

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**Ecole Nationale Supérieure Agronomique – El-Harrach – Alger**

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش – الجزائر

## **Thèse**

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3<sup>o</sup> Cycle en Sciences**

**Agronomiques**

Option : Sciences et Qualité des Aliments

## **Thème**

**Composés phénoliques de quatre espèces  
cultivées : optimisation de l'extraction et étude  
des activités antioxydantes**

**Présentée par MESSAOUDENE Lynda**

Devant le jury :

Président : A. BITAM Professeur (ENSA, Alger)

Directeur de thèse : R.DJEBBAR Professeur (USTHB, Alger)

Co-Directeur de thèse : M. HAZZIT Professeur (ENSA, Alger)

Examineurs :

Mme O. Abrous-Belbachir Professeur (USTHB, Alger)

Mr Y. Foudil-Cherif Professeur (USTHB, Alger)

Mr O. Benchabane MCA (ENSA, Alger)

**Soutenue publiquement le 05/02/2019**

## Remerciements

*Je* remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

*Je* remercie tout d'abord Mr. Djebbar Réda. Professeur à l'USTHB pour son aide précieuse, ses conseils qu'il n'a jamais hésité à me donner, pour son soutien constant, sa disponibilité et sa gentillesse qui ont contribué à l'accomplissement de cette étude. Je le remercie également de m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande gratitude. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et mon profond respect.

*J'*adresse mes remerciements au Professeur Palma M. et au personnel du Department Chimie Analytique, Faculté des Sciences, Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), Espagne, de m'avoir accueilli dans leurs établissements respectifs et pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

*Je* tiens à remercier mon co-directeur Mr Hazzit M. Professeur à l'ENSA pour ses précieux conseils et orientations.

*Je* tiens à remercier Mr Bitam A. Professeur à l'ENSA pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

*Je* souhaite remercier Mme Abrous O. Professeur à l'USTHB d'avoir accepté de participer au jury de ce travail en tant qu'examinatrice.

*Mes* vifs remerciements vont aussi à Mr Foudil-Cherif Y. Professeur à l'USTHB d'avoir accepté d'examiner ce travail.

*Je* souhaite remercier Mr Benchabane O. MCA à l'ENSA d'avoir accepté de juger ce travail.

*Mes* sentiments de reconnaissance s'étendent également au personnel du laboratoire de physiologie végétales de l'USTHB : enseignants, ingénieurs et doctorants pour leur aide, gentillesse et sympathie, plus particulièrement Lyliya BOUCELHA pour sa disponibilité, sa tendresse et son soutien sur tous les plans depuis le premier jour où j'avais mis les pieds dans le labo.

*Enfin*, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail

# Dédicaces

**A la mémoire de mon cher père qui n'a pas vu le fruit de son soutien continu et de ses encouragements**

**A ma très chère mère que dieu lui prête longue vie**

**A ma chère sœur pour son soutien constant**

**A mes frères**

**A mes oncles et leurs familles**

**A toutes mes amies**

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
1. Les composés phénoliques .....	4
1.1. Biosynthèse, classification et caractéristiques des composés phénoliques .....	4
1.1.1. Définition .....	4
1.1.2. Biosynthèse des composés phénoliques .....	5
1.1.3. Classification des composés phénoliques .....	7
1.1.3.1. Critères de classification des composés phénoliques .....	7
1.1.3.2. Les principales classes des composés phénoliques .....	10
1.1.3.2.1. Les acides phénoliques .....	10
1.1.3.2.2. Les flavonoïdes .....	11
1.1.3.2.3. Les tanins.....	12
1.1.3.2.4. Les coumarines et stilbènes.....	13
1.1.3.2.5. Les lignines .....	14
1.1.4. Rôles et intérêts des composés phénoliques.....	15
1.1.4.1. Chez les végétaux.....	15
1.1.4.1. Chez l'homme .....	16
1.1.5. Source de variabilité des composés phénoliques dans les aliments .....	18
I.1.6. Localisation au niveau cellulaire et tissulaire .....	18
I.1.6.1. Méthodes d'analyse des composés phénoliques.....	18
I.1.6.1. Extraction.....	18
1.1.6.1.1. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques .....	22
1.1.6.1.1.1. Les plans d'expériences.....	22
1.1.6.1.1.1.1 Définition .....	22
1.1.6.1.1.1.2. Vocabulaire de base des plans d'expériences.....	23
1.1.6.2. Analyse et quantification des composés phénoliques .....	26
1.1.6.2.1. Les méthodes spectrométriques.....	26
I.1.6.2.2. Les techniques chromatographiques .....	27
I.1.6.2.2.1. La chromatographie en phase gazeuse .....	27
I.1.6.2.2.2. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	28
I.1.6.2.2.3. Chromatographie en phase liquide ultra haute performance (UPLC).....	28
I.1.6.2.2.4. La spectrométrie de masse .....	29
2. Stress oxydatif et antioxydants.....	29
2.1. Définition .....	29
2.2. Espèces réactives d'oxygène (ERO) : Le paradoxe .....	30
2.3. Origine du stress oxydatif .....	32
2.4. Définition d'un radical libre .....	32
2.5. Antioxydants .....	32
2.5.1. Mécanisme d'action des antioxydants.....	33

2.5.2. Classification des antioxydants .....	33
2.5.3. Composés phénoliques des végétaux en tant qu'antioxydants.....	34
2.5.4. Les antioxydants de synthèse .....	35
2.5.5. Tests d'évaluation de l'activité antioxydante .....	36
2.5.5.1. Les tests les moins couramment utilisés.....	36
2.5.5.2. Les tests les plus utilisés.....	36
3. Monographie des espèces étudiées.....	39
3.1. La coriandre ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) .....	39
3.1.1. Taxonomie.....	39
3.1.2. Les noms vernaculaires .....	40
3.1.3. Description botanique .....	40
3.1.4. Répartition géographique .....	41
3.1.5. Composition chimique de la coriandre.....	41
3.1.6. Les composés phénoliques de la coriandre .....	42
3.1.7. Propriétés et utilisation.....	42
3.2. Le céleri ( <i>Apium graveolens</i> L.).....	43
3.2.1. Origine .....	43
3.2.2. Taxonomie .....	43
3.2.3. Noms vernaculaires .....	44
3.2.4. Description botanique .....	44
3.2.5. Propriétés et utilisations .....	44
3.3. Artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> L.).....	45
3.3.1. Taxonomie .....	45
3.3.2. Les noms vernaculaires .....	46
3.3.3. Description botanique .....	46
3.3.4. Propriétés et utilisation.....	47
3.4. Le raisin ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	47
3.4.1. Taxonomie .....	48
3.4.2. Le raisin .....	48
3.4.3. Propriété et utilisation du raisin .....	49
<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>50</b>
1. Matériel végétal.....	50
2. Méthodes .....	53
2.1. Extraction des composés phénoliques.....	53

2.1.1. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques .....	53
2.1.1.1. La macération.....	54
2.1.1.1. Protocole d'extraction .....	54
2.1.1.2. L'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes.....	55
2.1.1.2.1. L'extraction assistée par ultrasons .....	55
2.1.1.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes.....	56
2.1.1.3. La cinétique d'extraction.....	57
2.1.1.4. Validation de la méthode d'extraction .....	58
2.1.1.4.1. La réplicabilité.....	58
2.1.1.4.2. Répétabilité.....	58
2.1.1.4.3. Reproductibilité.....	58
2.2. Analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques.....	59
2.2.1. Analyse qualitative et quantitative par Chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (UPLC).....	59
2.2.1.1. Principe.....	59
2.2.1.2. Mode opératoire .....	59
2.2.2. Analyse qualitative et quantitative par Chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse (SM) (UPLC-SM).....	61
2.2.3. Mode d'identification des composés phénoliques.....	62
2.2.4. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	63
2.2.4.1. Méthode 1.....	63
2.2.4.1.1. Principe.....	63
2.2.4.1.2. Mode opératoire .....	63
2.2.4.2. Méthode 2.....	64
2.2.4.3. Méthode 3.....	65
2.3. Détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH.....	66
2.3.1. Principe.....	66
2.3.2. Protocole opératoire .....	66
2.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50) .....	66
3. Analyse statistique.....	66
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>67</b>
3.3.1.2. Optimisation de la réponse et validation du modèle .....	98

3.3.1.3. La cinétique d'extraction.....	99
3.3.1.4. Validation de la méthode.....	100
3.3.2. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par micro-ondes : application à la lutéoline identifiés chez <i>Apium graveolens</i> L. ....	101
3.3.2.1. Validation du modèle .....	102
3.3.2.2. Optimisation de la réponse et vérification du modèle.....	103
3.4. Comparaison des conditions optimales des 3 espèces étudiées .....	106
4. Comparaison de la méthode assistée par ultrasons et la méthode assistée par micro-ondes dans l'extraction de la lutéoline à partir des échantillons d' <i>Apium graveolens</i> L.....	107
5. Comparaison de la méthode de dosage des composés phénoliques par UV avec la méthode de Folin-Ciocalteu .....	108
5.1. Application à l'artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> L.) .....	108
5.2. Application à la coriandre et au céleri ( <i>Coriandrum sativum</i> L. et <i>Apium graveolens</i> L.).....	111
5.2.1. Application à <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	112
5.2.2. Application au céleri ( <i>Apium graveolens</i> L.).....	114
5.3. Application au raisin ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	118
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>122</b>

Références bibliographique

Annexes

## Liste des abréviations

AAPH	2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AG	Acide gallique
BHA	Butyl Hydroxy Anisol
BHT	Butyl Hydroxy Toluène
Cd <sup>2+</sup>	Cadmium
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Da	Dalton
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl
DPPH-H	2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
E310	Le gallate de propyle
E311	Le gallate d'octyle
E312	Le gallate de dodécyle
EAG	Equivalent acide gallique
ENSA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
eq	Equivalent
ERN	Espèces Réactives d'Azote
ERO	Espèces Réactives d'Oxygène
ES	Erreur Standard
FC	Folin-Ciocalteu
Fe <sup>2+</sup> -TPTZ	Triazine ferreuse de tripiridyl
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	Complexe ferrique de la triazine de tripiridyl
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
GPX	Glutathion peroxydase
IVAGRO	Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria
IC50	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux
J-C	Jésus Christ
m	Masse
m/z	Le rapport masse/charge
MAE	Extraction assistée par micro-onde
MDA	Malondialdehyde



MF	Matière fraîche
MS	Matière sèche
NaCl	Chlorure de sodium
O <sub>2</sub>	Oxygène
ORAC	Oxygen radical antioxidant capacity
pH	Potentiel d'hydrogène
PAL	Phénylalanine ammonialyase
PLE	Extraction par fluide pressurisé
PSC	Peroxyl Radical Scavenging Capacity
R	Coefficient de corrélation
R <sup>2</sup>	Coefficient de détermination
Rapport L/S	Rapport liquide/solide
SCFE	Extraction par fluide supercritique
SM	Spectroscopie de masse
SO <sub>2</sub>	Dioxyde de soufre
SOD	Superoxide dismutase
T	Température
TAL	Tyrosine ammonialyase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TCF	Teneur en composés phénoliques totaux
tr/mn	Tour par minute
TRAP	Total radical trapping antioxidant potential
UAE	Extraction assistée par ultrasons
UPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance
UPLC/SM	Chromatographie en Phase liquide ultra-haute performance couplée à la Spectroscopie de Masse
UV	Ultraviolet
UV/FC	Le rapport entre teneur en composés phénoliques déterminée par la méthode UV et la méthode de Folin-Ciocalteu
Z	La charge

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Squelettes de la structure des composés phénoliques (groupement hydroxyles non montrés) (Crozier <i>et al.</i> , 2006).....	10
<b>Tableau 2:</b> Récapitulatif des variétés étudiées.....	52
<b>Tableau 3:</b> Courbe d'étalonnage des composés étudiés.....	63
<b>Tableau 4 :</b> les paramètres expérimentaux étudiés chez <i>Cynara scolymus</i> L. et leurs niveaux.....	67
<b>Tableau 5 :</b> Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance pour <i>Cynara scolymus</i> L. ....	68
<b>Tableau 6:</b> Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance pour l'activité antioxydante chez <i>Cynara scolymus</i> L. ....	72
<b>Tableau 7 :</b> Les variables indépendantes et leurs niveaux .....	82
<b>Tableau 8 :</b> Le plan d'expérience Box Benhken et les résultats obtenus pour <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	83
<b>Tableau 9:</b> Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	84
<b>Tableau 10:</b> Les conditions expérimentales optimales d'extraction de l'acide caféique de <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	86
<b>Tableau 11 :</b> Les valeurs prédites et expérimentales du rendement en acide caféique sous les conditions optimales.....	87
<b>Tableau 12:</b> Quantification des composés phénoliques de trois échantillons différents de <i>Coriandrum sativum</i> L. extraits sous les conditions optimales.....	88
<b>Tableau 13 :</b> Les variables indépendantes et leurs niveaux .....	89
<b>Tableau 14 :</b> Le plan d'expérience Box Benhken et les résultats obtenus pour la Lutéoline d' <i>Apium graveolens</i> L. ....	90
<b>Tableau 15:</b> Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	91
<b>Tableau 16 :</b> Conditions expérimentales optimales pour maximiser le rendement en Lutéoline extraite à partir d' <i>Apium graveolens</i> L.....	92
<b>Tableau 17 :</b> Valeurs prédites et expérimentales du rendement en Lutéoline d' <i>Apium graveolens</i> L. extraite dans les conditions optimales.....	93
<b>Tableau 18:</b> Les variables indépendantes et leurs niveaux .....	95
<b>Tableau 19 :</b> Le plan d'expérience Box Benhken et les résultats obtenus pour <i>Apium graveolens</i> L.....	95
<b>Tableau 20:</b> Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	96

<b>Tableau 21</b> : Les conditions expérimentales optimales pour maximiser le rendement en phénols totaux d' <i>Apium graveolens</i> L.....	98
<b>Tableau 22</b> : les valeurs prédites et expérimentales du rendement en composés phénoliques totaux d' <i>Apium graveolens</i> L. dans les conditions optimales .....	99
<b>Tableau 23</b> : Les variables indépendantes et leurs niveaux .....	100
<b>Tableau 24</b> : Le plan d'expérience Box Benkhen et les résultats obtenus pour la lutéoline extraite à partir d' <i>Apium graveolens</i> L.....	101
<b>Tableau 25</b> : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	102
<b>Tableau 26</b> : Valeurs prédites et expérimentales du rendement en Lutéoline d' <i>Apium graveolens</i> L. extraite par micro-ondes.....	105
<b>Tableau 27</b> : Comparaison des conditions optimales d'extractions des composés phénoliques à partir des 3 espèces étudiées.....	106
<b>Tableau 28</b> : Les valeurs du rapport UV/FC en fonction de la concentration de méthanol..	110
<b>Tableau 29</b> : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	111
<b>Tableau 30</b> : Les valeurs du rapport UV/FC en fonction de la concentration de méthanol ( <i>Coriandrum sativum</i> L.).....	113
<b>Tableau 31</b> : Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance.....	114
<b>Tableau 32</b> : Valeurs du rapport UV/FC selon la concentration de méthanol ( <i>Apium graveolens</i> L.).....	117
<b>Tableau 33</b> : Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance .....	118
<b>Tableau 34</b> : Variation du rapport UV/FC selon les conditions expérimentales pour les extraits du raisin ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	120
<b>Tableau 35</b> : Résultats de l'analyse Statistique.....	122

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Formule chimique brute d'une fonction phénol (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH) (Stookey, 1970).....	4
<b>Figure 2</b> : Voies de biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix <i>et al.</i> , 2005).....	6
<b>Figure 3</b> : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Fleuriet <i>et al.</i> , 2006).....	9
<b>Figure 4</b> : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Amaechina <i>et al.</i> , 2007)...	10
<b>Figure 5</b> : Squelette de base des flavonoïdes.....	11
<b>Figure 6</b> : Différentes classes de flavonoïdes.....	11
<b>Figure 7</b> : Les différentes classes des composés phénoliques .....	13
<b>Figure 8</b> : Répartition des publications de la base de données Scopus (2005-2015) en fonction des méthodes d'extraction des composés phénoliques. PLE: pressurized liquid extraction, SCFE: Supercritical fluid extraction, MAE: Microwave assisted extraction,.....	20
<b>Figure 9</b> : Plan de Box-Behnken pour 4 facteurs .....	24
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de la génération des espèces réactives d'oxygène au niveau des plantes. L'activation de l'O <sub>2</sub> se produit par deux mécanismes différents (Sharma <i>et al.</i> , 2012).....	30
<b>Figure 11</b> : La coriandre ( <i>Coriandrum sativum</i> ) .....	41
<b>Figure 12</b> : Le céleri ( <i>Apium graveolens</i> ).....	44
<b>Figure 13</b> : L'artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> ) .....	47
<b>Figure 14</b> : Le raisin ( <i>Vitis vinifera</i> ).....	48
<b>Figure 15</b> : Les parties des plantes étudiées .....	52
<b>Figure 16</b> : Moulin électrique utilisé pour le broyage des herbes étudiées .....	53
<b>Figure 17</b> : Dispositif d'extraction assistée par ultrasons .....	56
<b>Figure 18</b> : Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes.....	57
<b>Figure 19</b> : Dispositif expérimental de l'UPLC .....	60
<b>Figure 20</b> : Courbe d'étalonnage de la méthode FC .....	63
<b>Figure 21</b> : Courbe d'étalonnage de la méthode UV.....	64
<b>Figure 22</b> : Principe de détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH.....	65
<b>Figure 23</b> : Effet des conditions expérimentales sur la teneur en composés phénoliques de <i>Cynara scolymus</i> L.....	69
<b>Figure 24</b> : Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH par les extraits de <i>Cynara scolymus</i> L.....	75

<b>Figure 25 :</b> La corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH des extraits de <i>Vitis vinifera</i> L.....	76
<b>Figure 26:</b> Chromatogrammes de <i>Coriandrum sativum</i> L. à 350 nm, 320 nm et 280 nm .....	78
<b>Figure 27:</b> Chromatogramme de l'acide caféique (le composé majoritaire de <i>Coriandrum sativum</i> L.). Temps de rétention= 2.79 min. ....	79
<b>Figure 28:</b> Chromatogramme de de <i>Apium graveolens</i> L. à 280 nm. ....	80
<b>Figure 29:</b> Chromatogramme du composé majoritaire de <i>Apium graveolens</i> L. (Lutéoline) (1) comparé au chromatogramme du standard lutéoline.....	80
<b>Figure 30 :</b> Variation du rendement en acide caféique de <i>Coriandrum sativum</i> L. en fonction du méthanol % et le rapport liquide/solide.....	85
<b>Figure 31 :</b> Effet des conditions expérimentales sur le rendement en acide caféique de <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	86
<b>Figure 32:</b> Cinétique d'extraction de l'acide caféique de <i>Coriandrum sativum</i> L.....	87
<b>Figure 33 :</b> Effets des conditions expérimentales sur le rendement en Lutéoline extraite à partir d' <i>Apium graveolens</i> L.....	92
<b>Figure 34 :</b> La cinétique d'extraction de la Lutéoline à partir des échantillons d' <i>Apium graveolens</i> L. ....	93
<b>Figure 35 :</b> Effets des conditions expérimentales étudiées sur le rendement des composés phénoliques d' <i>Apium graveolens</i> L. ....	98
<b>Figure 36:</b> La cinétique d'extraction des phénols totaux d' <i>Apium graveolens</i> L. par la méthode assistée par micro-ondes.....	99
<b>Figure 37 :</b> Effets des conditions expérimentales sur le rendement en Lutéoline extraite à partir d' <i>Apium graveolens</i> L. par micro-ondes .....	103
<b>Figure 38 :</b> Les conditions optimales pour maximiser le rendement en Lutéoline extraite à partir de <i>Apium graveolens</i> L. ....	104
<b>Figure 39 :</b> Courbes de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MS) Quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons de <i>Cynara scolymus</i> L.....	109
<b>Figure 40 :</b> Effets des conditions expérimentales sur le rapport UV/FC .....	111
<b>Figure 41:</b> Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons de <i>Coriandrum sativum</i> L. ....	113
<b>Figure 42 :</b> Effets des conditions expérimentales sur le rapport UV/FC de la coriandre ( <i>Coriandrum sativum</i> L.).....	115

<b>Figure 43:</b> Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons d' <i>Apium graveolens</i> L.....	116
<b>Figure 44 :</b> Effets des condition experimentales sur le rapport UV/FC ( <i>Apium graveolens</i> L.) .....	117
<b>Figure 45:</b> Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons du raisin ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	119

## Introduction

Depuis son apparition sur terre, l'Homme a entretenu d'étroits rapports avec le monde végétal, à la fois à des fins alimentaires (pour son alimentation et celle des animaux qu'il apprivoise), de protection (celle de ses abris et pour ses vêtements), énergétiques (feu, énergie fossile) et de lutte contre la maladie par constitution d'une médecine et d'une pharmacopée traditionnelle. En effet, outre la photosynthèse et le métabolisme primaire, les plantes offrent à l'homme une infinie diversité de molécules à potentiel bioactif intéressant portant le nom de métabolites secondaires (Muanda, 2010). Il est à noter que la synthèse de ces métabolites peut être une réponse de la plante aux facteurs environnementaux tels que l'augmentation de la température, l'exposition aux rayons ultraviolets, les attaques par des agents pathogènes, ou par des prédateurs, comme elle peut être une synthèse dans les conditions de croissance les plus ordinaires (Herero *et al.*, 2012).

L'organisme vivant produit constamment des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives d'oxygène (ERO). Elles sont une conséquence inévitable du métabolisme cellulaire et des facteurs environnementaux (Berben *et al.*, 2012). A de faibles concentrations, ces espèces chimiques sont indispensables pour de nombreuses fonctions physiologiques telles que la croissance cellulaire, l'expression des gènes ainsi que la prévention des infections (Kunwar *et al.*, 2011). En revanche, il est établi qu'une production dépassant les besoins cellulaires en ces espèces déclenche un stress oxydatif qui est un déséquilibre de la balance pro-oxydant / antioxydant en faveur des premiers. Le stress oxydatif est bien connu pour être impliqué dans l'altération des macromolécules notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Defeng *et al.*, 2003) et par conséquent le développement de nombreuses maladies humaines (athérosclérose, hypertension, diabète, cancer...) (Yoshikawa and Naito 2002 ; Dehaven *et al.*, 2007).

La neutralisation des ERO en excès et la prévention des effets nocifs qu'elles sont susceptibles d'engendrer, fait intervenir des systèmes de défense de nature antioxydante. Le rôle protecteur des antioxydants contre le stress oxydatif et les maladies qui en résultent a été bien mis en évidence par les scientifiques.

Les composés phénoliques représentent le groupe d'antioxydants naturels le plus abondant dans le règne végétal et le plus étudié. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles (Crosier *et al.*, 2009 ; Lima *et al.*, 2014). Ainsi, la réorientation des consommateurs vers l'utilisation des

produits d'origine naturelle, comme alternative pour la réduction des risques causés par les antioxydants issues de la synthèse chimique, fait de l'étude de ces molécules bioactives un sujet de recherche très actuel. Les composés phénoliques ont été pendant longtemps mal connus, ce n'est qu'au cours des dernières années que la science a commencé à élucider leurs propriétés et confirmer leurs différentes vertus dans divers domaines d'application. L'intérêt particulier porté aux composés phénoliques est lié à leurs effets bénéfiques et protecteurs sur la santé humaine.

Il a été prouvé que les composés phénoliques, grâce à leurs activités biologiques, se trouvent impliqués dans la prévention des maladies infectieuses, dégénératives et allergiques liées au stress oxydatif (Yordi *et al.*, 2012), par différents mécanismes incluant l'élimination des radicaux libres, la régénération des antioxydants (Vit E) ainsi que leur action comme chélateurs de pro-oxydant métaux (Lima *et al.*, 2014 ; Ozcan *et al.*, 2014). De plus ils sont intimement associés aux qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments qu'ils soient frais ou transformés (Ho *et al.*, 1992). Ils sont largement répartis dans le règne végétal, en particulier dans les fruits, les légumes, les céréales ainsi que les boissons et les épices (Giada, 2013). De nos jours, plus personne ne conteste l'effet positif de la consommation des fruits et légumes sur la santé. Ils représentent une source inépuisable de minéraux, acides gras essentiels, fibres, vitamines (C, E, B) ainsi que les substances bioactives.

L'ensemble des études menées dans diverses régions du globe montrent indéniablement qu'une consommation accrue en fruits et légumes conduit à une augmentation significative de la concentration plasmatique en antioxydants (Pincemail *et al.*, 2007). Un apport régulier en ces aliments a pu être associé à une réduction des risques de maladies chroniques à l'instar des maladies cardiovasculaires, du diabète et du cancer (Crosier *et al.*, 2009 ; Desjardin *et al.*, 2014).

