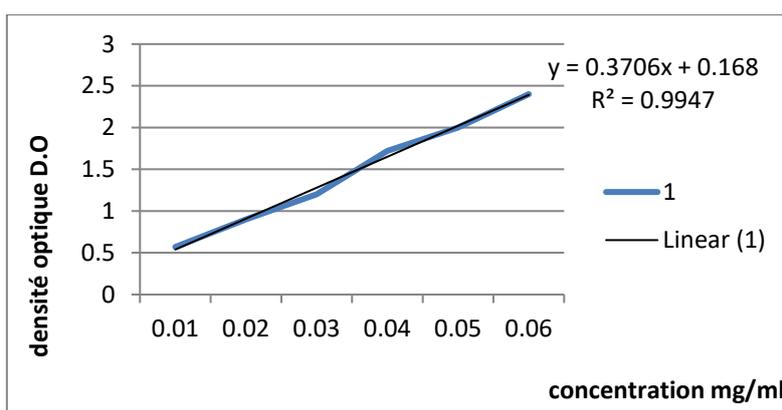
Annexe : 1

1. Dosage des polyphénols totaux.



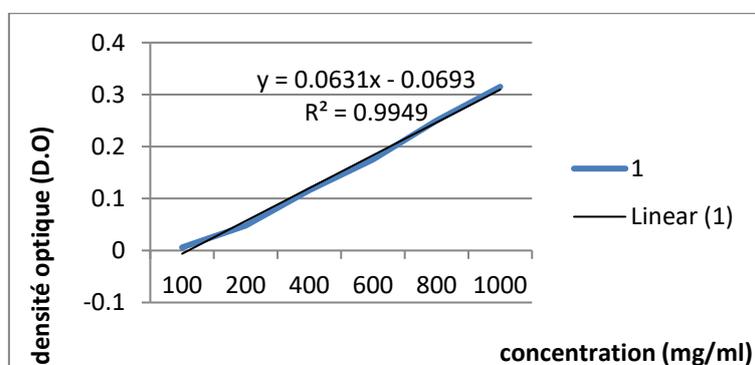
courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

2. Dosage des flavonoïdes.



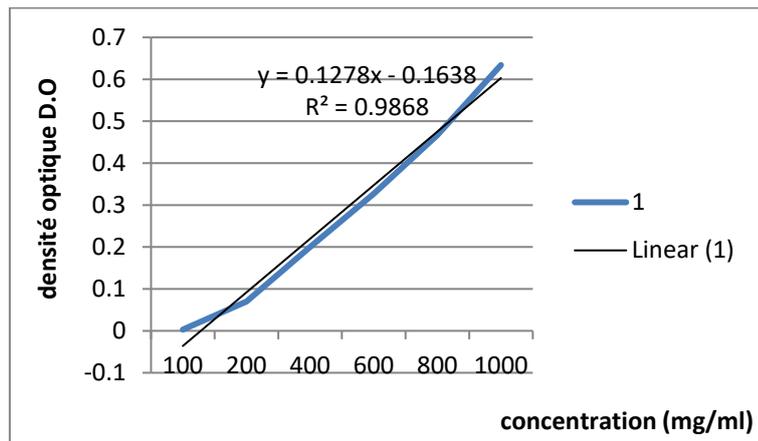
Courbe d'étalonnage de la quercétine

3. Dosage des tannins hydrolysables



Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins hydrolysables

3. Dosage des tannins condensés



Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour les tannins condensés

4. Dosage de la vitamine C



gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique

Annexe : 2



Jour 06 fraises à T ambiante
Avec emballage



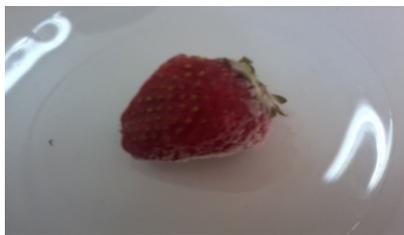
jour 07 fraise à T ambiante
sans emballage



jour 07 fraise à (+5°C) sans
emballage



Jour 20 fraises à (-20°C) sans
Emballage



Jour 30 fraise à (-20°C) avec
Emballage



Jour 45 fraise à (-20°C)
Emballage



Jour 60 fraises à (-20°C)
Sans emballage



Jour 90 Fraises à (-20°C)
Sans emballage



jour 90 fraises à (-20°C)
avec emballage



Jour 120 fraise à (-20°C) avec
emballage



jour 120 fraises à (-20°C) sans emballage