Les propriétés biologiques des composés phénoliques se sont avérées être fortement dépendantes de leurs structures chimiques et des méthodes de leur extraction (Balasundram *et al.*, 2006). Ainsi, la prise de conscience de l'importance de ces biomolécules fait que les chercheurs des secteurs pharmaceutique et agroalimentaire ne cessent de faire preuve d'énormes efforts dans l'amélioration des techniques d'extraction, de séparation et d'identification des composés phénoliques dans les aliments dans le but d'une meilleure connaissance de ces composés afin d'en tirer le meilleur profit (Herero *et al.*, 2012).



Notre travail s'inscrit dans ce cadre en vue d'une meilleure connaissance et exploitation des composés phénoliques des fruits et légumes en facilitant leur extraction et quantification.

Cette thèse débutera par une introduction générale laquelle sera suivie d'une synthèse bibliographique reprenant l'état de l'art.

Un deuxième chapitre sera consacré à la méthodologie

Le chapitre trois, constitué de quatre parties, sera dédié aux résultats et à leur discussion. Dans la première partie, nous traiterons de l'effet des conditions expérimentales sur le rendement en composés phénoliques et de l'activité antioxydante des extraits. Nous estimerons l'activité antioxydante par piégeage du radical DPPH des différents extraits phénoliques, ainsi que la corrélation entre cette activité et la teneur en composés phénoliques de l'extrait d'artichaut et du raisin. La deuxième partie sera consacrée à l'identification de quelques composés phénoliques de céleri (*Apium graveolens* L.) et de la Coriandre (*Coriandrum sativum* L.) par UPLC et UPLC couplée à la spectrométrie de masse. Dans la troisième partie, nous traiterons de l'optimisation des conditions expérimentales d'extraction des composés phénoliques à partir de *Cynara scolymus* L., *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L. et *Vitis vinifera* L. par différentes méthodes (macération, méthode assistée par ultrasons, ainsi que la méthode assistée par micro-ondes). Enfin dans une dernière partie, sera réalisée une étude comparative entre deux méthodes colorimétriques de quantification des composés phénoliques (méthode de Folin-Ciocalciu, FC et la méthode par ultra-violet, UV). Les extraits utilisés sont obtenus à partir de quatre espèces végétales cultivées et largement utilisées dans notre mode alimentaire : *Cynara scolymus* L. (artichaut), *Coriandrum sativum* L. (coriandre), *Apium graveolens* L. (céleri) et *Vitis vinifera* L. (raisin), sous différentes conditions expérimentales.

Une conclusion générale clôturera cette thèse.

## CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Les composés phénoliques

A côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les végétaux élaborent souvent des métabolites secondaires appartenant à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...), représentant une source incontournable pour l'homme dans différents domaines (Murray, 2009). Les composés phénoliques représentent les métabolites secondaires les plus étudiés et les plus usités.

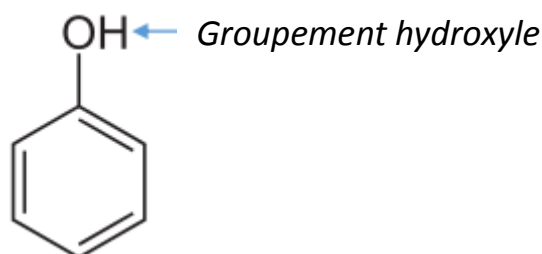
#### 1.1. Biosynthèse, classification et caractéristiques des composés phénoliques

##### 1.1.1. Définition

Les composés phénoliques représentent un terme générique qui désigne un ensemble vaste de substances aromatiques appartenant aux groupes des métabolites secondaires, souvent considérées comme métaboliquement inactives (Luthar 1992 ; Castellano 2012).

Ils sont très répandus dans le règne végétal, d'une nature bioactive et particulièrement responsables des propriétés organoleptiques des aliments (Yordi et *al.*, 2012). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux soient les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, le pollen, les fruits, les graines et le bois (Boizot and Charpentier 2006).

Sur le plan structural, les composés phénoliques se caractérisent par la présence d'au moins un noyau aromatique à 6 atomes de carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de substituants hydroxyles (**Fig. 1**). A l'heure actuelle, plus de 8000 composés répondant à ces critères ont été isolés et identifiés (Dai and Mumper 2012).



**Figure 1** : Formule chimique brute d'une fonction phénol ( $C_6H_5OH$ ) (Stookey, 1970)

La complexité du squelette de base de ces composés détermine leurs différentes classes ; ils peuvent s'étendre des molécules les plus simples, telles que les acides phénoliques, aux structures hautement polymérisées, telles que les tanins (Macheix *et al.*, 2005).

### 1.1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des flavonoïdes, des stilbènes, des hydroxycinnamates ainsi que des acides phénoliques implique un processus complexe. Les non flavonoïdes sont formés *via* la voie de l'acide shikimique et la voie des phénylpropanoïdes, à l'inverse des flavonoïdes qui impliquent l'interaction des deux voies (**Fig. 2**) (Crozier *et al.*, 2009).

L'acide shikimique donne naissance à des acides aminés aromatiques qui sont la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, elle constitue la première étape de formation des composés phénoliques (Hopkins, 2003).

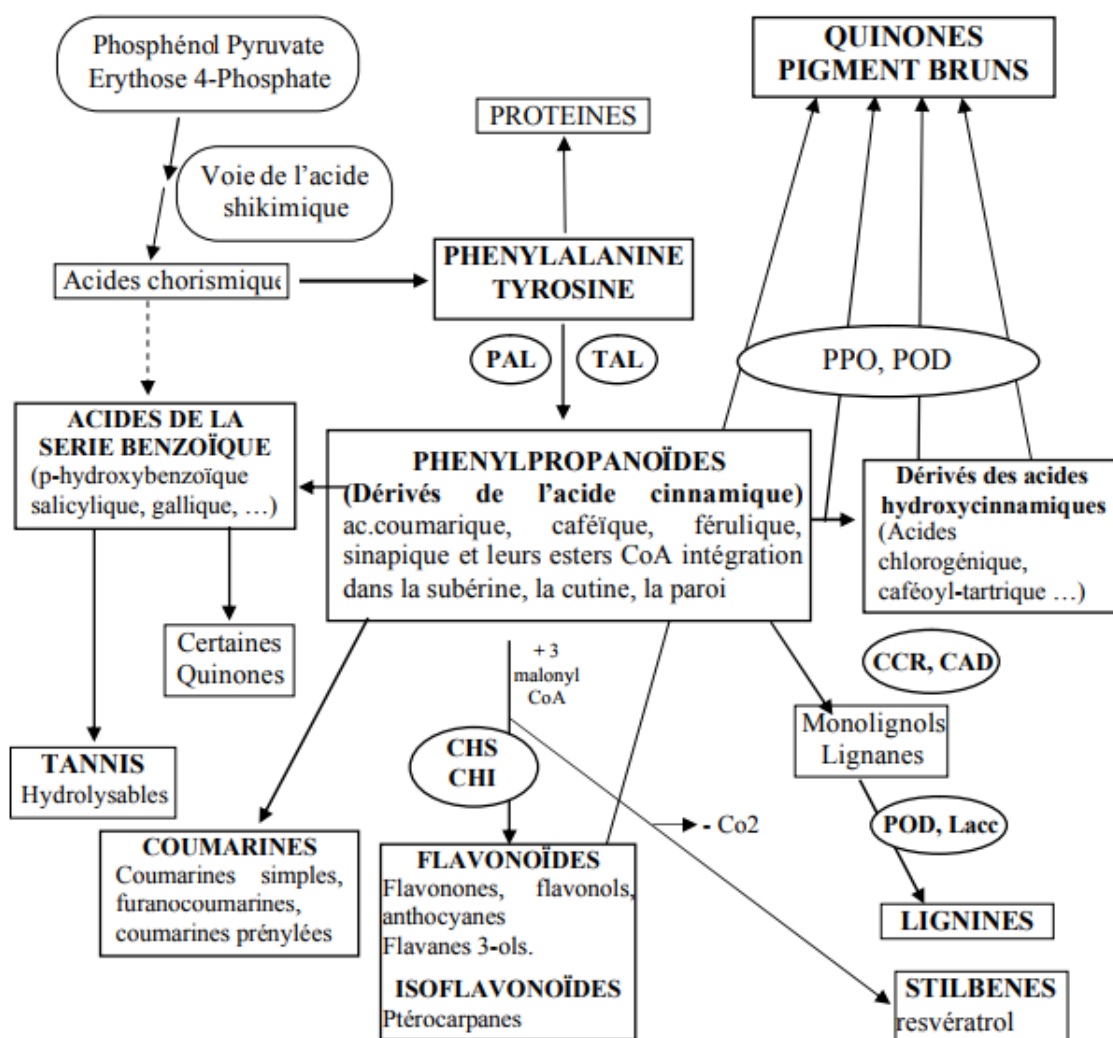
Cette voie de biosynthèse n'est présente que chez les végétaux, son siège est dans le chloroplaste où s'effectue la formation des acides aminés aromatiques, ensuite ces derniers seront transportés dans le cytosol pour la synthèse des composés phénoliques (Weaver and Herrman 1997).

L'ammonialyase représente l'enzyme clé de la synthèse des composés phénoliques. La désamination de la phénylalanine sous l'action de cette enzyme (Phénylalanine ammonialyase PAL) est à l'origine de l'acide cinnamique d'où le nom de la voie des phénylpropanoïdes. L'acide cinnamique ainsi formé est ensuite hydroxylé par la C<sub>4</sub>H (cinnamate-4-hydroxylase) en acide *p*-coumarique. La désamination de la tyrosine par la TAL (Tyrosine ammonialyase) peut constituer à son tour une source directe de l'acide *p*-coumarique. Par l'action de la 4CL (4-coumaroyl:CoA-ligase) l'acide *p*-coumarique dérivé des deux acides aminés sera converti en 4-coumaroyl CoA (Croteau *et al.*, 2000).

L'hydroxycinnamoyl et le *p*-coumaroyl coenzyme A ester sont les précurseurs communs des différentes classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 1990). Les stilbènes et les flavonoïdes sont issues de la condensation de 3 molécules de malonyl-CoA correspondant au noyau A et d'une molécule d'acide cinnamique qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanyle. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthétase, l'enzyme clé de la synthèse des flavonoïdes. Elle contribue à l'apparition d'un intermédiaire

commun des différentes classes des flavonoïdes, la chalcone (Muanda 2010 ; Winkel-Shirley 2001).

Les chalcones vont rentrer dans une chaîne de réactions générant de nombreuses sous-classes de flavonoïdes sous le contrôle de plusieurs enzymes (les chalcones isomérases, les flavones synthétases, flavanones 3-hydroxylases, flavonols synthétases). Ensuite la glycosylation et l'acylation ultérieure vont permettre d'achever la modélisation et la différenciation finale des flavonoïdes. (Verdu 2013; Khater 2011 ; Outaleb 2010 ; Muanda 2010).



**Figure 2 :** Voies de biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix et al., 2005). (PAL : Phénylalanine ammonialyase, TAL : Tyrosine ammonialyase, PPO : polyphénoloxydase, POD : Peroxydase, CHS : Chalcone synthase, CHI : Chalcone isomérase, CCR : cinnamoyl-CoA reductase, CAD : Carbamoyl-phosphate synthetase, Lacc :lignine acétyl-coenzyme carboxylase).

### 1.1.3. Classification des composés phénoliques

#### 1.1.3.1. Critères de classification des composés phénoliques

Bien que les composés phénoliques possèdent en commun un noyau aromatique, leurs structures chimiques restent largement diversifiées. Ces variations permettent de les classer sur la base de plusieurs critères.

En 1962, Swain and Bate les ont classés en composés répandus et autres peu répandus. Tandis que Harbone and Simmonds (1964) ont distingué 3 catégories selon le nombre de carbone dans la molécule : composés simples (C<sub>6</sub>), oligomères et polymères (Alothman, 2009). Ho *et al.*, (1992) les ont réparti en trois grandes classes : les phénols simples, les acides phénoliques, les dérivés de l'acide hydroxycinnamiques et flavonoïdes.

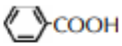
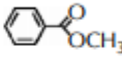
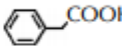
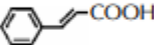

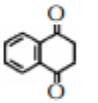
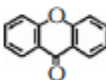
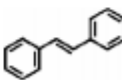
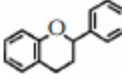
Les composés phénoliques sont communément classés en fonction des voies de biosynthèse impliquées dans leur élaboration en une dizaine de grandes classes allant des formes simples (phénols simples, acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, naphthoquinones, stilbènes, flavonoïdes, lignanes...) aux phénols condensés issus de la polymérisation des lignanes (lignines) ou des flavonoïdes (tanins) (Macheix *et al.*, 2005).

Le nombre de noyaux aromatiques est un autre critère qui a permis de répartir les composés phénoliques des végétaux en deux classes : les phénols simples et les polyphénols. La première classe est représentée par les mono-phénols, les diphénols et les acides phénoliques ; tandis que la seconde renferme les coumarines, les lignines, les lignanes, les tanins (hydrosolubles et condensés) ainsi que les flavonoïdes (Shahidi and Tang 2005).

En se référant à la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique, Merghem (2009) a distingué : les dérivés en C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>, les dérivés en C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>, les composés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ainsi que les tannins qui résultent de la polymérisation des dérivés aromatiques précédemment cités.

Compte tenu de leur squelette de base (le nombre ainsi que l'arrangement des atomes de carbone qui les constituent), les composés phénoliques se subdivisent en deux grands groupes uniquement. Il s'agit des flavonoïdes et des non flavonoïdes (**Tableau 1**) (Crozier *et al.*, 2009).

**Tableau 1** : Squelettes de la structure des composés phénoliques (groupement hydroxyles non montrés) (d'après Crozier *et al.*, 2006).

Number of carbons	Skeleton	Classification	Example	Basic structure
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Phenolic acids	Gallic acid	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetophenones	Gallacetophenone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Phenylacetic acid	<i>p</i> -Hydroxyphenyl-acetic acid	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hydroxycinnamic acids	<i>p</i> -Coumaric acid	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarins	Esculetin	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiferin	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbenes	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoids	Naringenin	

Le groupe des non flavonoïdes comprend une variété de composés tels que les acides phénoliques, les hydroxycinnammates et leurs dérivés conjugués, les coumarines ainsi que les stilbènes (Crozier *et al.*, 2009).

Selon leur distribution dans la nature, ils se répartissent en composés rares : dont les phénols simples, le pyrocatechol, l'hydroquinone, resorcinol ; composés abondants : tels que les flavonoïdes et leurs dérivés, les coumarines ainsi que les acides phénoliques) et enfin les polymères qui sont les tanins et les lignines.

En fonction de leur état dans la cellule, les composés phénoliques sont soit libres dans la fraction liquide soit liés aux constituants de la paroi cellulaire. Ils se subdivisent aussi en composés solubles et composés insolubles selon leur structure chimique (Giada, 2013).

- Composés solubles : Ce groupe est représenté par les phénols simples, les flavonoïdes, ainsi que les tanins à faible poids moléculaire non liés aux parois cellulaires.

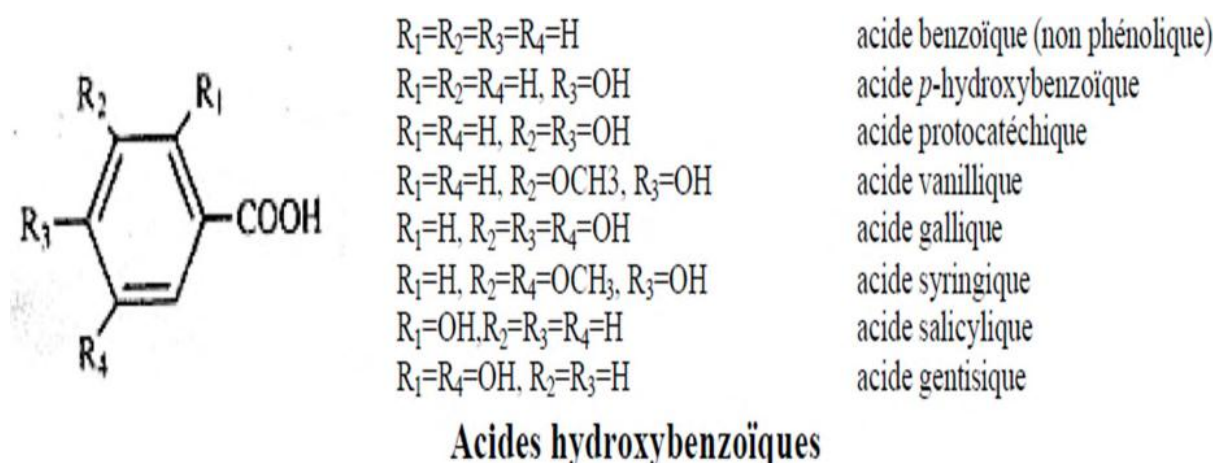
• Composés insolubles: Ce groupe est constitué essentiellement par les tanins condensés, les acides phénoliques ainsi que tout autre composé phénolique à faible poids moléculaire lié aux parois cellulaires.

### 1.1.3.2. Les principales classes des composés phénoliques

#### 1.1.3.2.1. Les acides phénoliques

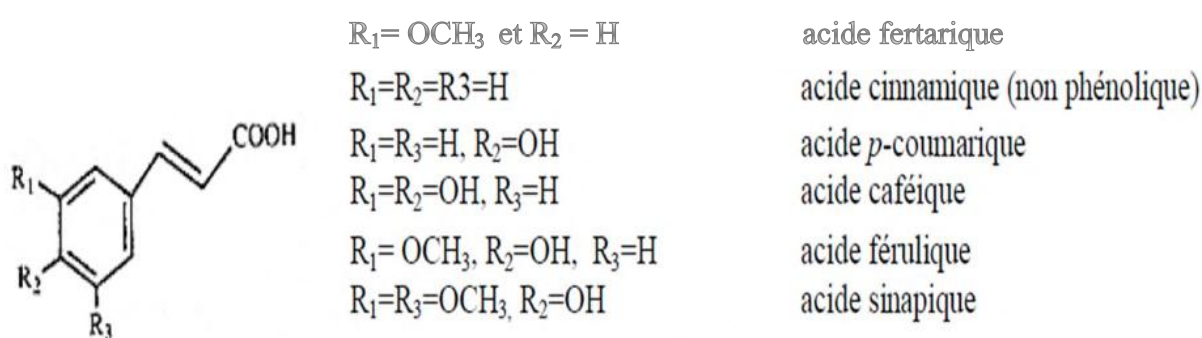
Le terme acides phénoliques désigne le groupe des composés phénoliques qui possède une seule fonction carboxyle. Ce groupe se partage en deux types d'acides : les benzoïques et les hydroxycinnamiques (Balasundram *et al.*, 2006).

➤ Les acides hydroxybenzoïques : Ils ont en commun la structure C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ils sont principalement représentés par les acides *p*-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques et gentisiques (**Fig.3**).



**Figure 3** : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Fleuriet *et al.*, 2006).

➤ Les acides hydroxycinnamiques : Ils possèdent en commun une structure de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Les composés les plus fréquents de ce groupe sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféïque, l'acide fertarique et l'acide sinapique (**Fig. 4**)



### Acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes »

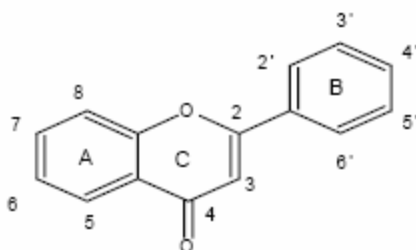
**Figure 4:** Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Amaechina et *al.*, 2007).

#### 1.1.3.2.2. Les flavonoïdes

Ils représentent une classe de métabolites secondaires très répandue dans le règne végétal. Ils se trouvent souvent assimilés à des pigments responsables de la coloration des fleurs et des fruits comme les flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes) et les anthocyanosides rouges, bleus ou violets.

Les flavonoïdes représentent la classe des pigments la plus répandue dans le monde végétal après la chlorophylle et les caroténoïdes. Ils sont impliqués dans l'action protectrice contre les effets nocifs de la lumière UV. De plus ils sont connus pour participer au processus de pollinisation ainsi qu'à la croissance des végétaux (Croteau *et al.*, 2000 ; Stalika 2007 ; Portet 2007).

Ce sont des composés naturels polyphénoliques ayant en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) (**Fig. 5**); ou les deux noyaux benzéniques sont liés par un pont de 3 carbones.

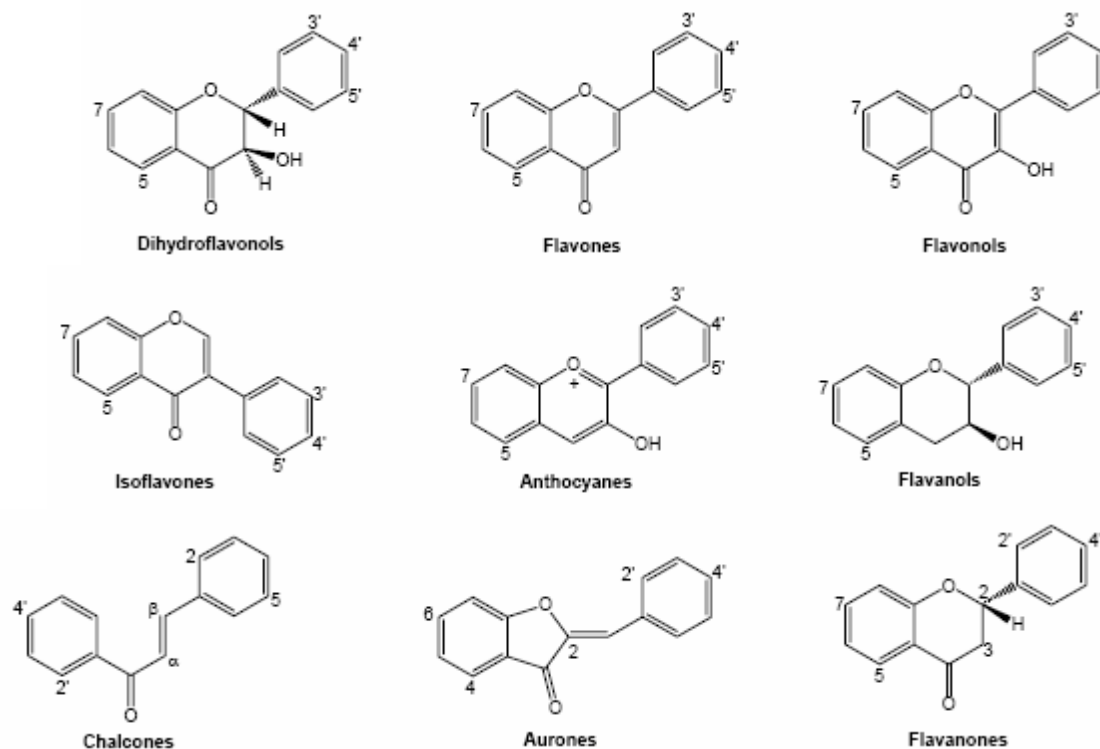


**Figure 5:** Squelette de base des flavonoïdes

Les principales sous-classes des flavonoïdes sont de l'ordre de 10 : les flavonols, les flavones, les flavanols, les anthocyanidines, les flavanones, les chalcones les isoflavones



dihydroflavonols, flavan-3,4-diols, dihydrochalcones ainsi que les auronnes (**Fig. 5**). (Crozier *et al.*, 2009).



**Figure 6:** Différentes classes de flavonoïdes.

### 1.1.3.2.3. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques d'un poids moléculaire compris entre 500 et 20000 Da ; ils doivent leur nom à leur capacité à précipiter les protéines. Ils sont largement présents dans les diverses espèces botaniques, notamment chez les végétaux supérieurs (Bruneton 1999 ; Manolaraki 2011). Dans la grande diversité des tanins végétaux, deux groupes se distinguent (**Fig. 7**). Récemment un troisième groupe, les phlorotanins, a été mis en évidence (Lattanzio, 2013).

#### *Les tanins hydrolysables*

Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes en oses (généralement le glucose) et en acides phénols. Selon la nature de l'acide phénol on distingue (Hartzfeld *et al.*, 2002):

- Tanins galliques ou gallo-tanins. Ils libèrent par hydrolyse l'acide gallique et leurs dérivés galloylés.
- Tanins ellagiques ou ellagi-tanins. Ils libèrent par hydrolyse le sucre accompagné de l'acide gallique, les acides ellagique, hexahydroxydiphénique, valonique etc.

### ***Les tanins condensés***

Egalement nommés proanthocyanidines ou encore tanins catéchiques. Ce sont des oligomères ou des polymères de flavonoïdes, spécialement les flavan-3-ols (Shahidi *et* Naczk 2006). Ils présentent des propriétés communes avec les tanins hydrolysables, à savoir la précipitation des protéines. Habituellement ils sont présents dans les tissus épidermiques des plantes, dans les feuilles, l'écorce et le phloème (Shahidi and Naczk 2006 ; Stevanovic 2005 ; Garcia-Perez 2008).

### ***Les phlorotanins***

C'est un groupe de tanins récemment isolé chez différents types d'algues

#### **1.1.3.2.4. Les coumarines et stilbènes**

##### ***Les coumarines***

Il s'agit de substances naturelles appartenant à la famille des benzopyranones (**Fig. 7**). Un grand nombre d'entre elles a été identifié. Les plus complexes sont surtout décrites chez les Apiaceae et les Rutaceae. Les furano et les pyranocoumarines sont à l'origine de la phototoxicité de certaines espèces végétales appartenant à ces familles.

Dans la plante, les coumarines se localisent dans divers organes : les graines, les racines, la tige, les feuilles, les fruits et les fleurs ; avec une accumulation considérable dans les deux derniers organes (Corteau *et al.*, 2000 ; Krief 2003).

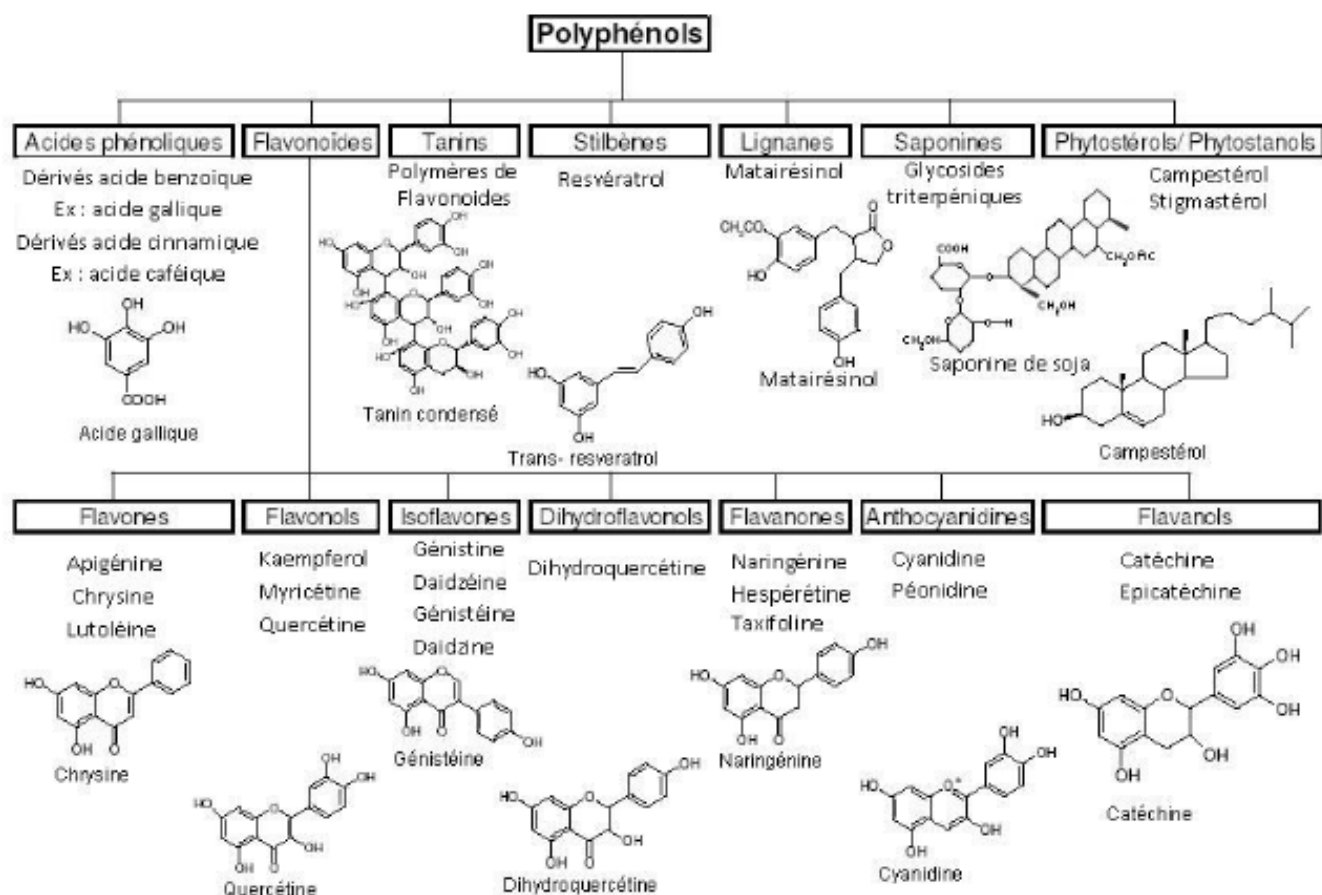
##### ***Les stilbènes***

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques sont reliés par deux carbones, eux-mêmes unis par une double liaison. Ils jouent un rôle pivotant dans la protection de la santé humaine. Ils sont présents chez les bryophytes, les ptéridophytes, les gymnospermes et les angiospermes. Près de 300 différentes structures de stilbenoïdes ont été identifiés (**Fig. 7**) (Lambert 2011 ; Tiwari and Rana 2015).

#### **1.1.3.2.5. Les lignines**

Ce sont des biomolécules de la famille des macromolécules polymères. Elles représentent le deuxième bio-polymère le plus abondant sur terre après la cellulose. Elles

résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols (**Fig. 7**) (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).



**Figure 7** : Les différentes classes des composés phénoliques (@<sup>1</sup>).

Leur principal rôle est d’apporter la rigidité aux végétaux ligneux. En outre, elles constituent une barrière physique contre les attaques des prédateurs et des insectes (Vermerris and Nicholson 2006).

### 1.1.4. Rôles et intérêts des composés phénoliques

#### 1.1.4.1. Chez les végétaux

Dans le passé, les composés phénoliques ont été considérés comme métaboliquement inertes vu qu’ils n’ont pas semblé avoir une fonction claire dans les organismes qui les produisent (Garcia-Perez, 2008). Récemment, grâce aux progrès connus par la science dans les techniques analytiques et les approches moléculaires, l’importance des composés phénoliques a pu être élucidée.

Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils lui servent de support mécanique grâce à la lignine. Leur rôle est largement montré dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique. Ils sont impliqués dans les fonctions de croissance, de développement, reproduction et de défense contre les agents pathogènes, les herbivores ou tout autres types de stress tel que les rayons UV, de plus ils participent fortement aux critères de qualité organoleptique qui orientent le choix du public dans sa consommation (Macheix *et al.*, 2005 ; Vermerris and Nicholson 2007 ; Vasco 2009 ; Lattanzio 2013).

Une activation du métabolisme phénylopropanoïdiques accompagnée d'une augmentation de la teneur en composés phénoliques a été observée chez des végétaux soumis à des conditions défavorables et/ou des facteurs stressants (Mickalak *et al.*, 2006). En outre, des isoflavones et autres flavonoïdes ont été identifiés chez des végétaux attaqués par des agents infectieux (Takahama *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003).

Le métabolisme des composés phénoliques est associé à la résistance des végétaux au stress thermique et au changement des apports en nutriments. Une production accrue de ces molécules a été mise en évidence chez des végétaux cultivés dans des conditions de carence en nutriments et de températures basses (Yamasaki *et al.*, 1997 ; Ruiz *et al.*, 2003).

Il a été prouvé que les végétaux accumulent les flavonoides absorbant les rayons UV, ainsi que d'autres composés phénoliques principalement au niveau des vacuoles des cellules épidermiques, dans le but de s'opposer à la pénétration des rayons UV-B dans les tissus (Kondo *et al.*, 2000).

Une induction de la biosynthèse des composés phénoliques a été enregistrée chez le blé, comme réponse des plants à la présence du nickel (Diaz *et al.*, 2001), et chez le maïs suite à l'exposition des plants à l'aluminium (Winkel-Shirley, 2002).

Une accumulation inhabituelle de composés phénoliques solubles et insolubles a été observée chez *Phaseolus vulgaris* exposé à  $Cd^{2+}$ . De même, les feuilles de *Phyllanth tenelus* pulvérisées par du sulfate de cuivre semblent contenir plus de composés phénoliques que le témoin intacte (Diaz *et al.*, 2001).

Les analyses biochimiques réalisées par spectrophotométrie sur des organes foliaires de maïs âgés de 21 jours, soumis à un stress salin par augmentation de la concentration en NaCl ;

ont démontré une augmentation de la teneur en composés phénoliques (Lepengue *et al.*, 2012).

#### 1.1.4.1. Chez l'homme

Les composés phénoliques suscitent un intérêt croissant de la communauté scientifique mais aussi des professionnels de la santé et des partenaires économiques. En effet, on a assisté à une augmentation du nombre des travaux qui traitent de ces substances. Compte tenu de leur diversité et de leur large distribution dans la nature, ils sont considérés comme étant le groupe le plus important des antioxydants naturels.

Les propriétés biologiques des composés phénoliques sont spécifiquement attribuées aux stilbénoides, les hydroxytyrosols, l'acide éllagique et les flavonoïdes. (Yordi *et al.*, 2012; Garcia-Salas 2010).

La réactivité des composés phénoliques est liée, d'une façon ou d'une autre, aux propriétés chimiques du noyau aromatique ; Le benzène est d'une nature acide du moment qu'il est prédisposé à perdre un H<sup>+</sup> en solution. De ce fait les composés phénoliques agissent comme des acides faibles, et leur acidité varie selon la structure de la molécule ainsi que les substituants sur le noyau aromatique (Allothman, 2009).

Leur oxydation est l'un des aspects les plus intéressants en biologie. Une alimentation riche en composés phénoliques a déjà été associée à des risques plus faibles de certains cancers et maladies cardiovasculaires (Garcia-Salas, 2010).

Un rôle important leur est attribué dans la prévention des maladies associées au stress oxydatif. Les études épidémiologiques réalisées *in vitro* mais aussi *in vivo* ont mis en évidence les propriétés anti-oxydatives ainsi que d'autres activités biologiques spécifiques de ces molécules (Dai and Mumper, 2012).

Ils sont capables de piéger les radicaux libres, inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils disposent aussi de propriétés chélatrices leur permettant de piéger les ions métalliques ainsi qu'un rôle de modulateur de certaines activités enzymatiques (Robard *et al.*, 1999) .

Grâce aux propriétés chimiques des composés phénoliques, la possibilité de leur utilisation comme substituants aux antioxydants synthétiques dans les aliments a émergé. Les flavonoïdes faisant partie des composés phénoliques sont largement étudiés dans différents

domaines. On leur reconnaît des propriétés variées: veinotonique, anti-tumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépato-protectrice.

Les flavonoïdes sont généralement de puissants antioxydants; certains de ces composés présentent en effet une activité antioxydante jusqu'à 200 fois supérieure à celle de la vitamine E. Ils favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide (Muanda 2010; Massaux 2012).

Les cellules de l'homme et des animaux sont incapables de synthétiser ces molécules, partant de là, un apport régulier en aliments riches en composés phénoliques s'impose. A ce jour, aucune quantité quotidienne d'antioxydants n'a été officiellement recommandée mais la consommation minimale en polyphénols préconisée dans la littérature est souvent de 1 g par jour.

Bien que ces composés soient abondants dans notre alimentation, leurs effets sur la santé dépendent de la quantité consommée mais aussi de leur biodisponibilité qui varie d'un polyphénol à l'autre (Massaux, 2012).

#### **1.1.5. Source de variabilité des composés phénoliques dans les aliments**

Les cellules végétales disposent d'une large diversité de métabolites à haut potentiel antioxydant entre autres : l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les composés phénoliques etc... Chez l'homme, ces composés sont principalement apportés par les fruits, les légumes ou les boissons.

Leur teneur et leur composition dans les végétaux sont influencées par de nombreux facteurs internes et externes. Internes tels que l'état physiologique du fruit, la position de celui-ci sur l'arbre, le génotype etc...

Certains facteurs externes comme les conditions pédoclimatiques, les pratiques culturales, le stockage et la transformation peuvent à leur tour modifier le profil en composés phénoliques et donc leur potentiel antioxydant (Mehinagic *et al.*, 2011).

### **I.1.6. Localisation au niveau cellulaire et tissulaire**

Les polyphénols (anthocyanes, tanins, flavonoïdes) s'accumulent principalement dans les vacuoles végétales. Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) peuvent également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à de très faibles concentrations (Thiery, [d1n7iqsz6ob2ad.cloudfront.net/document/pdf/53971e7709d0a.pdf](https://d1n7iqsz6ob2ad.cloudfront.net/document/pdf/53971e7709d0a.pdf)).

A l'échelle tissulaire, les anthocyanes et les pigments de types flavonols, sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles. Mais certains d'entre ces organes montrent cependant une accumulation des anthocyanes dans les tissus profonds (fraise, cassis) (Thiery, [d1n7iqsz6ob2ad.cloudfront.net/document/pdf/53971e7709d0a.pdf](https://d1n7iqsz6ob2ad.cloudfront.net/document/pdf/53971e7709d0a.pdf)).

#### **I.1.6.1.Méthodes d'analyse des composés phénoliques**

##### **I.1.6.1. Extraction**

Les activités biologiques et anti-radicalaires des composés phénoliques sont intimement liées à leur taux d'extraction, d'où la nécessité d'en isoler un maximum (Vongsak *et al.*, 2013).

L'extraction des substances actives à partir des structures cellulaires qui les renferment constitue une étape cruciale dans l'analyse aussi bien que dans l'exploitation des molécules phytochimiques : dans la préparation des suppléments alimentaires, des substances nutraceutiques et aussi des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Dai and Mumper 2012).

En conséquence, l'accent a été mis sur l'étude des différentes méthodes afin de mettre en place des protocoles qui assurent l'obtention d'un maximum de composés phénoliques avec des activités biologiques accrues. Une méthode optimale est décrite par Pothitira *et al.*, (2010) comme étant la plus simple, la plus rapide, la plus économique et applicable à grande échelle .

L'extraction par Soxhlet et par macération sont des méthodes conventionnelles auxquelles il est fait recours pour extraire les composés phénoliques à partir des échantillons solides (Izmir *et al.*, 2013). Le Soxhlet a été mis au point pour la première fois par Von Soxhlet (1879) essentiellement pour l'extraction des lipides.

De nos jours, son usage n'est plus limité aux lipides uniquement. Il devient un appareil très répandu dans l'extraction des composés phénoliques et il est généralement performé à 90° C pour plusieurs heures (Khodami *et al.*, 2013 ; Izmir *et al.*, 2013).

La macération est une méthode traditionnelle qui présente l'avantage d'être simple, peu coûteuse et rentable en termes de quantité des composés phénoliques extraite mais aussi de la qualité de leurs propriétés biologiques. De plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules phénoliques thermolabiles. Toutefois, l'utilisation des températures modérées confère à la macération son inconvénient d'être lente (Vongsak *et al.*, 2013 ; Garcia-Perez 2008). Par ailleurs, des études récentes ont démontré l'inverse : les courtes durées d'extraction ont une efficacité comparable à celle des longues durée (Mirali *et al.*, 2014).

Les problèmes majeurs soulevés par les méthodes traditionnelles résident dans la perte de temps et des solvants, l'altération des composés thermolabiles ainsi que le manque d'efficacité (Izmir *et al.*, 2013).

Ces inconvénients ont suscité une demande accrue pour des techniques alternatives qui font appel à des conditions accélératrices. En effet, plusieurs méthodes ont été mises en place par les chercheurs telles que l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons et micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par pression hydrostatique élevée. Ces méthodes permettent d'économiser du temps et le solvant d'extraction, outre qu'elles diminuent la pollution et présentent l'avantage d'être simples (Khodami *et al.*, 2013).

L'extraction assistée par ultrasons est une méthode très couramment utilisée dans l'extraction des substances actives végétales, y compris les composés phénoliques (Ya-Qin Ma *et al.*, 2009). Elle réunit la simplicité et la rapidité. Elle est recommandée dans le cas des échantillons solides vu l'effet des ultrasons sur la destruction des parois cellulaires ce qui facilite par conséquent, l'extraction des composés phénoliques (Carrera *et al.*, 2012 ; Svarc-Gajia *et al.*, 2013 ; Izadifar *et al.*, 2013 ; Centeno *et al.*, 2015 ; Tao *et al.*, 2014).

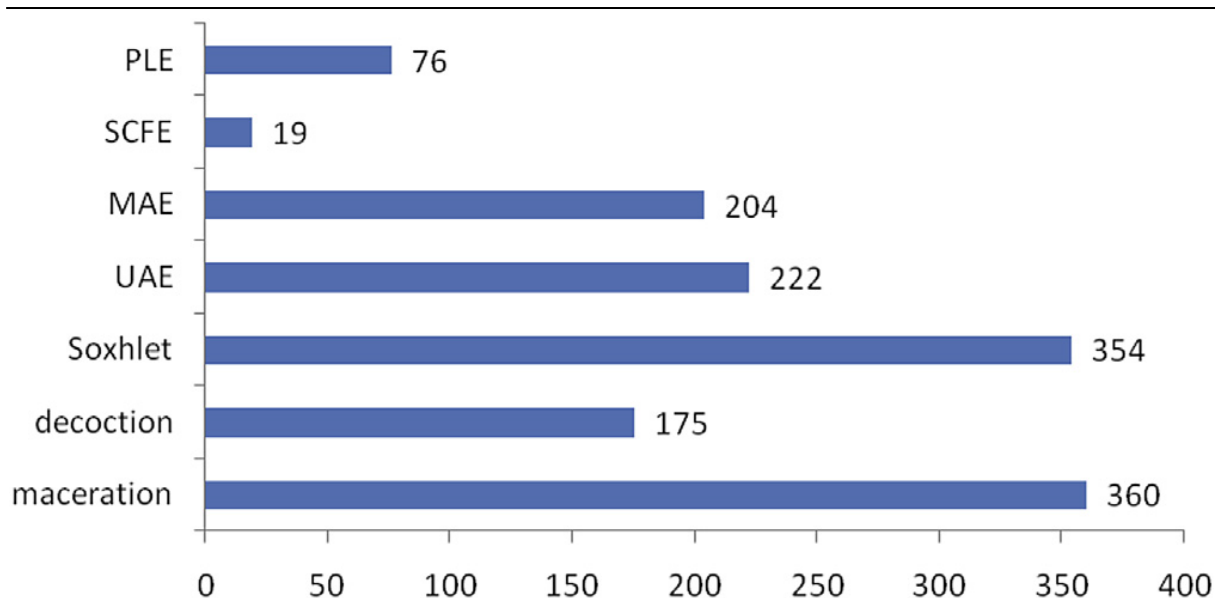
L'extraction des composés phénoliques par fluides supercritiques, a pris ces dernières années beaucoup d'essor. Le dioxyde de carbone est un composé caractérisé par une température d'ébullition faible de l'ordre de 31.1° C, il est connu pour être volatil, non inflammable, non polluant et non toxique. Grâce à ces propriétés, le dioxyde de carbone est le plus utilisé dans la technique d'extraction par fluides supercritiques. Il présente l'inconvénient d'être non polaire, ce qui rend impossible l'extraction des composés polaires tels que les composés phénoliques (Zulkafli *et al.*, 2014 ; Berna *et al.*, 2001). Dans le but d'améliorer leur extraction par le dioxyde de carbone, l'addition de solvants polaires aux systèmes d'extraction a été proposée (Zarena *et al.*, 2012 ; Zulfakli *et al.*, 2014 ; Veggi *et al.*, 2014).



L'extraction assistée par micro-ondes est une autre technique qui devient de plus en plus populaire. Le nombre de publications qui rapportent l'utilisation de cette méthode a connu une augmentation considérable. La quasi-totalité de ces travaux traitent de l'optimisation des paramètres expérimentaux. Les paramètres étudiés sont la température, le temps, la puissance, le volume et la concentration du solvant (Santana *et al.*, 2009). Comparativement aux techniques traditionnelles, elle réduit considérablement la consommation du solvant et augmente au même temps la rapidité et l'efficacité du processus (Svarc-Gajic *et al.*, 2013 ; Routray and Orsat 2014). C'est une technique qui combine le chauffage rapide au micro-onde avec les méthodes d'extraction par solvant. L'efficacité de cette technique dans l'extraction des phénols totaux, flavonoïdes totaux ainsi que les tanins a été mise en évidence (Dahmoun *et al.*, 2013).

Une étude statistique menée par la base de données Scopus sur la période qui s'étale de 2005 à 2015 a clairement montré un recours intensif à l'utilisation des méthodes conventionnelles (macération, Soxhlet, et décoction).

Un nombre important de publications de l'ordre de 899 traitent de ces méthodes et l'emporte sur l'utilisation des nouvelles méthodes avec un nombre de publications limité à 521 publications. Ce n'est qu'au cours des 5 dernières années que l'utilisation des nouvelles techniques d'extraction a pris de l'essor. Un intérêt qui s'explique par leurs caractères et avantages ; elles sont sélectives, rapides et non polluantes (Kala *et al.*, 2016) (**Fig. 8**).



**Figure 8 :** Répartition des publications de la base de données Scopus (2005-2015) en fonction des méthodes d'extraction des composés phénoliques. *PLE*: *pressurized liquid extraction*, *SCFE*: *Supercritical fluid extraction*, *MAE*: *Microwave assisted extraction*, *UAE*: *Ultrasound assisted extraction* (Kala *et al.*, 2016)

Compte tenu de l'immense variabilité des substances actives (flavonoïdes, acides phénoliques, glycosides, etc.), le nombre indéterminé des espèces végétales ainsi que la nature de l'échantillon et son état physique, le développement d'une méthode universelle pour l'extraction des composés phénoliques s'avère impossible. Indépendamment de la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction est indispensable pour des résultats précis et fiables (Garcia-Perez 2008 ; Tsao *et al.*, 2010).

L'efficacité d'une méthode d'extraction est régie par plusieurs facteurs entre autres tels que le solvant utilisé, le temps nécessaire pour séparer les différents composés bioactifs ainsi que la structure de l'échantillon et la nature des composés à extraire (Tao *et al.*, 2014).

A cela s'ajoutent les pertes en composés phénoliques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction, d'où la nécessité de manipuler soigneusement afin d'éviter toutes dégradations thermiques et les modifications chimiques et/ou biochimiques pouvant affecter les échantillons naturels (Garcia-Perze 2008 ; Antolovich *et al.*, 2000).

Le solvant joue un rôle pivotant dans la plupart des méthodes d'extraction. Les solvants les plus utilisés sont des alcools. Le méthanol est le solvant le plus utilisé, suivi de l'éthanol, de l'acétone, du diéthyl éther et de l'éthyl acétate.

Il a été indiqué que les acides phénoliques (acides benzoïques et cinnamiques), dû à leur polarité élevée, ne peuvent être extraits complètement par des solvants organiques purs. Pour cela, des combinaisons alcool-eau ou acétone-eau sont vivement recommandées.

En revanche, les solvants moins polaires tels que le dichlorométhane, le chloroforme, l'hexane et le benzène sont appropriés à l'extraction des composés non polaires. D'autres facteurs comme le pH, la température, le rapport solvant/solide, ont aussi une influence qui ne peut être négligée sur le procédé d'extraction (Stalikas, 2007).

### **1.1.6.1.1. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques**

#### **1.1.6.1.1.1. Les plans d'expériences**

##### **1.1.6.1.1.1.1 Définition**

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt et des variables. Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type  $Y=f(x)$  (Goupy, 2006).

Ils consistent à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs (qui sont les variables, discrètes ou continues) à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse en permettant de modéliser facilement les résultats (Faucher, 2006).

Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité. Le succès de la démarche originale des plans d'expériences réside dans la possibilité d'interprétation de résultats expérimentaux avec un effort minimal sur le plan expérimental : la minimisation du nombre nécessaire d'expériences permet un gain en temps et en coût financier (Triboulet, 2008).

##### **1.1.6.1.1.1.2. Vocabulaire de base des plans d'expériences**

Le plan d'expérience se caractérise par une terminologie qu'il faut définir

###### ***i. Réponse et Facteurs***

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette

grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme «variable» on utilisera le mot facteur (Goupy, 2006).

Les facteurs caractérisant les conditions expérimentales peuvent être très variés. Il existe selon Etsinda (2008) :

- Des facteurs quantitatifs continus tels qu'une température, un débit, une pression, une concentration, une vitesse.
- Des facteurs quantitatifs discontinus comme le nombre de vis d'un montage.
- Des facteurs qualitatifs comme la nature d'un procédé (discontinu ou continu), le type de climat etc.

Les facteurs peuvent également être classés selon d'autres critères dont:

- Des facteurs contrôlés, c'est ce type de facteurs que l'expérimentateur fait varier lors du processus expérimental;
- Des facteurs mesurables, auxquels il n'est pas possible d'imposer un état donné, mais dont le niveau peut être connu précisément (exemple : température extérieure).
- Des facteurs constants, qui sont maintenus dans un état fixe tout au long des différentes expériences;
- Des facteurs bruits, dont l'effet ne s'exerce que sur la dispersion ou la qualité des résultats (Exemple : vieillissement du matériel, fatigue de l'opérateur)

## ***ii. Niveau d'un facteur***

C'est la valeur que prend le facteur au cours des essais, il importe d'attribuer à chaque facteur au moins deux niveaux : un niveau supérieur et un niveau inférieur (+1, -1). Les niveaux extrêmes de chaque facteur délimitent le domaine de l'étude.

## ***iii. Espace expérimentale (Domaine du facteur ou domaine de variation du facteur)***

C'est l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut. Le niveau le plus bas est noté -1, et le niveau le plus haut est noté +1 (Goupy, 2006).

*iv. Domaine d'étude*

Il correspond au regroupement des domaines des facteurs, Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude (Goupy, 2006).

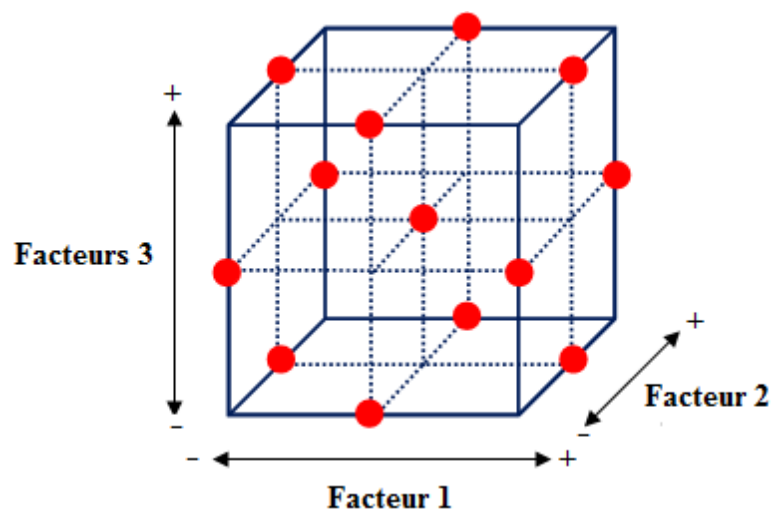
*v. Surface de réponse*

À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse.

*vi. Plan de Box-Behnken*

Les points expérimentaux sont placés au milieu des arêtes du cube comme l'indique la **figure 9**. Cette disposition a pour conséquence de placer tous les points expérimentaux à égale distance du centre du domaine d'étude, donc sur une sphère.

Les plans de Box-Behnken pour 3 facteurs contiennent 12 essais, plus 3 essais au centre du domaine d'étude (qui serviront au calcul de l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement) ce qui fait 15 essais au total. Tandis qu'un plan Box-Behnken pour 4 facteurs contient 24 essais, plus 3 essais au centre du domaine d'étude, et ça donne 27 essais au total.



**Figure 9** : Plan de Box-Behnken pour 4 facteurs

**vii. Méthodologie des surfaces de réponse**

La méthodologie des surfaces de réponses constitue le deuxième volet de la méthode des plans d'expériences. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative, les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative (Vivier, 2002). Cette méthode est économique s'il faut moins d'essais pour construire la surface de réponse que pour détecter directement l'optimum.

La méthodologie des surfaces de réponse a pour but d'explorer les relations entre une variable réponse  $y$  et plusieurs variables dépendantes par ajustement d'une fonction Mathématique, dans l'objectif notamment d'optimiser la réponse  $y$ . Elle s'est révélée extrêmement utile dans de nombreux domaines. Le principe de la méthode est de trouver les conditions d'expérimentation optimales en réalisant un nombre restreint d'expériences (Sacks et *al.*, 1989).

**viii. Réalisation de l'essai de validation**

Il est clair que la configuration optimale proposée est le résultat d'un travail théorique qui s'appuie sur l'hypothèse d'addition des effets moyens. Il faut impérativement la valider, avec le même nombre de mesures qui a été utilisé pour chaque essai durant le plan. Si l'essai de validation vient confirmer le résultat théorique attendu alors le plan d'expériences est un succès (Alexis, 2015).

**ix. Intérêts des plans d'expériences**

Les plans d'expériences sont utilisés dans les études industrielles en recherche développement. Ils interviennent dans de nombreux domaines industriels. On peut notamment citer : industries chimiques, pétrochimiques et pharmaceutiques, industries mécaniques et automobiles, industries métallurgiques Leur utilisation vise aux buts suivants :

- détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé
- optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un d'appareil de mesure
- prédiction par modélisation du comportement d'un procédé.

### **1.1.6.2. Analyse et quantification des composés phénoliques**

En raison de l'hétérogénéité des composés phénoliques et d'éventuelles interactions avec d'autres substances dans le matériel végétal ; leur identification, isolement et quantification nécessitent de mettre en jeu des techniques précises et fiables. Plusieurs méthodes ont été employées dans leur séparation, identification et quantification.

#### **1.1.6.2.1. Les méthodes spectrométriques**

La spectrophotométrie est l'une des méthodes les plus simples utilisées dans la quantification des composés phénoliques. Les plus communément appliquées sont : la méthode de Folin Denis, la méthode de Folin-Ciocalteu, la méthode de titrage par permanganates et la méthode d'absorbance dans l'ultraviolet (Singleton *et al.*, 1999 ; Naczak and Shahidi 2006 ; Dai and Mumper 2012). La méthode de Folin Denis et de Folin Ciocalteu ont été longtemps utilisées par les chercheurs dans la détermination de la teneur en composés phénoliques totaux des végétaux. Elles ont en commun un principe basé sur une réaction d'oxydoréduction non spécifique aux composés phénoliques (Khodami *et al.*, 2013).

La méthode la plus répandue est celle de Folin-Ciocalteu, choisie pour sa simplicité et la disponibilité du réactif (Magalhaes *et al.*, 2010). Elle mesure la capacité de réduction de l'acide phosphomolybdique / phosphotungstique par des composés phénoliques et non phénoliques tels que les acides organiques (ascorbique, citrique et tartrique), les sucres (fructose, glucose, saccharose), les sulfates de fer et les sulfites de sodium. Le produit résultant de cette réaction présente une coloration bleue avec un maximum d'absorption à 760 nm (Prior *et al.*, 2005 ; Rover and Brown 2013 ; Khodami *et al.*, 2013).

Une autre méthode rapide basée sur la lecture directe des absorbances des extraits en particulier les cycles aromatiques à 280 nm a été employée (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000 ; Spigno *et al.*, 2007). L'absorption des composés phénoliques à 280 nm est affectée par la nature du solvant, le pH de la solution ainsi que les interférences qui peuvent avoir lieu par des substances ayant une forte absorption dans l'UV (280 nm) telles que les protéines, les acides aminés et les acides nucléiques (Naczak and Shahidi 2006).

#### **1.1.6.2.2. Les techniques chromatographiques sur colonne**

La chromatographie sur colonne est une technique analytique basée sur la différence de miscibilité d'un soluté entre deux phases. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange

homogène liquide ou gazeux (Magniez, 2009). La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...). A leur arrivée en bout de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange (Denat, 2010).

Au cours de la dernière décennie ; les techniques chromatographiques ont connu un regain d'intérêt et elles ont été largement utilisées par les chercheurs dans la séparation des substances naturelles. L'efficacité de ces techniques est étroitement liée à l'affinité des substances considérée avec la phase stationnaire (Qilong *et al.*, 2013).

L'avantage de l'analyse par chromatographie est l'identification et la quantification de chacun des composés phénoliques présents dans le produit, tandis que d'autres techniques d'analyses comme celle de Folin-Ciocalteu déterminent la quantité des polyphénols totaux sans donner aucune information sur leur nature (Elboughdiri *et al.*, 2007).

#### **I.1.6.2.2.1. La chromatographie en phase gazeuse**

Elle est très répandue dans la séparation et la quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes. C'est une technique qui nécessite -avant son application- la transformation des composés phénoliques en dérivés volatiles par le procédé de méthylation (Dai and Mumper 2012).

#### **I.1.6.2.2.2. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

Elle représente la technique la plus adoptée, elle se trouve combinée soit à un détecteur électronique ou à la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-VIS) ou bien à une barrette de diode ou à un détecteur fluorescent, couplée ou non à la spectrométrie de masse (Kala *et al.*, 2016 ; Miniati 2007).

Fisher et Wheaton ont été les premiers à avoir utilisé cette technique dans la détermination des flavonoïdes en 1976 (Garcia-Perez, 2008). L'analyse par CLHP impose la détermination des conditions opératoires qui seront employées pendant l'analyse, à savoir les types de colonnes à utiliser, les solvants, le temps d'analyse, le détecteur etc. (Garcia-Perez, 2008).

Le type de la colonne est un facteur déterminant de l'efficacité de la séparation. Un choix adéquat de la colonne aboutit à une séparation précise et fiable, inversement à un choix



inapproprié qui est à l'origine d'une mauvaise séparation et par conséquent des résultats complexes et difficiles à interpréter (Bhardwaj, 2015).

Les colonnes les plus utilisés pour l'analyse par CLHP sont des colonnes de types C18 phase inverse, accompagnée d'un détecteur UV. L'introduction de la colonne phase inverse a considérablement amélioré la séparation des différentes classes des composés phénoliques par CLHP (Dai and Mumper 2012).

#### **I.1.6.2.2.3. Chromatographie en phase liquide ultra haute performance (UPLC)**

L'UPLC est la méthode de dosage et d'identification la plus récente. Elle est employée dans l'étude des composés phénoliques. C'est une technique dite HPLC modifiée. Elle permet d'augmenter la vitesse de résolution ainsi que l'efficacité de la séparation. Cet avantage est rendu possible grâce à l'utilisation de colonnes dont la taille des particules est compris entre 3 µm et 5 µm, une phase stationnaire avec des particules extrêmement fines avec une la taille ne dépassant pas 2 µm et des pressions élevées supérieures à 100 MPa comparativement à l'HPLC.

Elle est largement employée dans l'analyse des produits naturels et des plantes médicinales et est très répandue dans l'analyse des composés phénoliques (Kalili and De Villiers 2010). Son inconvénient majeur réside dans les pressions élevées qui réduisent la durée de vie des colonnes ainsi que de la phase stationnaire non régénérable qui constituent une limite d'utilisation de l'UPLC (Samatha *et al.*, 2015).

#### **I.1.6.2.2.4. La spectrométrie de masse**

Depuis la description de l'ionisation par électro-jet en 1968, la spectrométrie de masse est devenue un outil incontournable dans le domaine de l'analyse chimique et biologique (Moussa *et al.*, 2011). C'est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et d'accéder à la fois, à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales. Pour cette raison la technique est qualifiée de « balance moléculaire » (Becker, 2014).

Généralement, une expérience en spectrométrie de masse passe par trois étapes distinctes. La première consiste à générer des ions positifs en phase gazeuse par volatilisation des composés organiques introduits dans le dispositif. La suivante est associée à la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) au sein de l'analyseur. Enfin, la

dernière est assurée par le détecteur sensible aux charges électriques transportées. Il recueille les ions et convertit leur signal en un signal électrique traduit par un spectre de masse.

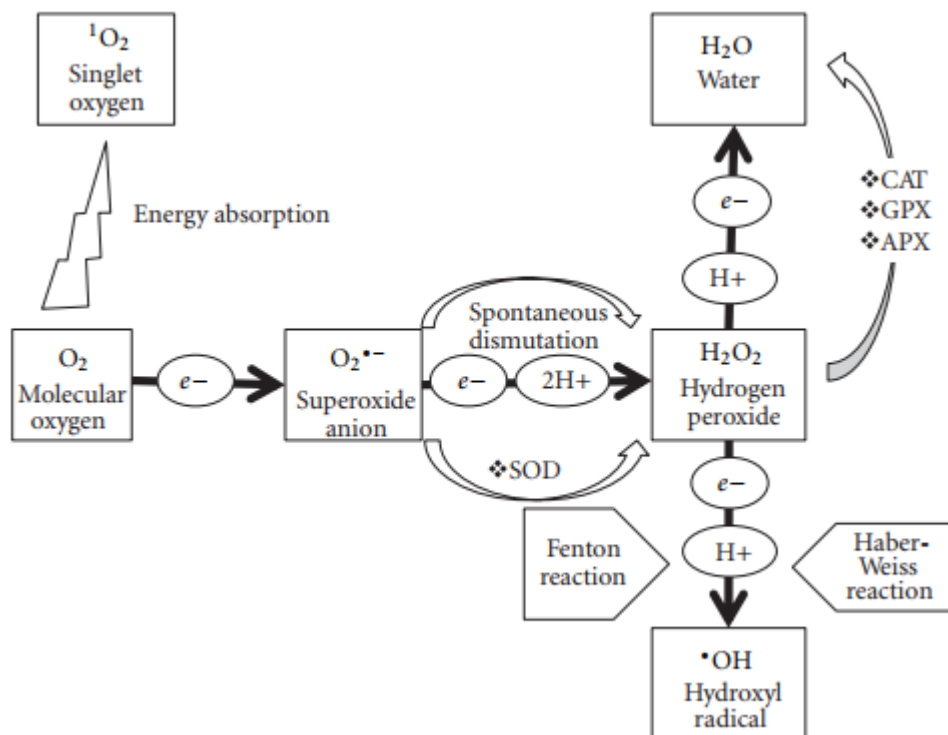
## 2. Stress oxydatif et antioxydants

### 2.1. Définition

A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène (O<sub>2</sub>) est indispensable à la vie de tous les animaux, plantes et bactéries. Il permet de produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celles existantes dans les mitochondries des cellules eucaryotes (Gardès-Albert, 2003). C'est un radical libre peu réactif présent le plus souvent sous forme de dioxygène. La plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible d'induire dans un organisme sont extrêmement lentes ; il est donc peu toxique par lui-même.

Physiologiquement et dans certaines circonstances, 0.4 à 4% des électrons s'échappent de la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie aboutissant à la réduction partielle de l'oxygène dissous dans le cytoplasme (Haleng *et al.*, 2007 ; Cardin 2008). Cette réduction fait apparaître des intermédiaires biochimiques hautement réactifs susceptibles d'endommager l'organisme appelés espèces réactives oxygénées (ERO) (Ramel, 2008).

Les espèces réactives oxygénées (ERO) également désignées dans la littérature de dérivés réactifs de l'oxygène ou espèces oxygénées actives peuvent être définies comme des molécules qui contiennent de l'oxygène et sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Elles sont très nombreuses de forme radicalaire ou non, dotées d'une grande instabilité et d'une forte réactivité. Il s'agit de l'ion super-oxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'hypochlorite et le peroxyde d'azote qui sont libérés lors des réactions biochimiques (Ichai *et al.*, 2011) (**Fig. 10**).



**Figure 10** : Représentation schématique de la génération des espèces réactives d'oxygène au niveau des plantes. (Sharma *et al.*, 2012).

## 2.2. Espèces réactives d'oxygène (ERO) : Le paradoxe

Les espèces réactives d'oxygène (ERO) sont constamment produites dans divers compartiments cellulaires, comme conséquence inévitable du métabolisme ainsi que des facteurs environnementaux (Appel and Hist 2004 ; Berben *et al.*, 2012).

Aux doses faibles et contrôlées, les ERO sont nécessaires au bon déroulement des fonctions physiologiques dans la cellule. En effet, elles participent à la croissance cellulaire, transduction des signaux, l'expression des gènes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et à beaucoup d'autres fonctions physiologiques (Favier 2003; Pastre 2005 ; Kunwar and Priyadarsini 2011 ; Beguel 2012). Citons aussi le processus de fécondation au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule (Haleng *et al.*, 2007).

Formées en trop grandes quantités les ERO deviennent pathologiques et toxiques pour l'organisme. Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs irréversibles au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires.

Elles sont impliquées dans de multiples lésions cellulaires en provoquant la peroxydation des lipides membranaires, la dénaturation des protéines ainsi que l'induction de nombreuses lésions au niveau de l'ADN (Pincemail *et al.*, 2001).

C'est pourquoi, elles seraient l'un des facteurs potentialisant la genèse et le développement de maladies telles que le cancer, les maladies neuro-dégénératives et la pathogenèse des infections virales. Elles peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme. Elles peuvent léser des neurones et entraîner leur mort. L'accumulation avec l'âge de ces molécules et donc des dégâts qu'ils génèrent, seraient un des facteurs expliquant le vieillissement cellulaire (Pastre, 2005).

Afin de maintenir la concentration des ERO à un niveau adéquat et d'éviter leur accumulation au niveau cellulaire, l'organisme est doté de systèmes de défense efficaces faisant intervenir des espèces antioxydantes de différentes natures. Elles permettent la neutralisation de l'excès des ERO (Boguszewska and Zagdanska 2012). Ces protections sont assurées à la fois par des composés naturels endogènes (glutathion) ou apportés par l'alimentation (vitamine C, vitamine E, composés phénoliques), et par des enzymes spécifiques (catalase, ascorbate peroxydase, superoxyde dismutase) se comportant comme des piègeurs de radicaux ou destructeurs de ces ERO (Carreras, 2004). Dans ces conditions physiologiques normales, la balance Antioxydant / ERO est en équilibre.

Il arrive que les systèmes physiologiques de défense soient dépassés, soit en raison d'un déficit en antioxydants, soit par une surproduction radicalaire, soit par les deux mécanismes combinés, une rupture de l'équilibre s'installe alors.

Le décalage de l'équilibre en faveur des oxydants (ERO) (le contenu cellulaire en ERO dépasse les capacités de défense antioxydante de l'organisme) est nommé stress oxydatif (Yoshikawa and Naito 2002 ; Favier 2003 ; Defraign and Pincemail 2007).

Le phénomène du stress oxydatif se traduit par l'accumulation des produits d'oxydation des biomolécules au niveau plasmatique. La détermination de ces produits ainsi que la mesure des espèces constituant les deux côtés de la balance permettent l'évaluation du stress oxydatif (Bonnefont-Rousselot 2007 ; Beguel 2012).

## **2.3. Origine du stress oxydatif**

### **2.3.1. Chez l'homme**

De multiples facteurs peuvent être à l'origine d'un décalage de la balance antioxydants/oxydants, ils sont soit biotiques ou abiotiques, endogènes tels que l'effort physique ou psychologique ou exogène tel que la pollution, le tabagisme, consommation de l'alcool, exposition au soleil ou aux radiations sans protection suffisante, déficience nutritionnelle ainsi que les attaques par des pathogènes.

### **2.3.2. Chez les végétaux**

Différents facteurs sont à l'origine du stress oxydatif chez les végétaux à savoir la sécheresse, la salinité, la déficience en nutriments, les changements de température, les rayons UV, ainsi que l'effet des herbicides (Mollar *et al.*, 1997 ; Gill and Tuteja 2010 ; Defraigne and Pincemail 2007).

## **2.4. Définition d'un radical libre**

C'est une entité chimique (atome ou molécule) qui possède un ou plusieurs électrons libres sur sa couche périphérique. Les radicaux libres peuvent provenir de l'oxygène (ERO) ou d'autres molécules telles que l'azote, dans ce cas ils prennent le nom d'espèces réactives d'azote (ERN). Ils sont caractérisés par une structure électronique déséquilibrée. Ils deviennent alors très réactifs et très instables. Ainsi, ces espèces chimiques deviennent très réactives vis-à-vis des autres molécules insaturées. A la recherche de leur équilibre chimique, les radicaux libres interagissent spontanément avec les molécules à proximité et s'approprient leurs électrons. C'est ainsi qu'il se forme un nouveau radical libre, provoquant une réaction en chaîne. Les radicaux libres se comportent, selon le cas, comme des oxydants ou comme des réducteurs (Charles *et al.*, 1998 ; Frenot *et al.*, 2001 ; Yoshikawa and Naito 2002 ; Defeng *et al.*, 2003).

Ils se subdivisent en deux grands groupes distincts : les radicaux primaires qui dérivent directement de l'oxygène ou de l'azote tels que l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, et les radicaux secondaires qui sont le résultat des réactions des radicaux primaires sur des composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

## 2.5. Antioxydants

Le terme antioxydant est souvent réservé à des protecteurs chimiques qui ont la capacité de réagir avec les radicaux libres. Ils sont donc de bons capteurs d'oxy-radicaux. Ils empêchent la transformation de l'oxygène en radicaux agressifs (Wincker 2005 ; Gardès-Albert *et al.*, 2005). Il se définit comme étant toute substance présente à faible concentration par rapport à un substrat oxydable et retardant ou empêchant significativement l'oxydation de ce substrat (Favier, 2003).

### 2.5.1. Mécanisme d'action des antioxydants

L'action des antioxydants contre l'oxydation peut se faire de deux manières distinctes : soit en protégeant les cibles biologiques des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la propagation de la réaction oxydative (Laguerre *et al.*, 2007).

Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs, secondaires ou encore retardeurs assurent l'inhibition de la production des radicaux libres responsables de l'initiation de l'oxydation. Ils interviennent comme des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des protecteurs contre l'UV comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation comme l'acide citrique ou en fin des séquestrant d'oxygène comme l'acide ascorbique (Rolland, 2004).

Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne, primaires ou radicalaires, s'opposent à la propagation de l'oxydation radicalaire en chaîne par interception des radicaux propagateurs (Laguerre *et al.*, 2007).

### 2.5.2. Classification des antioxydants

Plusieurs classifications sont attribuées aux systèmes de défense qui permettent de réguler la production des ERO ou de les neutraliser. Ils peuvent être endogènes, synthétisés par le corps ou exogènes, obtenues par l'alimentation sous forme de fruits et légumes. Ils peuvent se répartir selon leur nature chimique en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, naturels ou synthétiques.

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogène), l'acide urique, la mélanine et la mélatonine. Les antioxydants non enzymatiques exogènes sont la vitamine E, C, caroténoïde etc...) (Prior, 2003).

En fonction de leur rôle, les systèmes de défense se subdivisent en trois catégories : les antioxydants qui s'opposent à la formation des radicaux libres (Les enzymes catalase et GPX), les antioxydants qui permettent la neutralisation des ERO après leur formation (la vitamine E et C, la SOD, le Glutathion cellulaire), et enfin les antioxydants qui réparent les dégâts causés par les ERO (Elimination des lipides et des protéines dénaturées, Réparation des acides nucléiques oxydés par de systèmes enzymatiques particuliers,...) (Collard, 2014). .

La vitamine E par exemple, a pour principal rôle de réagir avec les radicaux peroxydes pour former un radical tocophéryle. Son action s'exerce en synergie avec la vitamine C ; cette dernière participe à la régénération de la vitamine E, suite à la neutralisation des radicaux libres (Masson 2007 ; (Corynne 2013).

La vitamine C quant à elle, est capable de détoxifier une espèce radicalaire par piégeage de l'électron surnuméraire et stabilisation de cet électron par résonance, rendant la forme ascorbyl moins réactive que l'espèce radicalaire initiale (Rock *et* Fardet 2014).

Les substance enzymatiques endogène telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase sont dotées du pouvoir d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives (Pokorny 2003 ; Gueye 2007). Ces enzymes antioxydantes considérées comme première ligne de défense, n'atteignent leurs formes actives qu'en présence de métaux sur le site actif. Ces métaux, comme le cuivre, le zinc ou le manganèse pour les superoxydes dismutases, le sélénium pour la glutathion peroxydase et le fer pour la catalase, jouent ainsi un rôle indirect dans la protection de l'organisme contre le stress oxydant.

L'intérêt des chercheurs s'oriente d'avantage vers Les antioxydants exogènes que les antioxydants endogènes en raison de leur disponibilité à partir de l'alimentation et de la prise de suppléments. La vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes, et les caroténoïdes sont parmi les antioxydants alimentaires les plus étudiés (Scalbert 2005 ; Eversley 2012).

Un apport élevé ou adéquat en antioxydants alimentaires est associé à des conséquences biochimiques comme une diminution de dommages oxydants sur l'ADN, les glucides et la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Rock and Fardet 2014). On a également démontré que des fortes doses d'antioxydants pouvaient avoir un effet pro-oxydant et entraîner des actions délétères (Herberg, 2003).



### 2.5.3. Composés phénoliques des végétaux en tant qu'antioxydants

Les polyphénols constituent en fait une importante famille d'antioxydants dans les différents organes des plantes : les fruits et les légumes puisqu'elle comprend plus de six mille molécules (Pincemail *et al.*, 2007). Les principaux organes végétaux riches en composés phénoliques sont la muscade, le clou de girofle, le gingembre et la vanille ; l'activité antioxydante est encore plus importante avec les composés du thym et de l'origan et surtout de la sauge et du romarin (Truong, 2004).

L'intérêt pour les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques a pris un essor considérable après plusieurs études épidémiologiques (Roginsky and Lissi 2003 ; Descheemaeker 2003 ; Pacaut 2005). Des études récentes ont montré que plus le contenu en polyphénols dans les fruits et légumes était important, plus grande était la capacité antioxydante totale de ces aliments (Pincemail *et al.*, 2007).

Ils sont considérés comme d'exceptionnels donateurs d'hydrogène et d'électrons (Maqsood *et al.*, 2014). Pour lutter contre l'oxydation, les composés phénoliques agissent par différents mécanismes incluant l'élimination des radicaux libres, la régénération des antioxydants (Vit E) ainsi que leur action comme chélateurs de pro-oxydants métaux (Lima *et al.*, 2014 ; Ozcan *et al.*, 2014).

Parmi les différentes classes des composés phénoliques, la plus importante représentative est celle des flavonoïdes. C'est la classe la plus étudiée pour ses propriétés antioxydantes et biologiques. Les flavonoïdes sont dotés d'une forte capacité de piégeage d'un grand nombre d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'espèces réactives d'azote (ERN) (Maqsood *et al.*, 2014). Les anthocyanines, les catéchines, les flavones, les flavonoles et autres agissent comme chélateurs de métaux, piègeurs d'anions super-oxydes et donateurs d'hydrogène (Cillard *et al.*, 2006).

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes semblent être bien expliquées par leur effet protecteur contre la peroxydation des lipides, en donnant immédiatement des atomes d'hydrogènes aux radicaux peroxydes, ils inhibent ainsi l'oxydation des lipides en intervenant soit sur l'étape de propagation de la chaîne oxydative, soit sur l'étape d'initiation ( Ohshima 2003 ; Fraga *et al.*,2010).

Au même titre que les autres antioxydants naturels, les composés phénoliques peuvent représenter de bons palliatifs aux antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

#### 2.5.4. Les antioxydants de synthèse

□ **La vitamine E synthétique** : Est un mélange de 8 molécules dont une seule est reconnue par l'organisme. Cette forme synthétique est en moyenne deux fois moins active que la forme naturelle (Causse, 2005).

□ **Les composés phénoliques de synthèse** : Le BHA (butylhydroxyanisole : E320) et le BHT (butylhydroxytoluène : E321) sont des antioxydants très utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour prévenir la peroxydation des corps gras d'origine animale ou végétale (Macheix *et al.*, 2005). L'utilisation du BHA et du BHT est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés.

On trouve aussi d'autres composés tels que l'anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO<sub>2</sub>) et ses combinaisons minérales, le gallate de propyle (E310), le gallate d'octyle (E311) et le gallate de dodécyle (E312) (Portes, 2008).

#### 2.5.5. Tests d'évaluation de l'activité antioxydante

Pour mesurer l'activité antioxydante proprement dite, telle que celle d'un extrait naturel, il existe une multitude de tests incluant les moins fréquemment utilisés et les plus utilisés (Portes, 2008).

##### 2.5.5.1. Les tests les moins couramment utilisés

- **Le test Rancimat** : C'est un test accéléré pour mesurer la résistance à la dégradation oxydative (Werner, 2010) cet essai examine la capacité d'empêcher l'oxydation dans des conditions accélérées (Preedy, 2008).

- **Dosage des TBARS** : L'atteinte lipidique terminale est quantifiée habituellement par les isoprostanes ou les TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) dont fait partie le malondialdéhyde (MDA) (Ichai *et al.*, 2011).

##### 2.5.5.2. Les tests les plus utilisés

- **Test de réduction du radical-cation ABTS<sup>+</sup> ou TEAC**

(Trolox equivalent antioxidant capacity) : c'est une méthode basée sur l'utilisation de l'ABTS. Il est oxydable sous l'effet des radicaux peroxyyles en radical-cation stable (ABTS<sup>+</sup>) absorbant la lumière à 734 nm.

Le composé à tester est ajouté au radical pré-formé et, 1 minute après, l'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>+</sup> est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) ou le Trolox (Waston 2008, porte 2008).

- **Tests de capture des radicaux peroxyyles : TRAP et ORAC**

L'AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure, est le générateur hydrophile de radicaux libres employé dans les deux tests : TRAP et ORAC

- **Le test TRAP (total radical trapping antioxidant potential)**

C'est un test qui fait appel au spectromètre luminescent (luminescence spectromètre), pour mesurer l'intensité du R-phycoerythrin (indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé) et suivre son évolution au cours des réactions d'oxydation.

La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox (qui est l'équivalent hydrosoluble de la vitamine E par gramme d'échantillon) donnant une valeur TRAP (Moharram and Youcef 2014).

- **Le test ORAC (Oxygen radical antioxidant capacity)**

Le test ORAC est une méthode fondée sur la capacité de l'échantillon testé à neutraliser un radical libre introduit dans la solution.

Le radical peroxyyle réagit avec une sonde fluorescente, formant de ce fait un produit non fluorescent qui peut être dosé pour suivre ses variations en fonction du temps (Knasmuller *et al.*, 2009 ; Fardet 2017). Il est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et des extraits de fruits et légumes (Prior *et al.*, 2003).

- **Le test PSC Peroxyl Radical Scavenging Capacity**

Il est similaire au test ORAC. Il est basé sur la détermination du degré d'oxydation du dichloro fluorescin, suite au piégeage du radical peroxyyle issu de la dégradation thermique de

2,2'-azobis (2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) par l'antioxydant testé (Moharram and Youcef 2014).

- ***Le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)***

Le test FRAP est prétendu être une mesure directe de toute activité antioxydante des fluides biologiques. Le système d'essai est basé sur la réduction de complexe ferrique de la triazine de tripiridyl ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) à la triazine ferreuse de tripiridyl ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ) par des antioxydants. L'absorbance du ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) est lue à 593 nm toutes les 15 s durant une période n'excédant pas 10 minutes (Culter *et al.*, 2003).

### **Mesure des pouvoirs chélateur et réducteur**

- ***Le test HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity)***

C'est une technique d'évaluation du pouvoir chélateur des métaux par les antioxydants en présence d'un générateur de radicaux. Elle permet de déterminer la capacité de l'antioxydant à prévenir la formation de radicaux hydroxyles.

- ***Le test DPPH : (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)***

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\text{DPPH}^\circ$ ) est stable, coloré et centré sur l'azote, avec un maximum d'absorption qui se situe vers 515 nm (Blois, 1958). La réduction du  $\text{DPPH}^\circ$  (caractérisé par une couleur pourpre) par un donneur d'atome H (AH) conduit à la formation du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore ( $\text{DPPH-H}$ ) (Pisoschi *and* Negulescu 2011).

Les solvant les plus utilisés dans la détermination de la capacité de piégeage de radicaux libres DPPH sont le méthanol et l'éthanol (Marinova and Batchvarov 2011). La méthode de DPPH est largement répandue dans l'évaluation de la capacité antioxydante des composés naturels avec plus de dix-sept mille articles publiés (Preedy 2008 ; Akar *et al.*, 2017). C'est un test relativement moins cher très utilisé pour sa simplicité et son efficacité.

Cependant, il est resté le plus lent des procédés et dépendant du spectromètre (Niaourakis *et al.*, 2006). Un travail récemment accompli par Akar et son équipe (2017) ont mis en place une nouvelle technique qui fait appel à des plaques de silices et un logiciel d'analyse de couleur. C'est une méthode qui semble être simple rapide moins coûteuse et réalisable sans avoir recours au spectrophotomètre (Akar *et al.*, 2017).

### 3. Monographie des espèces étudiées

Les quatre espèces étudiées sont des espèces cultivées largement consommées par les algériens.

#### 3.1. La coriandre (*Coriandrum sativum* L.)

L'utilisation d'épices et de condiment est indispensable dans la cuisine méditerranéenne. A l'heure actuelle, on assiste à un engouement du grand public pour des produits végétaux et épices d'origine naturelle expliqué par leurs effets bénéfiques sur la santé (Bhebhe *et al.*, 2015).

La coriandre, du latin *Coriandrum sativum* L., appelée parfois persil arabe, persil chinois ou encore cilantro, est originaire des pays Méditerranéens, et du Moyen Orient. Elle était largement utilisée dans la médecine traditionnelle (Zekovic *et al.*, 2016; Sriti *et al.*, 2012 ; Muray and Pizzorno 2010). Son premier usage remonte à 7000 ans avant notre ère. Les Indiens et tour à tour les Égyptiens, les Grecs et les Romains l'ont adoptée.

Les Égyptiens la cultivaient il y a déjà 3 500 ans et les Grecs 2 100 ans plus tard, non seulement pour ces propriétés aromatisantes mais aussi pour servir de conservateur naturel des viandes. Les Romains la firent connaître dans le nord de l'Europe.

Elle fut introduite au Canada et aux États-Unis par les premiers colons européens et au Mexique par les Espagnols (Muray and Pizzorno 2010 ; André Pedneault 2011).

##### 3.1.1. Taxonomie

La famille des Apiacées (anciennement nommées «Ombellifères») regroupe les plantes qui ont une inflorescence en forme d'ombelle. Cette famille compte plus de 3000 espèces réparties en 420 genres. Principalement herbacées, beaucoup sont huileuses ou aromatiques, quelques-unes sont toxiques.

Le genre *Coriandrum*, ne comprend que deux espèces : l'espèce cultivée (*Coriandrum sativum* L.) et l'espèce sauvage (*Coriandrum tordylium* L.) qui est très similaire à l'espèce cultivée. Le genre le plus proche est celui de Bifora (Diederichsen 1996 ; Sharma and Sharma 2004). La systématique de notre espèce est la suivante :

**Règne :** Plantae (végétal)

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous classe :** Rosidae

**Ordre :** Apiales

**Famille :** Apiaceae (ombellifères)

**Genre :** *Coriandrum*

**Espèce :** *Coriandrum sativum* L.

### 3.1.2. Les noms vernaculaires

**Arabe :** Kuzbara

**Kabyle :** Kousbar

**Français :** Coriandre, persil arabe

**Anglais :** coriander, collender, chienesse parsley

**Espagnol :** Coriandro, cilantro, cilandro, culantro

### 3.1.3. Description botanique

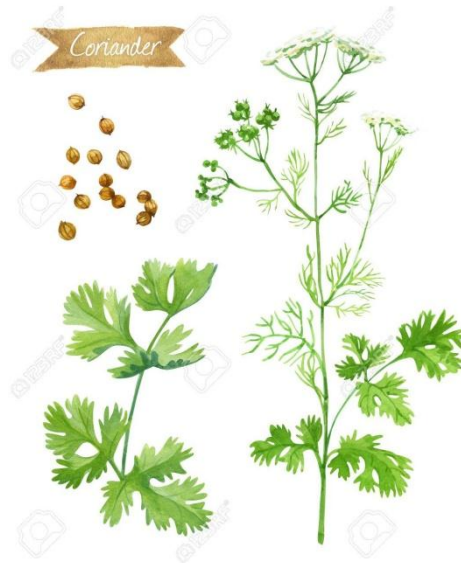
La coriandre (**Fig. 11**) préfère les températures fraîches. Très photosensible, l'augmentation de la durée de la lumière diurne active sa floraison (Pednault, 2011). Elle se présente sous forme de plante glabre, élancée et ramifiée, mesurant généralement en floraison 20 cm mais pouvant atteindre 1,4 m (Diederichsen, 1996).

C'est une plante aromatique annuelle dont toutes les parties sont comestibles. Les feuilles sont généralement utilisées fraîches en accompagnement ou comme condiment. Les fruits séchés, souvent confondus avec des graines, sont utilisés comme épice. Moulus, ils sont un ingrédient de base de nombreuses préparations culinaires (Sriti *et al.*, 2012 ; Illés *et al.*, 2000; Buthelezi *et al.*, 2016). Elle porte des feuilles vertes luisantes et glabres ressemblant à celles du persil italien. Les feuilles sont de plus en plus découpées vers le haut plant. Ce dernier atteint généralement 30 à 45 cm de largeur. Les feuilles dégagent une odeur proche de celle de la sauge. Les vieilles feuilles basales possèdent un arôme plus intense que les jeunes feuilles (Pednault, 2011).

Les fleurs, de couleur blanche, blanc rosâtre ou pourpre, sont regroupées en capitules. Chaque fleur ne fournit qu'une seule graine (Pednault, 2011).

Les fruits sont globuleux de 2-4 mm de diamètre, parfois légèrement allongés. Les fruits frais sont verts et dégagent la même odeur que les feuilles. Ils deviennent beige, puis ocre-

brun clair au cours de leur maturation et développent une odeur plus aromatique. Ce sont des schizocarpes (diakènes) constitués de deux méricarpes hémisphériques accolés de ce qui reste du stylopede (parfois des styles) et ne se séparent qu'une fois très secs (Nimish *et al.*, 2011).



**Figure 11** : La coriandre (*Coriandrum sativum* L.) (@<sup>4</sup>).

#### 3.1.4. Répartition géographique

Dans le monde, la coriandre est largement cultivée dans de nombreux pays notamment au Maroc, Egypte, Roumanie, France, Espagne, Italie, Inde, Pakistan, Turquie, Mexique, Chine, Argentine et Etats-Unis (Sharma and Sharma 2004 ; Singh *et al.*, 2006 ; Nimish *et al.*, 2011).

#### 3.1.5. Composition chimique de la coriandre

Le screening phytochimique de *Coriandrum sativum* a mis en évidence la présence de nombreux composés. La coriandre contient des huiles essentielles, des tanins, des terpénoïdes, des sucres réducteurs, des alcaloïdes, des composés phénoliques, des flavonoïdes, des acides gras, stérols et enfin glycosides. C'est une herbe à haute valeur nutritive vu son contenu en protéines, lipides, glucides, fibres minéraux et vitamines (Al-Snafi, 2016).

La graine contient différentes quantités de protéines (1.3 %), lipides (19.6 %), glucides (24 %), fibres, minéraux (1.7 %) et vitamines. Sa contribution à subvenir au besoin du corps en nutriments reste non significative. Elle renferme 6 – 8 % d'eau, et 0.3 à 1.7 % d'huiles essentielles constituées majoritairement de Linalool (67.7%),  $\alpha$ - Pinene (10 %) (Diederichsen *et al.*, 1996).  $\gamma$ - terpène (9.0 %), Geranylacetate (4.0 %) et Camphor (3.0 %).

Les feuilles quant à elles, renferment 87 % d'eau, 3 % de protéines, 0.6 % de lipides, 6.5 % de glucides, 1.7 % de matière minérale (Sharma and Sharma 2004).

### 3.1.6. Les composés phénoliques de la coriandre

La coriandre est considérée comme une source riche en composés phénoliques. Une étude menée par (Barros *et al.*, 2012) a révélé la présence dans les extraits des feuilles de dérivés de quercétine comme principaux représentants de la classe des flavonoïdes et de la quercétine-3-O-rutinoside comme composés majoritaire. La présence d'autres composés a été bien mise en évidence, c'est le cas de l'apigénine et des anthocyanines.

Les fruits de la coriandre sont caractérisés par l'absence de certaines classes de composés phénoliques. Ils sont riches uniquement en acides phénoliques et dérivés. Le plus abondant d'entre eux est le caffeoylN-tryptophane- hexoside.

### 3.1.7. Propriétés et utilisation

Le domaine d'utilisation de la coriandre est dépendant de la partie considérée. Elle est considérée comme une importante épice, et représente l'une des premières épices utilisées comme aromatisant.

Ces huiles essentielles sont utilisées pour aromatiser les préparations culinaires et dissimuler le mauvais goût et odeur des médicaments (Sharma and Sharma 2004). Les fruits ainsi que les feuilles sont utilisés à la fois pour des fins culinaires ainsi que pour des fins médicinales.

Les feuilles ont été longtemps utilisées dans les plats traditionnels de l'Amérique Latine, l'Inde et la Chine (Murray and Pizzorno 2010).

Les fruits mûrs de la coriandre possèdent une saveur agréable dégagée par des constituants particuliers de son huile essentielle. Elles sont largement utilisées comme agent d'assaisonnement dans les liqueurs, tisanes, sauces, produits de viande et autres (Diederichsen *et al.*, 1996). Elles sont bien connues pour leurs effets carminatifs, diurétiques, toniques, et aphrodisiaques (Sharma and sharma 2004).

Le premier usage médicinal de la coriandre a été rapporté par les Egyptiens anciens. Des preuves d'utilisation de la coriandre pour des fins médicinales ont été trouvées aussi dans la littérature Grecque et Latine (Diederichsen *et al.*, 1996). Dans la médecine traditionnelle iranienne, les fruits de la coriandre sont utilisés pour traiter les troubles du sommeil et l'anxiété.

En plus de ses vertus culinaires et médicinales, la coriandre présente une valeur écologique et économique non négligeable. Elle produit des quantités importantes de nectar,



ce qui lui permet d'attirer les insectes et de participer indirectement au phénomène de pollinisation et la production du miel (Diederichsen *et al.*, 1996).

### 3.2. Le céleri (*Apium graveolens* L.)

#### 3.2.1. Origine

Le céleri (*Apium graveolens*), l'un des plus importants légumes de la famille des apiaceae, est cultivé un peu partout dans le monde (Li *et al.*, 2017). C'est une plante originaire de l'Europe du sud, d'Asie et d'Afrique. On peut la retrouver aussi dans le nord et le sud-américains. Il était populaire en Europe au 18<sup>ème</sup> siècle et ensuite introduit aux USA au 19<sup>ème</sup> siècle (Sowbhagya, 2013). Il a été cultivé en France et USA pour ses graines, ensuite exporté en Allemagne, Italie, Australie, Nouvelle Zélande et d'autres pays (Sowbhagya, 2013). Les Grecs s'en servaient surtout pour ses vertus médicinales ; il a été alors davantage utilisé comme aromate car il poussait à l'état sauvage ; il s'appelait alors ache odorante.

Ces tiges n'étaient pas développées comme aujourd'hui, elles étaient petites et très fibreuses. La plante telle qu'on la connaît aujourd'hui a été cultivée au XVI<sup>e</sup> siècle en Italie. Les chinois utilisaient cette plante 500 ans avant J-C (Richard, 2016).

#### 3.2.2. Taxonomie

**Règne :** Plantae (végétal)

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous classe :** Rosidae

**Ordre :** Apiales

**Famille :** Apiaceae (ombellifères)

**Genre :** *Apium*

**Espèce :** *Apium graveolens* L.

#### 3.2.3. Noms vernaculaires

**Kabyle :** krafess

**Arabe :** كرافص

**Français :** Céleri

**Anglais :** cilantro

#### 3.2.4. Description botanique

Le céleri (**Fig. 12**) est une plante annuelle ou bisannuelle, il se développe aux cours de la saison hivernale. La plante atteint jusqu'à 30 à 45 cm. Les graines sont très petites, de 1.3 mm de longueur, d'une forme ovoïde striée et d'une couleur marron (Sowbhagya, 2013). Le céleri existe sous deux formes : le céleri feuilles (côte) et céleri-rave qui produit un tubercule correspondant à une tige tubérisée (Messiaen and Pagotto 2009).



**Figure 12** : Le céleri (*Apium graveolens* L.) (@<sup>5</sup>).

#### 3.2.5. Propriétés et utilisations

Le céleri est très utilisé dans l'industrie cosmétique et agro-alimentaire. Il constitue une excellente source de vitamines, composés phénoliques, huiles essentielles et autres nutriments. L'extrait de cette plante est souvent utilisé pour ses propriétés médicinales : antibactériennes, anti-inflammatoires et régulatrice de glycémie (Li *et al.*, 2017).

Les flavonoïdes sont l'une des plus importantes classes de composés phénoliques contenus dans le céler. Chez le céleri, cette classe est représentée principalement par l'apigénine, luteoline, kaempferol, isorhamnetine et quercétine (Nijveldt *et al.*, 2001). Ces composés sont responsables de la bonne activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydante, anti-tumorale de céleri (Kim *et al.*, 2004 ; Marzocchella *et al.*, 2011).

Les flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des racines de céleri semblent être de bon piègeurs du radical DPPH et de l'hydroxyle et participent à la réduction de la peroxydation des lipides (Popovi *et al.*, 2006).

Le céleri est utilisé sous ces différentes formes : herbes fraîche, tige, graine, huile, pour assaisonner et aromatiser les produits culinaires et cosmétiques et apporter de la saveur aux produits pharmaceutiques (Sowbhaya, 2013).

Il a été utilisé comme aphrodisiaque, antispasmodique, carminatif, diurétique, laxatif, sédatif et stimulant. Les parties de cette plante utilisées pour des fins médicinales sont les racines, les graines et les feuilles (Sowbhaya, 2013).

### 3.3. Artichaut (*Cynara scolymus* L.)

Cette espèce est originaire de l'Europe de sud et est très cultivée dans la région méditerranéenne et au nord-ouest de l'Afrique (Kaymaz et al., 2016). Elle occupe une place appréciable dans le régime alimentaire méditerranéen, pour sa valeur nutritionnelle étroitement liée à sa richesse en minéraux (sodium, calcium, potassium, fer, magnésium et phosphore) et vitamines, notamment la vitamine C (García-Martínez et al., 2017 ; Pandino et al., 2011).

#### 3.3.1. Taxonomie

Cette plante appartient au genre *Cynara*. L' "Artichaut" est le nom générique par lequel les espèces de ce genre sont populairement connues. Ils sont inclus dans la grande famille des Asteraceae ou les Composées et ont certaines caractéristiques en commun :

- Ce sont des plantes herbacées ;
- Ils ont des feuilles segmentées et épineuses ;
- Les fleurs, bleu -violet ou blanc

*Cynara scolymus* L. se caractérise par :

- Des feuilles blanchâtres ou tomenteuses en dessous, dépourvues d'épines, lobées ou presque entières
- capitule très gros
- involucre à folioles largement ovales ordinairement échancrées, charnues à la base
- fleurs bleues (Tela Botanica, 2011).

La systématique de cette espèce est comme suit :

**Règne :** Plantae (végétal)

**Division :** Spermatophytes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous classe :** Gamopétales

**Ordre :** Asterales

**Famille :** Asteraceae

**Genre :** *Cynara*

**Espèce :** *Cynara scolymus* L.

### 3.3.2. Les noms vernaculaires

**Arabe :** قرنون

**Kabyle :** thifaghwa

**Français :** Artichaut

**Anglais :** Globe artickoke

**Nom scientifique :** *Cynara scolymus* L.

### 3.3.3. Description botanique

L'artichaut (**Fig. 13**) est une plante vivace, herbacée à tige rigide et cannelée pouvant atteindre 1,50 m de hauteur. Les feuilles en rosette sont très divisées et très grandes. Les fleurs, de couleur bleue violacée, sont groupées en un gros capitule à bractées ovales charnues à la base.

Les fruits sont des akènes surmontés d'une aigrette blanche. Seule la feuille est inscrite à la Xe édition de la Pharmacopée Française. Les feuilles en rosette de la première année sont les parties de la plante utilisées en thérapeutique et non les bractées (Institut Européen des Substances Végétales, 2011).



**Figure 13 :** L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (@<sup>2</sup>).

### 3.3.4. Propriétés et utilisation

Les feuilles d'artichaut ou ses métabolites isolés ont montré différentes activités pharmacologiques chez l'animal et l'homme. Elles exercent un effet anti-oxydant non négligeable. Il a été prouvé que leurs extraits exercent *in vitro* comme *in vivo* une activité hépato-protectrice, s'oppose à la biosynthèse du cholestérol dans les hépatocytes et augmente nettement le débit biliaire et l'excrétion des sels biliaires (Ferracane *et al.*, 2008).

Les potentiels antioxydants ainsi que les activités biologique de *Cynara scolymus* sont dus essentiellement à sa richesse en certains métabolites secondaire à savoir les huiles essentielles, les saponines, les alcaloïdes, les tanins, les stéroïdes et la fraction polyphénolique (Palermo et *al.*, 2013).

Le profil en composés phénoliques de *Cynara scolymus* renferme l'acide caféique, l'acide caféoylquinique, l'acide chlorogénique, cyanidol glucosides, cynaragenine, cynarapicrine, cynaratriol, cynarine, cynarolide, decanal, eugénol, l'acide férulique et flavonoïdes (European Medicines Agency, 2012).

### **3.4. Le raisin (*Vitis vinifera* L.)**

Les vignes cultivées appartiennent à la famille des Vitaceae qui compte 17 genres et regroupe plus d'un millier d'espèces présentes en Afrique, Asie, Amérique et Océanie (Lacombe, 2012). La Vigne est une espèce ligneuse, grimpante et pérenne, qui peut se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage. Elle est cultivée pour ses fruits, les baies de raisin, utilisées pour la production de vin, de raisin de table et de raisins secs (Kapell, 2010).

#### **3.4.1. Taxonomie**

La vigne appartient au genre *Vitis*, de la famille des Vitacées. Le genre *Vitis* a été divisé en deux sous-genres, *Vitis* et *Muscadinia* dont le génome nucléaire est porté par  $2n = 38$  et  $2n = 40$  chromosomes respectivement. C'est essentiellement le premier genre qui est utilisé pour la production de raisin de table (This et *al.*, 2006 ; Kapell 2010).

La systématique de la vigne est la suivante :

**Règne :** Plantae (végétal)

**Division :** angiosperme

**Classe :** Eudicotylédones supérieures

**Sous classe :** Rosidées

**Ordre :** Vital

**Famille :** Vitaceae

**Genre :** *Vitis*

**Espèce :** *Vitis vinifera* L.

### 3.4.2. Les noms vernaculaires

**Arabe :** عنب

**Kabyle :** thizorine, adhil

**Français :** Artichaut

**Anglais :** Globe artickoke

**Nom scientifique :** *Vitis vinifera* L.

### 3.4.3. Le raisin

Le raisin (**Fig. 14**) est le fruit de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.). C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde. En effet, selon un rapport de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) concernant le marché mondial du fruit, le raisin représente 14,6 % de la production mondiale de fruits juste après l'orange (Chira et al., 2008).

Il se présente sous la forme de grappes composées de nombreux grains, qui sont sur le plan botanique des baies, de petite taille et de couleur claire, le raisin blanc (vert jaune, ou jaune doré), ou plus foncée, le raisin rouge (rose, noir violet) (Chira et al., 2008).



**Figure 14 :** Le raisin (*Vitis vinifera* L.) (@<sup>3</sup>).

### 3.4.4. Propriété et utilisation du raisin

Le raisin, fruit de la vigne, contient à maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, géraniol, ...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline, ...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins. Les composés phénoliques sont des constituants importants du raisin. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau

benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, pouvant être acylés ou glucosylés (Attia, 2007).

Le raisin est une source non négligeable de composés phénoliques répartis dans la pulpe, la pellicule et les pépins. La pellicule est la partie la mieux connue à produire les anthocyanes (Frangipane *et al.*, 2012). La fraction flavonoidiques du raisin est représentée par les anthocyanines, flavan-3-ols, tanins condensés et flavonols. Tandis que la fraction non flavonoidique inclue les acides phénoliques et les stilbenes (Urcan *et al.*, 2016). Cette composition en polyphénols est considérablement affectée par la variété, les conditions pédoclimatiques ainsi que la localisation géographique (Cerde-Carrasco *et al.*, 2014).

Les composés phénoliques du raisin sont responsables de la qualité organoleptique des fruits et les produits qui en dérivent. En outre, ils possèdent indéniablement des propriétés thérapeutiques, en particulier pour certaines pathologies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension et certains cancers (Chira *et al.*, 2008).

Selon des travaux antérieurs, les flavan-3-ols, flavonols et les anthocyanines sont les composés les plus impliqués dans le potentiel antioxydant du raisin (Costa *et al.*, 2014).

### CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

#### 1. Matériel végétal

Le choix du matériel végétal (**Tab. 2 et Fig. 15**) repose sur la facilité de l'extraction des composés phénoliques à partir de ces variétés, leur disponibilité, la rareté des travaux qui les ont traités précédemment et surtout leur propriétés relatées dans la littérature.

**Tableau 2:** Récapitulatif des variétés étudiées





<b>Nom commun</b>	<b>Nom scientifique</b>	<b>Famille botanique</b>	<b>Parties extraites</b>	<b>Origine</b>
<b>Artichaut</b>	<i>Cynara scolymus</i> L.	Astéracées	Réceptacle	Algérie
<b>Raisin</b>	<i>Vitis vinifera</i>	Vitacées	Fruit	Algérie
<b>Coriandre</b>	<i>Coriundrum sativum</i> L.	Apiacées	Tiges Feuilles	Espagne
<b>Céleri</b>	<i>Apium graveolens</i> L.	Apiacées	Tiges Feuilles	Espagne

L'artichaut et le raisin sur lesquels porte une partie de notre étude sont des espèces achetées dans le commerce en Algérie.

Le réceptacle de l'artichaut a été récupéré après avoir éliminé la tige, les bractées et les fleurs, puis finement broyé à l'état frais à l'aide d'un moulin à café. Le broyat a été immédiatement utilisé pour l'extraction des composés phénoliques.



## Chapitre II : Matériels et méthodes

			
Réceptacle de l'artichaut <i>Cynara scolymus</i> L.	Baies de raisin <i>Vitis vinifera</i> L.	Tige et feuilles de la coriandre <i>Coriandrum sativum</i> L.	Tige et feuilles du céleri <i>Apium graveolens</i> L.

**Figure 15** : Les parties des plantes étudiées

Les baies de raisin avec leurs pépins ont été broyées à l'aide d'un mortier. Le broyat a été utilisé pour l'extraction des composés phénoliques.

Le céleri et la coriandre sont deux autres variétés qui ont fait l'objet d'une autre partie du travail réalisé dans ce document. Ces variétés ont été achetées dans le commerce en Espagne. Les parties végétatives ont été broyées à l'aide d'un moulin électrique (**Fig. 16**). Le broyat de chaque variété a été homogénéisé ensuite conservé dans des récipients bien fermés à une température de 4° C jusqu'à leur utilisation dans l'extraction des composés phénoliques.



**Figure 16** : Moulin électrique utilisé pour le broyage des herbes étudiées

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction des composés phénoliques

#### 2.1.1. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

Cette étape consiste à déterminer les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques contenus dans trois variétés étudiées (*Cynara scolymus* L., *Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L.).

Des séries d'extractions ont été réalisées afin de déterminer la concentration du méthanol (%), le temps d'extraction (mn), la température (° C) d'extraction ainsi que la quantité de la prise d'essai (mg) les plus appropriés pour maximiser la teneur en composés phénoliques extraits ainsi que la capacité de piégeage des radicaux DPPH.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

La méthodologie de surface de réponse faisant appel à un plan d'expériences Box Benkhen de 15 expériences avec trois répétitions au point central, a été utilisée pour optimiser l'extraction assistée à ultrasons des composés phénoliques à partir des broyats de la coriandre et de céleri, et étudier l'influence de quatre paramètres opératoires qui sont la concentration en méthanol, la température d'extraction, le temps d'extraction et le rapport liquide/solide sur le rendement en composés phénoliques .

Un autre plan d'expérience de 27 expériences avec trois répétitions au point central, a été utilisé pour optimiser l'extraction assistée au micro-onde des composés phénoliques à partir des échantillons de céleri, et étudier l'effet de 4 paramètres expérimentaux qui sont : la concentration en méthanol, le poids de la prise d'essai, la température de l'extraction et le temps d'extraction.

Trois méthodes d'extractions ont été utilisées dans ce travail : la macération, la méthode assistée par ultrasons et la méthode assistée par micro-ondes.

### **2.1.1.1. La macération**

L'extraction des composés phénoliques de *Cynara scolymus* a été effectuée par la méthode de macération sous agitation au laboratoire de physiologie végétal de l'USTHB.

#### **2.1.1.1. Protocole d'extraction**

Pour extraire les composés phénoliques du réceptacle d'artichaut nous avons opté pour une macération de 1 g de broyat d'artichaut dans du méthanol à différentes concentrations (0 %, 30 %, 50 %, 80 %, 100 %) avec différents volumes de solvant (10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml).

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

Les mélanges échantillons-solvants ont été incubés à la température ambiante, à l'abri de l'air et de la lumière sous agitation (150 tr/mn) pendant différentes durées (1 h, 12 h et 24 h). A la fin de la macération, les mélanges ont été centrifugés pendant 20 mn à 6000 tr/mn à température ambiante, filtrés sur papier filtre et conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

### **2.1.1.2. L'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction des composés phénoliques à partir de la coriandre et du céleri a été effectuée par la méthode assistée par ultrasons et la méthode assistée par micro-ondes au laboratoire de chimie analytique de l'université de Cadix (Espagne).

#### **2.1.1.2.1. L'extraction assistée par ultrasons**

L'extraction assistée à ultrasons a été réalisée à l'aide d'un appareil à ultrasons UP200S (Ultrasonic System, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Allemagne) composé d'un générateur d'ultrasons et d'un bain à eau associé à un régulateur de température (**Fig. 17**).



**Figure 17 :** Dispositif d'extraction assistée par ultrasons

Un mélange de 10 ml de solvant et de la quantité requise en broyat selon le plan d'expérience a été introduit dans un tube à extraction. Ce dernier est ensuite soumis à la sonication pendant 10 mn. La température d'extraction est dictée par le plan d'expérience.

A la fin de l'extraction, le mélange a été centrifugé pendant 5 mn à une vitesse de 6000 tr/mn. Le surnageant est ensuite récupéré et son volume est ajusté à 10 ml par le solvant approprié. L'extrait ainsi préparé est conservé à 4° C et filtré par des filtres en nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  juste avant son injection dans le système de séparation (UPLC-PDA).

### **2.1.1.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes**

Cette méthode d'extraction a été réalisée par le moyen d'un four à micro-ondes de type Milestone Ethos 1600 (System Sorisole, Italie) équipé d'un tube à extraction à base de polymère tétrafluorométhoxyle (**Fig. 18**).

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

Les échantillons de céleri sont pesés et immédiatement introduits dans des tubes à extraction. Un volume approprié du solvant d'extraction est ensuite ajouté aux différentes prises d'essai. Les mélanges sont mis à extraction dans le micro-onde dans des conditions de temps et de température dictées par le plan d'expériences.

A la fin de l'extraction les tubes sont refroidis et leurs contenus ont été centrifugés pendant 5 mn à une vitesse de 6000 tr/mn. Le surnageant est ensuite récupéré et son volume était ajusté à 10 ml par le solvant approprié.

Les extraits ainsi préparés sont conservés à 4° C et filtrés par des filtres en nylon de 0.22 µm juste avant son injection dans le système de séparation (UPLC-PDA).



**Figure 18** : Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes.

### **2.1.1.3. La cinétique d'extraction**

La cinétique d'extraction a été évaluée par la détermination de la teneur en composés phénoliques à des intervalles de temps allant de 5 mn à 30 mn. Les conditions expérimentales étant celles trouvées comme meilleures pour maximiser le rendement.

### **2.1.1.4. Validation de la méthode d'extraction**

La précision de la méthode est vérifiée par l'évaluation de la réplicabilité, la répétabilité et de la reproductibilité.

#### **2.1.1.4.1. La réplicabilité**

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour (Anonyme 2015).

Dans notre cas, elle a été évaluée par la réalisation de 3 extractions successives des composés phénoliques aux points optimums.

#### **2.1.1.4.2. Répétabilité**

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour (Anonyme 2015). Nous avons pu évaluer ce paramètre par la réalisation de plusieurs extractions aux points optimaux en variant le jour de l'extraction.

### 2.1.1.4.3. Reproductibilité

La reproductibilité est la variabilité aléatoire des résultats de plusieurs déterminations d'un même échantillon, effectuées de manière espacée dans le temps, donc dans des conditions qui peuvent être expérimentalement légèrement différentes (Anonyme 2000). Nous avons étudié ce paramètre en effectuant des extractions des composés phénoliques aux points optimums, 3 jours de suite.

## 2.2. Analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative des composés phénoliques

### 2.2.1. Analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative par Chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (UPLC)

#### 2.2.1.1.Principe

UPLC est une technique d'analyse qui consiste à séparer les composés phénoliques contenues dans un échantillon par partage entre une phase mobile (liquide) et une phase stationnaire (solide). Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes :

- un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble
- un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit

La séparation et le temps de migration des composés à séparer dépendent des différences d'affinités de ces composés pour les phases mobile et stationnaire.

#### 2.2.1.2.Mode opératoire

L'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques extraits à partir du céleri et de la coriandre ont été effectuées au laboratoire de chimie analytique de la faculté des sciences à l'Université de Cadix (Espagne).



## Chapitre II : Matériels et méthodes

Nous avons fait appel à un appareil de type ACQUITY UPLC H-Class à détecteur UV-Visible. L'appareil est associé à un logiciel de traitement des données de type Empower™ 3 (Figure 19). La séparation a été effectuée par injection d'un volume de 3  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à un débit de  $0.45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  sur une colonne en phase inverse C18 (Acquity UPLC® BEH,  $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters Corporation, Irlande). Toutes les analyses ont été réalisées à une température de  $47^\circ \text{C}$  et une longueur d'onde de détection de l'ordre de  $320 \text{ nm}$ . La phase mobile consiste en un mélange de deux solvants : eau additionné de 5 % d'acide formique (solvant A), et méthanol additionné de 5 % d'acide formique (solvant B). Le gradient d'élution adopté est le suivant : (Temps, B %) 0–1 min, 0%; 3 min, 5%; 3–4.5 min, 5–10%; 4.5–7 min, 10–20%; 7–10 min, 20–30%; 10–15 min, 30–100%; 15–20 min, 100–0%.



**Figure 19** : Dispositif expérimental de l'UPLC

### 2.2.2. Analyse qualitative, semi-quantitative et quantitative par Chromatographie en phase liquide ultra-haute performance (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse (SM) (UPLC-SM)

L'analyse par UPLC-SM a été effectuée à l'aide d'un appareil de type (Acquity UPLC H-Class system) couplé à un masse-spectromètre (Q-ToF-MS, Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, USA). Un logiciel Masslynx version 4.1 a été utilisé pour gérer l'équipement.

La séparation a été effectuée par injection d'un volume de 2  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à un débit de  $0.45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  sur une colonne en phase inverse C18 (Acquity UPLC® BEH,  $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters Corporation, Irlande). Toutes les analyses ont été réalisées à une température de  $47^\circ\text{C}$  et une longueur d'onde de détection de l'ordre de  $320 \text{ nm}$ . La phase mobile consiste en un mélange de deux solvants : eau additionné de 5 % d'acide formique (solvant A) et méthanol additionné de 5 % d'acide formique (solvant B). Le gradient d'élution adopté est le suivant : (temps, B %) 0 min, 0% B; 1 min, 0% B; 3 min, 5% B; 4 min, 10% B; 4.5 min, 10% B; 5 min, 20% B; 7 min, 20% B; 8 min, 30% B; 10 min, 30% B.

Une série de dilution des solutions mères a été réalisée afin d'obtenir des concentrations allant de  $1\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Une fois l'analyse de la régression des courbes d'étalonnage établie, l'écart type des variables ainsi que la pente de la courbe de régression sont utilisés pour calculer la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). Les courbes d'étalonnages des composés phénoliques étudiés sont représentées dans le **tableau 3**.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

**Tableau 3:** Courbe d'étalonnage des composés étudiés

Composés	Unité (mg L <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	Observations	Equation linéaire	R <sup>2</sup>	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Acide caféique	0.15 – 12	320	10	$y = 8165x - 5192$	0.9997	0.211	0.703
Quercetin-3-O-glucoside	0.30 – 15	355	10	$y = 2324x + 758$	0.9999	0.320	1.067
Quercetin-3-O-glucuronide	0.30 – 15	355	10	$y = 3193x - 524$	0.9999	0.330	1.100
Quercetin-3-O-rutinoside	0.30 – 15	355	10	$y = 1980x - 1803$	0.9997	0.424	1.413

### 2.2.3. Mode d'identification des composés phénoliques

L'identification des composés a été réalisée par

- La comparaison de leurs temps de rétentions à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions.
- La comparaison des spectres de masse des molécules inconnues à ceux standards disponibles tels que l'acide caféique, la quercetine-3-O-glucoside, la quercetine-3-O-glucuronide et la quercetine-3-O-rutinoside (rutin).

### 2.2.4. Analyse quantitative des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des échantillons a été déterminée suivant 3 méthodes :

### 2.2.4.1.Méthode 1

Il s'agit du dosage colorimétrique par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton and Rossi (1965) avec quelques modifications.

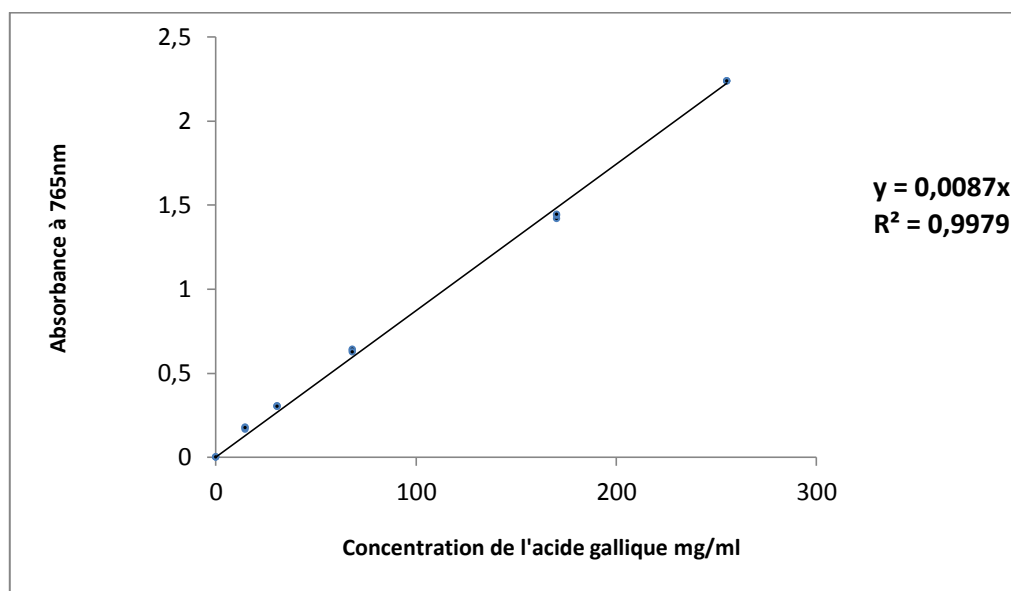
#### 2.2.4.1.1. Principe

Elle mesure la capacité de réduction de l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) / phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) de coloration jaunâtre par des composés phénoliques. Le produit résultant de cette réaction présente une coloration bleue avec un maximum d'absorption à 765 nm (Prior *et al.*, 2005 ; Rover *and* Brown 2013 ; Khodami *et al.*, 2013).

#### 2.2.4.1.2. Mode opératoire

Afin d'estimer la quantité des polyphénols totaux dans les extraits de nos plantes par cette méthode, un volume de 200  $\mu$ l d'extrait d'artichaut est mélangé avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 mn d'incubation à température ambiante à l'abri de l'air et de la lumière, le mélange est additionné de 1 ml de carbonate de sodium à 7.5 % (m/v). A la fin de la durée d'incubation de 30 mn, l'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS contre un blanc.

La concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme étalon établie avec l'acide gallique comme standard (**Fig. 20**). Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 100 grammes de matière végétale.



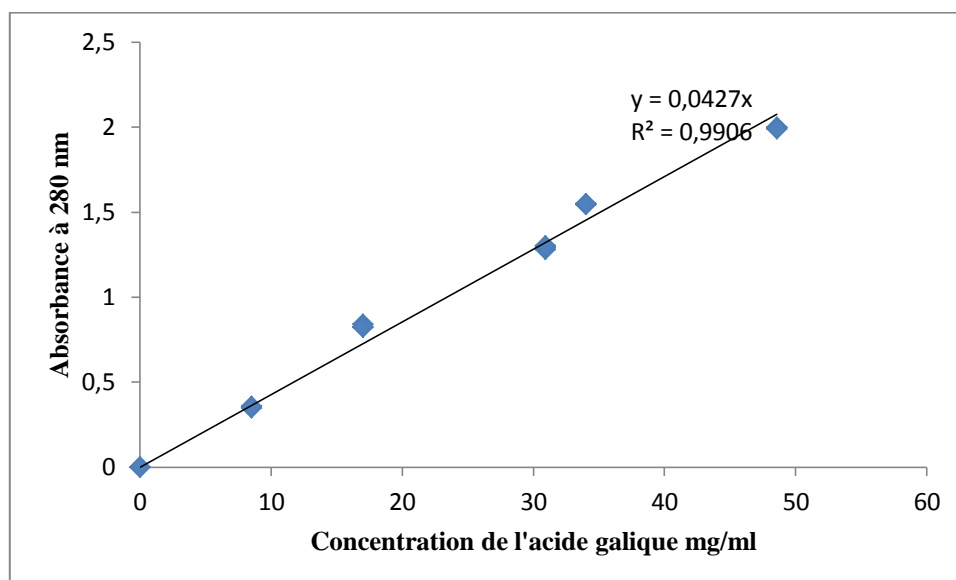
**Figure 20 :** Courbe d'étalonnage de la méthode FC.

### 2.2.4.2. Méthode 2

Il s'agit de l'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux par la mesure directe de l'absorbance de l'extrait dans l'UV à 280 nm.

C'est une méthode basée sur l'absorbance des cycles aromatiques à 280 nm sans addition d'aucun réactif (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000 ; Spigno *et al.*, 2007).

Dans cette méthode de détermination quantitative, la même procédure est appliquée au standard d'acide gallique. La teneur en phénols totaux des extraits méthanoliques mesurée dans l'UV est déduite à partir de la courbe d'étalonnage (**Fig. 21**) de l'acide gallique et sera exprimée en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes d'extrait.



**Figure 21:** Courbe d'étalonnage de la méthode UV.

### 2.2.4.3. Méthode 3

Il s'agit de la Chromatographie en phase liquide ultra-haute performance

Nous avons fait appel à un appareil de type ACQUITY UPLC H-Class à détecteur UV-Visible. L'appareil est associé à un logiciel de traitement des données de type Empower™ 3 (Fig. 19). La séparation a été effectuée par injection d'un volume de 3  $\mu$ L de l'échantillon à un débit de 0.45 mL·min<sup>-1</sup> sur une colonne en phase inverse C18 (Acquity UPLC® BEH, 2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters Corporation, Irlande).

Toutes les analyses ont été réalisées à une température de 47° C et une longueur d'onde de détection de l'ordre de 320 nm. La phase mobile consiste en un mélange de deux solvants : eau additionné de 5 % d'acide formique (solvant A) méthanol additionné de 5 % d'acide formique (solvant B).

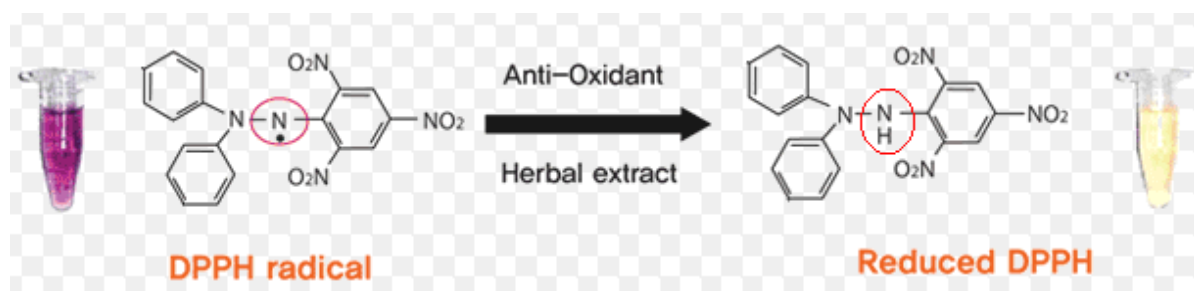
Le gradient d'élution adopté est le suivant : (Temps, B %) 0–1 min, 0%; 3 min, 5%; 3–4.5 min, 5–10%; 4.5–7 min, 10–20%; 7–10 min, 20–30%; 10–15 min, 30–100%; 15–20 min, 100–0%.

### 2.3. Détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH

#### 2.3.1. Principe

La capacité des extraits à piéger les radicaux libres a été déterminée *in vitro* par le test DPPH, selon la méthode modifiée par (Franco *et al.*, 2014). C'est une méthode spectrophotométrique basée sur la réduction du radical DPPH par les atomes hydrogène libérées par les composés phénoliques.

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) est stable, coloré et centré sur l'azote, avec un maximum d'absorption qui se situe vers 517 nm (Blois, 1958). La réduction du DPPH° (caractérisé par une couleur pourpre) par un donneur d'atome H (AH) conduit à la formation du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (DPPH-H) (Fig. 22) (Pisoschi and Negulescu 2011).



**Figure 22 :** Principe de détermination de l'activité antioxydante par le test de DPPH

#### 2.3.2. Protocole opératoire

Le dosage quantitatif a été réalisé sur 25  $\mu$ l d'échantillon auxquels sont rajoutés 975  $\mu$ l d'une solution méthanolique de DPPH de 60  $\mu$ M. Après agitation et incubation du mélange pendant 30 mn à température ambiante à l'abri de l'air et de la lumière, les absorbances ont été mesurées par spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 517 nm.

La capacité antioxydante a été exprimée en pourcentage de piégeage du radical DPPH calculé selon la formule suivante :

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

$$\% \text{ inhibition DPPH} = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}/A \text{ blanc}) * 100$$

A blanc : Absorbance de la solution DPPH ;

A échantillon : Absorbance de la solution DPPH en présence de l'échantillon après 30 mn.

### 2.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>)

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (composés phénoliques, huile essentielle ou toute autre substance utilisée comme antioxydant) nécessaire pour piéger 50% des radicaux. En d'autres termes, c'est la concentration nécessaire pour obtenir une activité en % égale à 50.

Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

### 3. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en 3 répétitions et leurs résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard (ES). Afin de déterminer la significativité des différences de résultats obtenus, une analyse de variance a été réalisée sur les résultats obtenus, avec le logiciel Minitab version 17.



## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Effet des conditions expérimentales sur la teneur en composés phénoliques de *Cynara scolymus* L. et l'activité de piégeage du radical DPPH

#### 1.1. Effet des conditions expérimentales sur la teneur en composés phénoliques

Le type ainsi que la concentration du solvant, la température, le temps et le pH sont tous des facteurs d'une grande influence sur la teneur en composés phénoliques. L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, à partir du réceptacle de *Cynara scolymus* L. a été effectuée en faisant varier trois paramètres (volume du solvant, le pourcentage de méthanol dans le solvant (méthanol %) et temps d'extraction) (**Tab. 4**).

**Tableau 4** : les paramètres expérimentaux étudiés chez *Cynara scolymus* L. et leurs niveaux

Facteur	Niveau	Valeurs
Temps (h)	3	1; 12; 24
Méthanol (%)	5	0; 30; 50; 80; 100
Volume du solvant (ml)	4	10; 20; 30; 40

L'impact des trois facteurs a été étudié. La signification de chaque paramètre a été déterminée par l'analyse ANOVA et vérifié par le biais de la valeur  $p$  du test F. On dit qu'une variable a un effet significatif lorsque la valeur  $p < 0.05$ . Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5.** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance pour *Cynara scolymus* L.

Source	F-Value	P-Value
Temps (h)	2,42	0,111
Méthanol %	3,08	0,035*
Volume du solvant	60,70	0,000*
Temps* Méthanol (%)	2,34	0,051
Méthanol (%)* volume du solvant	1,54	0,177
Temps * volume du solvant	0,71	0,648
Erreur	nd	Nd
Total	nd	Nd

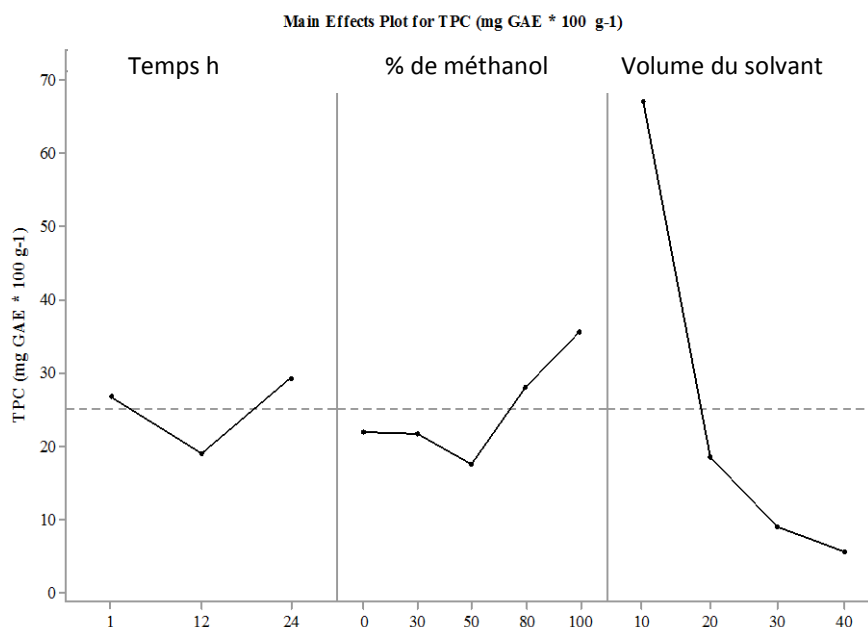
nd: non déterminée;  $R^2$  (coefficient de détermination) = 90.93%;

$R$  (coefficient de corrélation) = 0.95.

Les résultats du **tableau 5** montrent que seuls le volume du solvant et le (méthanol %) ont un effet significatif sur la teneur en composés phénoliques de *Cynara scolymus* L. ( $p < 0.05$ ). Les valeurs de signification des autres paramètres sont supérieures à 0.05 ce qui indique qu'ils sont sans effet sur la teneur en composés phénoliques.

### 1.1.1. Effet du solvant d'extraction

L'impact du méthanol % a été étudié en testant 5 niveaux (0%, 30%, 50%, 80% et 100%). Les résultats du **Tableau 5** montrent que la teneur en composés phénoliques de *Cynara scolymus* varie considérablement avec la variation du % de méthanol. La teneur en composés phénoliques augmente proportionnellement avec le % de méthanol (**Fig. 23**).



**Figure 23** : Effet des conditions expérimentales sur la teneur en composés phénoliques de *Cynara scolymus* L.

Les solvants le plus souvent utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont des alcools, notamment le méthanol et l'éthanol (Spigno *et al.*, 2007 ; Razali *et al.*, 2012). Le méthanol est un solvant organique réputé pour son efficacité dans l'extraction des composés phénoliques comparativement à d'autres solvants (Esteivinho *et al.*, 2008 ; Dziri *et al.*, 2012 ; Kallel *et al.*, 2014), d'où le choix du méthanol comme solvant organique pour mener cette présente étude.

La teneur en composés phénoliques est fortement influencée par la polarité du solvant d'extraction ainsi que la solubilité des composés contenus dans le matériel végétal étudié (Allothman *et al.*, 2009). L'extraction des composés phénoliques se fait par solubilisation des molécules dans le solvant, ce qui fait de la polarité de ce dernier un paramètre très important (Ilyaiyaraja *et al.*, 2015).

Dans notre cas, le méthanol pur s'est avéré le solvant le plus efficace pour l'extraction du maximum de composés phénoliques à partir du réceptacle de l'artichaut comparativement aux mélanges méthanol-eau.

L'addition de l'eau au solvant organique permet le gonflement du matériel végétal. Elle facilite la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice végétale, ce qui augmente

l'efficacité de l'extraction (Luthria *et al.*, 2012). Mais parfois, l'utilisation d'un mono-solvant est recommandée lorsqu'il s'agit des composés à faible polarité tels que les tanins qui ne sont solubles que dans des solvants moins polaires. (Chew *et al.* 2011).

Le résultat obtenu peut être attribué au fait que la majeure partie des composés phénoliques contenus dans le réceptacle de *Cynara scolymus* L. ne sont pas solubles dans l'eau. Il peut aussi être expliqué par la pénétration du solvant jusqu'aux compartiments cellulaires qui ne s'achève -dans le cas de l'artichaut- qu'en présence de solvant apolaire.

Au regard des autres travaux cités dans la littérature, nos résultats se sont avérés similaires à ceux précédemment obtenus sur le même matériel végétal (Mahmoudi *et al.*, 2013) et sur un matériel différent (Marinova *et al.* 2011).

Par contre, ils sont en désaccord avec diverses études qui ont démontré l'importance de l'utilisation de mélange de solvants (eau/solvant organique), afin d'extraire les composés phénoliques hautement polarisés tels que les acides phénoliques (Spigno *et al.*, 2007 ; Stalika *et al.*, 2007 ; Luthria *et al.*, 2008 ; Luthria *et al.*, 2012 ; Mokrani *et al.*, 2016).

### **1.1.2. Le volume du solvant**

Le volume du solvant est à son tour un facteur déterminant dans le processus d'extraction des composés phénoliques. Il affecte significativement le rendement (Bonnaillie *et al.*, 2012). L'extraction des composés phénoliques de la matrice cellulaire dans le solvant est fortement liée au rapport liquide/solide. Elle est d'autant plus importante que ce rapport est faible. Ça pourrait être expliqué par le principe de *transfert de masse* qui est régi par le gradient de concentration entre le solide et le volume du solvant (Luthria *et al.*, 2008 ; Michiels *et al.*, 2012). Quand le solvant atteint la saturation, un équilibre entre la concentration en solutés et le volume du solvant rend le gradient nul, par conséquent le phénomène de *transfert de masse* s'arrête.

Ce paramètre a été étudié en variant le volume du solvant tout en gardant la quantité de l'échantillon constante (1 g). Il ressort à travers les résultats obtenus que la teneur en composés phénoliques est inversement proportionnelle au volume du solvant, donc inversement proportionnelle au rapport liquide/solide.

Une étude similaire menée par (Iuthria *et al.*, 2008) sur le persil a rapporté le même résultat que celui de notre étude. En revanche, d'autres travaux ont décelé l'effet négligeable de ce facteur sur la teneur en composés phénoliques (Ilaiyaraja *et al.*, 2014).

Bachir Bey et son équipe (2014) attribuent cette différence au type et à la complexité du matériel végétal ainsi que les composés phénoliques contenus par le matériel. Ils expliquent qu'une même condition expérimentale peut avoir un effet hautement significatif pour un matériel végétal et au même temps être sans effet pour un autre matériel.

### **1.1.3. Effet du temps d'extraction**

Ce paramètre semble avoir un effet négligeable sur la teneur en composés phénoliques. Nous constatons que le rendement augmente avec le temps, le meilleur étant de l'ordre de 17.18 mg EAG.MS obtenu après 24 heures de macération dans 10 ml de méthanol 100 %. C'est un rendement qui n'est pas significativement différent de celui obtenu après une heure de macération uniquement.

Il faut considérer, par conséquent, qu'une heure de macération représente le temps nécessaire au solvant pour pénétrer à l'intérieur de la matrice végétale et extraire le maximum de composés phénoliques. Cela répond à la loi du transfert de la matière qui est régi par le temps et la température, et qui stipule que le transfert de matière augmente avec le temps jusqu'à ce que la totalité des composés phénoliques soit extraite (Bachir Bey *et al.*, 2014).

Certaines études confirment que le temps d'extraction joue un rôle crucial sur le rendement en composés phénoliques (Baiano *et al.*, 2014), tandis que d'autres rapportent l'inverse et mettent en évidence l'effet négligeable de ce paramètre sur la teneur en composés phénoliques (Alberti *et al.*, 2014). Cette contradiction pourrait être expliquée par la différence de matériel végétal étudié.

## **1.2. Effet des conditions expérimentales sur l'activité antioxydante**

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés naturels présents dans les aliments. Le recours à la méthode de DPPH dans notre étude est motivé par ses avantages qui se résument dans sa simplicité et son efficacité. De plus, le DPPH est un radical libre organique très stable et présente la capacité de fixer un électron ou un atome d'hydrogène (Abozed *et al.*, 2014). La réduction du radical libre DPPH qui se fait par fixation d'un atome d'hydrogène libéré par les molécules antioxydantes se traduit

par la diminution de la densité optique de la solution contenant ce radical (Michiels *et al.*, 2012).

Comme il est montré par les résultats du **Tableau 6**, tous les paramètres et leurs interactions ont un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical libre DPPH. Cela a été bien confirmé par les valeurs *p* inférieures à 0.05. Seul l'interaction entre le temps et le volume de solvant a enregistré un effet négligeable avec une signification de l'ordre de 0.093 (>0.05).

**Tableau 6:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance pour l'activité antioxydante chez *Cynara scolymus* L.

Source	DF	F-Value
Temps (h)	2	16.58
Concentration de méthanol	4	55.69
Volume du solvant	3	10.16
Temps * volume du solvant	8	8.95
Temps *volume du solvant	6	2.08
Concentration de méthanol*Volume de solvant	12	3.94
Erreur	24	N/A
Total	59	N/A

### 1.2.1. Effet du méthanol (%)

Les pourcentages d'inhibition des radicaux libres DPPH par les extraits fluctuent entre 4 % et 70.9 %. Il apparaît que le pourcentage du méthanol est le facteur le plus déterminant de cette activité ; ce résultat rejoint ceux de (Chew *et al.*, 2011 ; Bachir Bey *et al.*, 2014) sauf que le solvant utilisé était de l'éthanol.

En revanche, d'autres auteurs ont rapporté des résultats contradictoires aux nôtres. Le méthanol pur était le solvant le plus efficace pour une meilleure activité de piégeage du radical DPPH par les composés phénoliques extraits à partir des échantillons de pomme (Michiels *et al.*, 2012) et 60 % de méthanol pour les échantillons du café (Aumarawanna *et al.*, 2016). La différence du matériel végétal ainsi que de la nature des composés phénoliques expliquent cette discordance de résultats.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation du méthanol (%) pratiquement pour tous les échantillons. Il atteint un maximum d'inhibition de 70.9 % à une concentration de 80 %, 1 heure et 10 ml de solvant. Pour toute concentration dépassant 80 %, le pourcentage d'inhibition diminue. Cela est dû probablement à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques à haut potentiel antioxydant. En effet, des études précédentes ont mis en évidence le rôle du méthanol dans l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques connus par leur activités antioxydantes intéressantes ; il s'agit de flavan-3-ols et des proanthocyanidines qui sont des polymères du flavan-3-ols (Mirali *et al.*, 2014).

L'évaluation de l'activité antioxydante par la détermination de la concentration minimale inhibitrice de 50 % des radicaux libres DPPH conforte le premier résultat. En effet, nous avons constaté que, mise à part deux extraits obtenus par 80 % méthanol (1 heure 10 ml et 20ml) et un extrait obtenu par méthanol 100% (12 heures, 10 ml) aucun des autres extraits n'a pu atteindre un seuil d'inhibition de 50% des radicaux libres.

### **1.2.2. Effet du rapport solide / liquide**

L'activité de piégeage du radical DPPH ainsi que la teneur en composés phénoliques sont toutes les deux dépendantes du volume de solvant. D'une manière générale, l'augmentation du volume de solvant d'extraction permet d'améliorer l'efficacité de l'extraction, mais aussi son coût. Par contre, la diminution du volume de solvant réduit le coût de l'extraction mais au même temps elle abaisse l'efficacité de l'extraction par la survenue du phénomène de saturation (Predescu *et al.*, 2016).

Dans le cas de notre étude, le phénomène de saturation ne survient pas même pour le volume le plus faible qui est de 10 ml. Cela veut dire que la quantité extraite n'est pas aussi importante pour saturer le solvant d'extraction (Zhang *et al.*, 2007 ; Song *et al.*, 2011). Par conséquent, l'extraction des composés phénoliques et l'amélioration de l'activité antioxydante peuvent être augmentées tout en économisant le solvant utilisé

Le rapport liquide/solide exerce lui aussi un effet remarquable sur l'activité de piégeage du radical DPPH (Baiano *et al.*, 2014). Il a été constaté que cette dernière est inversement proportionnelle au volume du solvant, ça nous mène à dire que les activités les plus intéressantes sont enregistrés pour les volumes les plus faibles (10 ml).

Toutefois, et inversement à notre résultat, Tay *et al.* (2014) ont suggéré que l'activité de piégeage du radical DPPH augmente proportionnellement avec l'augmentation du volume du solvant. Cela se justifie par la concentration de la matrice cellulaire en composés phénoliques.

### **1.2.3. Effet de la durée de macération**

Le troisième facteur étudié est le temps de macération. C'est un facteur déterminant dans l'économie de l'énergie et du coût du processus d'extraction (Chew *et al.*, 2011). Nos résultats ont révélé que ce facteur affecte considérablement l'activité de piégeage du DPPH.

En effet, diverses études montrent le rôle pivotant de la durée de l'extraction sur l'activité de piégeage du DPPH des extraits des végétaux (Chuyen *et al.*., 2017 ; González-Montelongo *et al.*, 2010 ; gope *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2007). A l'inverse de Mirali et son équipe (2014) qui ont enregistré un effet négligeable du temps d'extraction sur l'activité antioxydante de 6 variétés de lentilles. Les résultats contradictoires peuvent être expliqués par le type et la complexité du matériel végétal ainsi que la nature des composés phénoliques qui caractérisent chaque espèce (Song *et al.*, 2011 ; Bachir bey *et al.*, 2014 Vuong *et al.*, 2015), mais également la différence entre les conditions expérimentales de chaque test réalisé (Bozin *et al.*, 2008).

La teneur maximale en composés phénoliques a été enregistrée par la durée de macération de 24 heures. Cependant l'activité de piégeage du radical DPPH a enregistré un maximum après une heure d'extraction. Au-delà de cette durée d'incubation, l'activité a connu une baisse. Cette baisse d'activité pourrait être justifiée par la perte des composés phénoliques suite à leur exposition probable à la lumière et à la température pendant un temps étalé. En effet, Dai and Mumper (2012) ont rapporté que les longues durées de macération augmentent la possibilité d'oxydation des composés phénoliques notamment lorsqu'elles sont accompagnées de températures élevées.

### **1.3. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante**

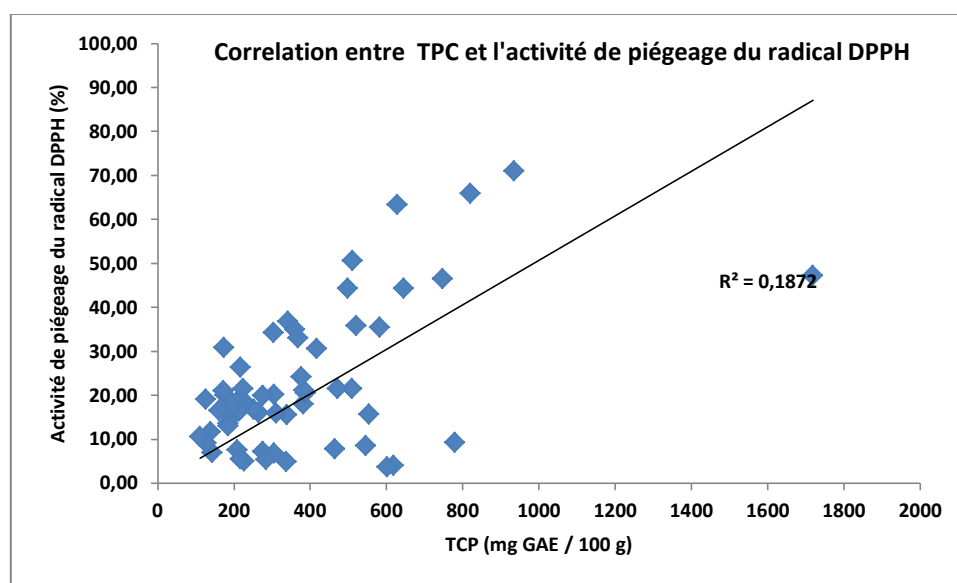
Les composés phénoliques des végétaux constituent la première classe des métabolites secondaires dotés d'un potentiel bioactif intéressant attribué à leurs propriétés antioxydantes et antibactériennes (Wong and kitt 2006). Leur activité antioxydante est attribuée à leur potentiel redox qui leur permet d'agir en tant que donneur d'hydrogène, agent réducteur, chélateur des métaux et piégeur des radicaux libres (Gope *et al.*, 2014).



La propriété antioxydante des extraits des plantes est le résultat de l'action synergique de tous les composés phénoliques qui rentrent dans la composition du profil en composés phénoliques de l'extrait. Tout changement dans le profil en composés phénoliques, aussi bien qualitatif que quantitatif, peut être à l'origine d'un changement similaire de l'activité antioxydante de l'extrait (Ilaiyaraja *et al.*, 2015).

Des résultats controversés ont été rapportés dans la littérature sur la correspondance entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante qui en résulte (Lafka *et al.*, 2011). Certaines études ont mis en évidence l'existence d'une bonne corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante de l'extrait. (Oliveira *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2011 ; Trabelsi *et al.*, 2010 ; Kallel *et al.*, 2014). Cette corrélation positive et significative signifie que la teneur en composés phénoliques participe fortement à l'activité antioxydante de l'extrait considéré (Brione *et al.*, 2014).

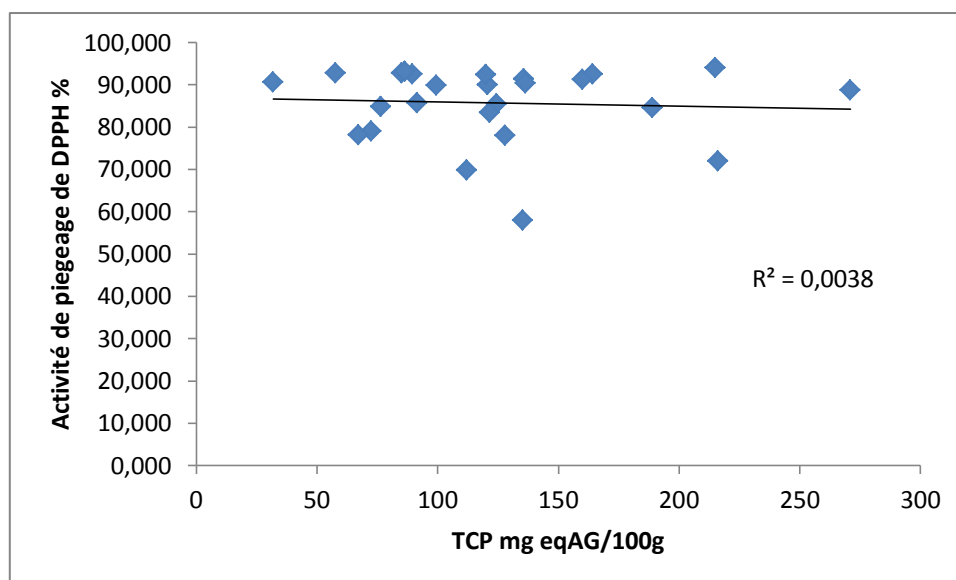
Dans la présente étude, la correspondance entre la teneur en composés phénoliques (TPC) de *Cynara scolymus* L. et du raisin noir et l'activité de piégeage du radical DPPH s'est avéré faible et non significative **Figure 24** et **Figure 25**



**Figure 24** : Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH par les extraits de *Cynara scolymus* L.

Ce résultat est confirmé par la valeur du coefficient de corrélation calculé à partir du coefficient de détermination. Il est très faible de l'ordre de 0.43. Un même résultat a été

enregistré pour le raisin avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.068 qui est à son tour très faible.



**Figure 25** : La corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH des extraits de *Vitis vinifera* L.

La faible corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH signifie que par la teneur en composés phénoliques totaux n'explique pas à elle seule l'activité antioxydante des extraits dans le cas de *Cynara scolymus* L.

Il est probable qu'il y ait surestimation de la teneur en composés phénoliques vu que d'autres composés non phénoliques sont susceptibles de réagir avec le réactif de Folin et donc ils seront quantifiés comme composés phénoliques alors qu'ils ne possèdent pas un potentiel antioxydant (Magalhaes *et al.*, 2010).

De plus, les composés phénoliques contribuent à l'activité antioxydants des extraits, mais ils ne sont pas entièrement responsables de cette dernière. Il existe d'autres composés qui y participent tels que la tocophérol et l'acide ascorbique (Petropoulos *et al.*, 2017).

Nos résultats rejoignent ceux de Dziri *et al.* (2012), Kchaou *et al.* (2013) et Markandan *et al.* (2016) qui ont aussi mis en évidence une corrélation non significative entre la teneur en phénols totaux et l'activité antioxydante.

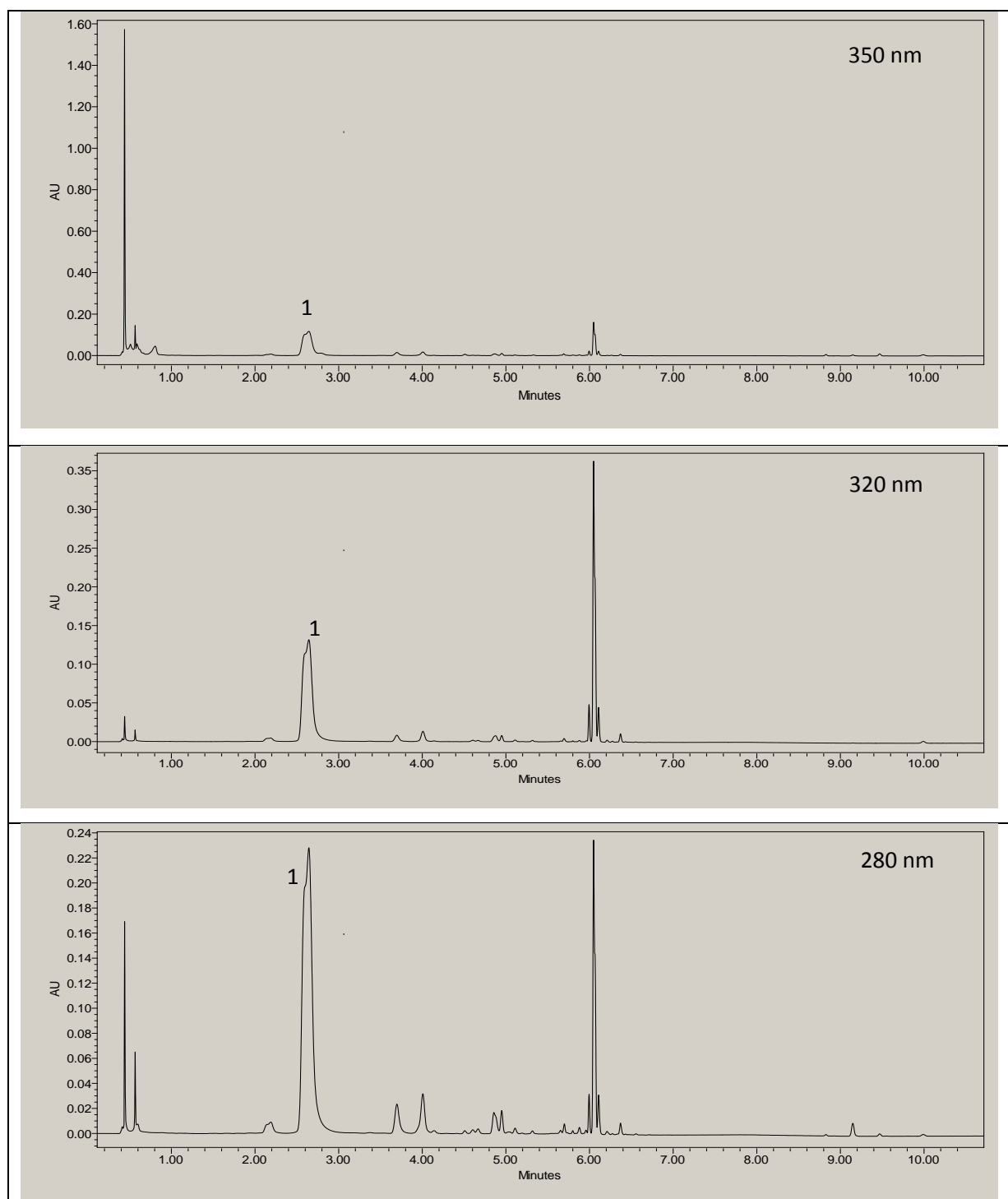
## 2. Identification des composés phénoliques de *Coriandrum sativum* L. et de *Apium graveolens* L.

La chromatographie liquide est aujourd'hui une méthode très largement développée pour l'étude des composés phénoliques. De nombreuses données sont disponibles dans la littérature tant au niveau des conditions chromatographiques pour la séparation des composés que pour leur identification basée sur les données de spectrométrie.

### 2.1. Identification des composés phénoliques de *coriandrum sativum*

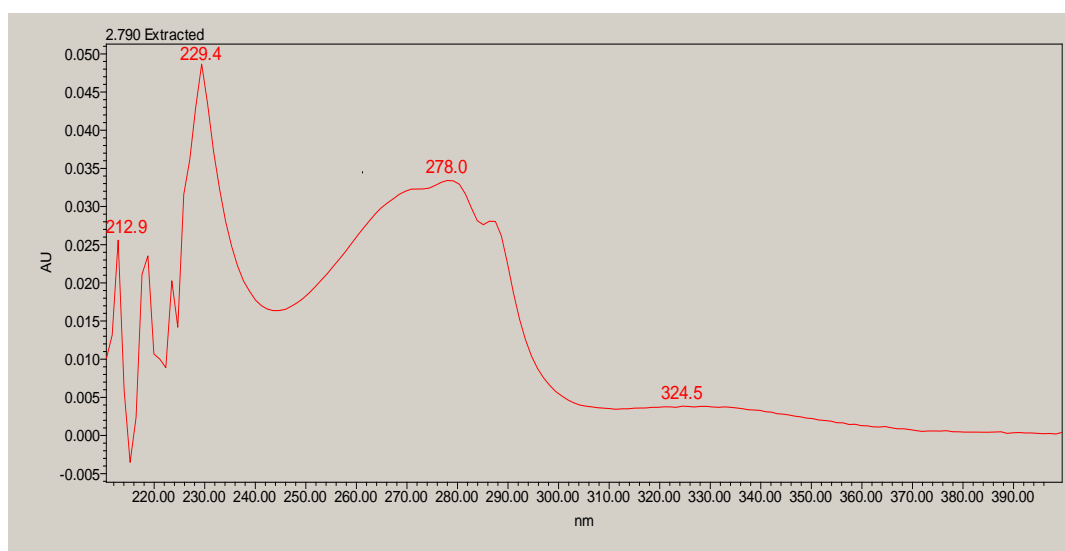
Les figures 26 et 27 montrent le profil en composés phénoliques de *Coriandrum sativum* L. En comparant les temps de rétention ainsi que les chromatogrammes des composés phénoliques de *Coriandrum sativum* L. détectés par l'UPLC et l'UPLC/SM avec les temps de rétention et chromatogrammes des standards disponibles injectés dans les mêmes conditions que l'échantillon, nous avons pu identifier 4 composés : un acide phénolique qui est l'acide caféique et trois flavonoïdes qui sont des dérivés de la quercétine : quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-glucuronide and quercétine-3-O-rutinoside.

Barros *et al.* (2012) ont pu identifier -dans la partie végétative de *Coriandrum sativum* L.- 5 acides phénoliques qui sont : Diméthoxycinnamoyl hexoside, l'acide 5-O-cafféoylquinique, l'acide cafféoylquinique, l'acide ferulique glucoside, l'acide p-coumaroylquinique et quatre flavonoïdes qui sont : quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-glucuronide and quercétine-3-O-rutinoside, Kaempferol-3-O-rutinoside.



**Figure 26:** Chromatogrammes de *Coriandrum sativum* L. à 350 nm, 320 nm et 280 nm

**1 :** Acide caféique étudié dans la partie optimisation

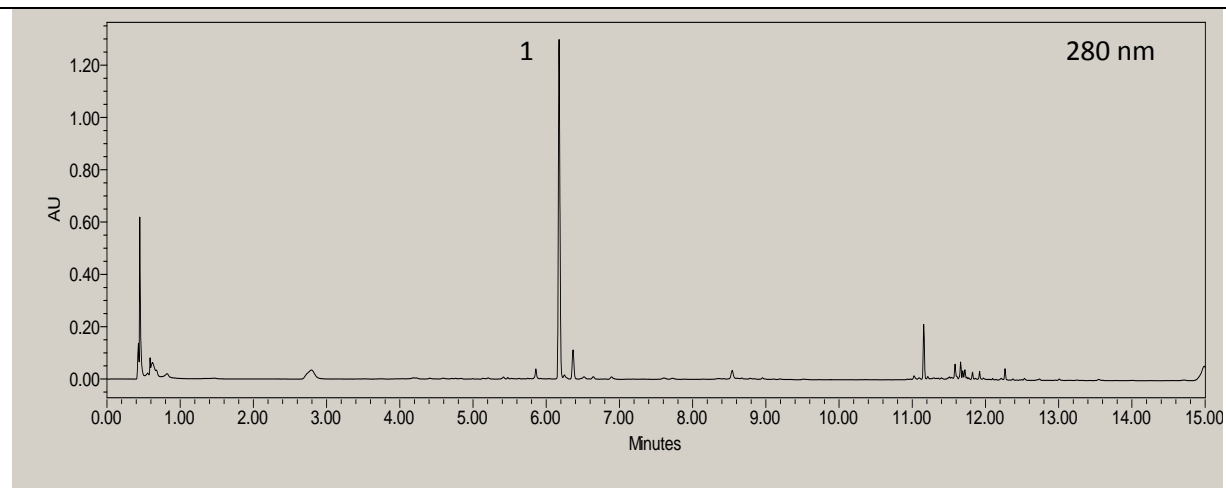


**Figure 27:** Chromatogramme de l'acide caféique (le composé majoritaire de *Coriandrum*

Dans la partie optimisation des conditions expérimentales d'extraction des composés phénoliques à partir de cette variété, la réponse à étudier sera la surface du pic de l'acide caféique.

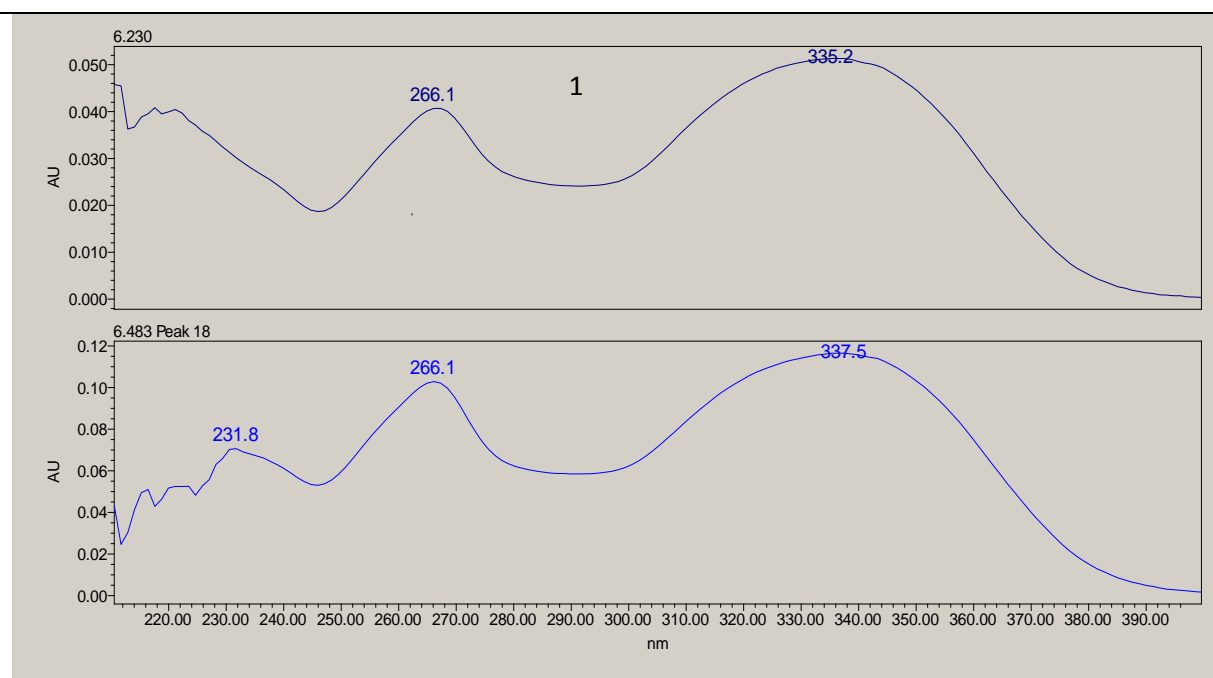
## 2.2. Identification des composés phénolique de *Apium graveolens* L.

Par comparaison des temps de rétention ainsi que des chromatogrammes des composés phénoliques de *Apium graveolens* L. détectés par l'UPLC et UPLC/SM avec les temps de rétentions et chromatogrammes des standards disponibles injectés dans les mêmes conditions que l'échantillon, nous avons pu identifier 4 composés, 2 acides phénoliques qui sont l'acide caféique et l'acide p-coumarique et deux flavonoïdes qui sont la lutéoline et son dérivé (lutéoline-7-glucoside) (**Fig 28.** et **Fig 29.**).



**Figure 28:** Chromatogramme de *de Apium graveolens L.* à 280 nm.

**1 :** La lutéoline : Le composé majoritaire de *Apium graveolens L.* étudié dans la partie optimisation.



**Figure 29:** Chromatogramme du composé majoritaire de *Apium graveolens L.* (*Lutéoline*) (**1**) comparé au chromatogramme du standard lutéoline

Comme le montre les **figures 28 et 29**, le composé majoritaire de *Apium graveolens L.* présente un temps de rétention de 6.23 min. Il s'avère que ce temps est très proche du temps

que met le pic de la lutéoline pour apparaître (6.48 min). En outre, le chromatogramme de ce composé majoritaire est caractérisé par une allure qui est similaire à celle du chromatogramme de la lutéoline. Par conséquent, le composé majoritaire de *Apium graveolens* L. étudié dans ce travail est identifié comme étant de la lutéoline.

En plus de la lutéoline et de son dérivé glucosidé, Yao and Yen (2011), ont également identifié l'Apigénine et le Kaempferol comme composés flavonoidiques. Le composé majoritaire dans leur étude était l'apigénine. En plus de l'acide caféique et de l'acide p-coumarique, ils ont identifié un autre acide phénolique qui est l'acide férulique.

Dans la partie optimisation des conditions expérimentales d'extraction des composés phénoliques à partir de *Apium graveolens* L., la réponse à étudier sera la surface du pic de la lutéoline d'une part et la somme des surfaces des 4 pics identifiés d'une autre part.

### **3. Optimisation des conditions expérimentales d'extraction des composés phénoliques**

#### **3.1. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par ultrasons : application à *Coriandrum sativum* L.**

La réponse (la variable) considérée dans cette partie est la surface du pic étant identifié comme l'acide caféique. L'optimisation du processus d'extraction a été réalisée par le plan de Box Behnken à 15 expériences avec 3 répétitions au point central. Trois facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction de l'acide caféique à partir de la partie végétative de *Coriandrum sativum* L.

Les facteurs choisis dans la présente étude sont : le méthanol (% dans l'eau) ( $X_1$ ), température d'extraction ( $^{\circ}$  C) ( $X_2$ ) et le rapport liquide/solide ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ( $X_3$ ) (**Tab. 7**).

**Tableau 7** : Les variables indépendantes et leurs niveaux

Variables indépendantes	Unités	Symboles	Code du niveau		
			-1	0	1
Méthanol %	(%)	X <sub>1</sub>	50	75	100
Température	(°C)	X <sub>2</sub>	10	40	70
Rapport L/S	(mL·g <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub>	5	7.5	10

Les résultats obtenus ont été exploités pour obtenir un modèle mathématique représenté par l'équation suivante :  $Y = 12880 + 500 X_1 - 11 X_2 + 1833 X_3 - 5.97 X_1^2 + 2.02 X_2^2 - 247 X_3^2 - 1.06 X_1X_2 + 36.8 X_1X_3 - 9.3 X_2X_3$ .

Avec ce modèle, le calcul de toutes les réponses dans le domaine d'étude sera possible. Il suffit d'attribuer des valeurs aux niveaux X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> et X<sub>3</sub> pour obtenir immédiatement la teneur en composés phénoliques totaux.

La surface du pic considéré varie entre 19821.3 (μv\*sec) et 36889.7 (μv\*sec) (**Tab. 8**). Cette approche a été utilisée dans le but d'étudier l'effet de chaque facteur et de l'interaction entre les différents facteurs sur la somme des surfaces des quatre pics considérés.



**Tableau 8 :** Le plan d'expérience Box Benhken et les résultats obtenus pour *Coriandrum sativum* L.

Numéro	(X1) Méthanol (%)	(X2) Température (° C)	(X3) Rapport L/S (mL·g <sup>-1</sup> )	Surface expérimental es (µv*sec)	Surface prédites (µv*sec)	Erreur standard (%)
1	50(-1)	40(0)	10(+1)	33370.5	31955.8	4.3
2	50(-1)	70(+1)	7.5(0)	36889.7	37165.9	-0.7
3	100(+1)	40(0)	5(-1)	19821.3	21235.9	-6.9
4	100(+1)	40(0)	10(+1)	29546.6	28421.9	3.9
5	75(0)	10(-1)	5(-1)	33530.6	32392.2	3.5
6	75(0)	10(-1)	10(+1)	34979.8	36380.8	-3.9
7	50(-1)	40(0)	5(-1)	32833.2	33957.9	-3.4
8	75(0)	70(+1)	10(+1)	33958.5	35096.9	-3.3
9	75(0)	40(0)	7.5(0)	34846.4	34165.4	2.0
10	75(0)	70(+1)	5(-1)	35302.5	33901.6	4.0
11	100(+1)	70(+1)	7.5(0)	27464.7	27451.0	0.0
12	75(0)	40(0)	7.5(0)	35045.7	34165.4	2.5
13	75(0)	40(0)	7.5(0)	32604.2	34165.4	-4.7
14	50(-1)	10(-1)	7.5(0)	35452.5	35466.2	0.0
15	100(+1)	10(-1)	7.5(0)	29201.4	28925.2	1.0
					<b>Moyenne</b>	<b>-0.11</b>

### 3.1.1. Validation du modèle

Dans les plans d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence. Dans la présente étude, la valeur de  $R^2$  est de 0.9359, ce qui signifie que le modèle peut expliquer 93 % des variations. Et cela confirme la haute signification du modèle.

Une analyse de la variance a été réalisée sur les résultats obtenus avec le logiciel Minitab 17. Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 9**. Une variable ou l'interaction entre deux variables présente un effet significatif lorsque la valeur de signification  $p < 0.05$ .

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que ce modèle est très significatif ( $P < 0.005$ ) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ( $P > 0.05$ ), ce qui confirme bien que le modèle est satisfaisant (**Tab. 9**).

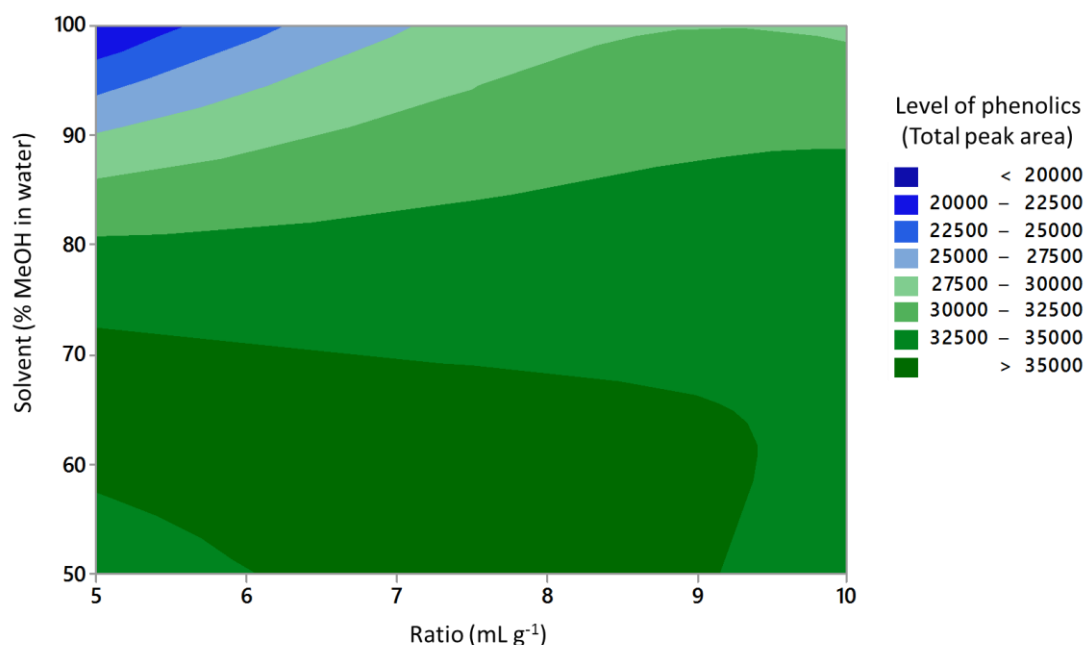
**Tableau 9:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Source	Model	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	Lack-of-Fit	R <sup>2</sup>
<b>P-value</b>	0	0.002	0.934	0.103	0.011	0.116	0.168	0.427	0.054	0.481	0.308	<b>0.9359</b>

Les résultats du **Tableau 9** révèlent l'effet linéaire positif du méthanol % qui s'avère d'une grande influence sur la surface des pics. Il convient de noter aussi un effet quadratique significatif du méthanol % ( $p < 0.05$ ). En effet plusieurs études ont montré l'importance de la concentration du solvant par rapport aux autres facteurs (Chan *et al.*, 2009; Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005; Uma *et al.*, 2010; Yap *et al.*, 2009)

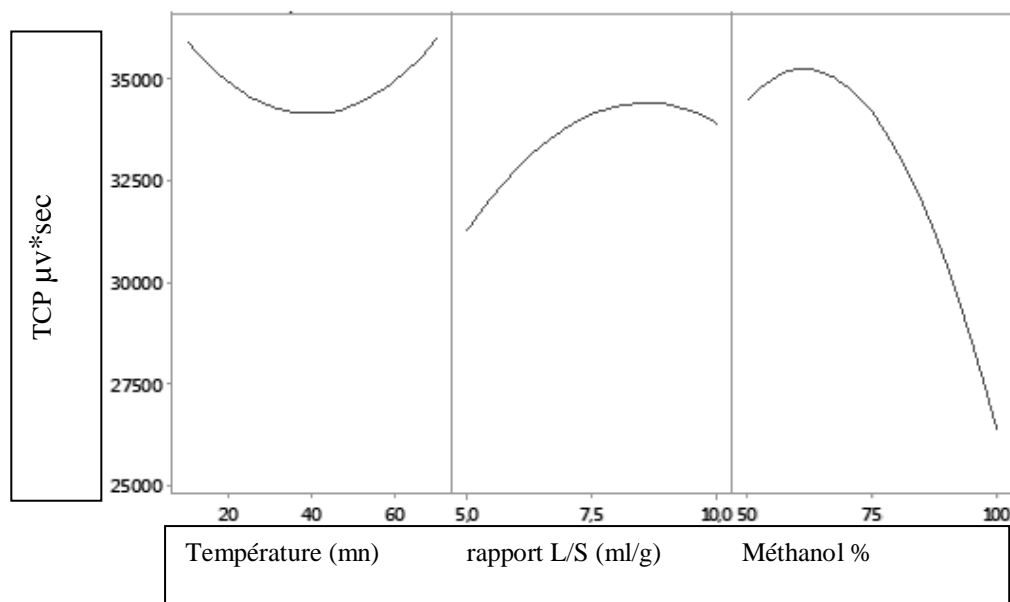
D'après le **Tableau 9**, la température, le rapport liquide/solide, toutes les autres interactions ainsi que les autres effets quadratiques n'ont pas d'effets significatifs sur le rendement en composés phénoliques. Ces résultats rejoignent ceux de Alberti et son équipe (2014). Par contre, ils sont contradictoires avec les résultats de l'étude réalisée par Feng *et al.* (2015) et Kala *et al.* (2016).

L'effet des trois paramètres est présenté par la **Figure 30** et la **Figure 31**. Elles montrent que les meilleurs rendements sont obtenus dans la région du méthanol % allant de 58 à 72 %. Au-delà de 72 %, une baisse du rendement a été constatée.



**Figure 30** : Variation du rendement en acide caféique de *Coriandrum sativum* L. en fonction du méthanol % et le rapport liquide/solide.

Selon Spigno *et al.* (2007), les mélanges alcool-eau distillée donne une meilleure efficacité d'extraction des composés phénoliques comparativement aux systèmes à solvant unique. En augmentant la proportion de l'eau distillée à l'alcool, la polarité du solvant augmente, ainsi le système de solvants sera capable d'extraire les composés phénoliques à haute polarité et ceux à polarité basse et également ceux à polarité moyenne (Zhang *et al.*, 2007). En outre, l'ajout de l'eau au solvant organique permet le gonflement du matériel végétal et facilite ainsi la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice cellulaire.



**Figure 31** : Effet des conditions expérimentales sur le rendement en acide caféique de *Coriandrum sativum* L.

### 3.1.2. Optimisation de la réponse et validation du modèle

Cette étude montre que le modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales qui ont assuré l'extraction du maximum de l'acide caféique à partir de la partie végétative de *Coriandrum sativum* L. n'appartiennent pas au domaine expérimental (**Tab. 10**).

**Tableau 10**: Les conditions expérimentales optimales d'extraction de l'acide caféique de *Coriandrum sativum* L.

Variables	Valeurs critiques
Méthanol (%)	55
Température (°C)	70
Rapport liquide/solide	6.67

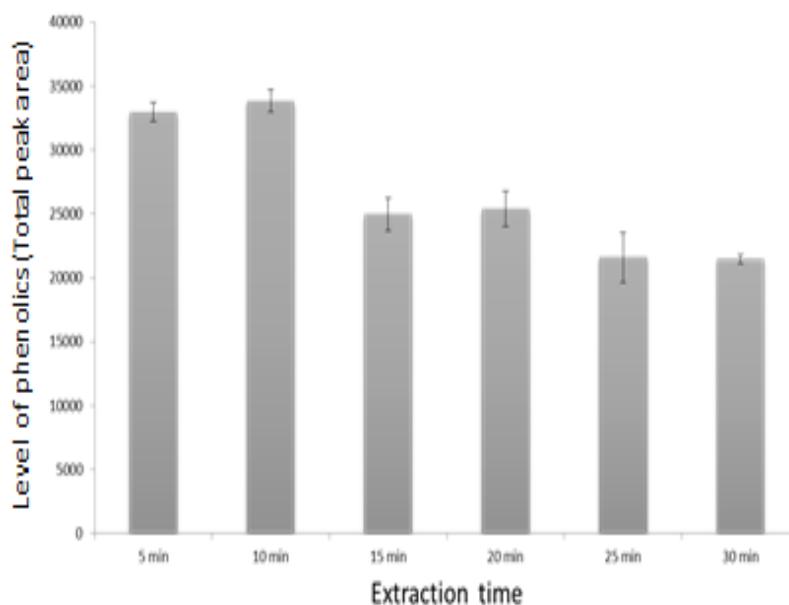
La vérification du modèle au point optimum a été réalisée par confrontation nouvelle avec l'expérimentation. Le modèle développé prédit un rendement en composés phénoliques [Surface des pics = 37790 (μV\*sec)] vérifié expérimentalement avec une variabilité inférieure à 5 % (**Tab. 11**).

**Tableau 11** : Les valeurs prédites et expérimentales du rendement en acide caféique sous les conditions optimales

Valeur prédite	Valeur expérimentale
37790 ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ ) $\pm$ 2124.31	37599.67 ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ ) $\pm$ 2376.61

### 3.1.3. La cinétique d'extraction

Une méthode d'extraction doit conduire à l'extraction d'un maximum de composés phénoliques et le temps nécessaire pour l'extraction de la quantité suffisante de composés phénoliques doit être déterminé. Les résultats de l'étude de la cinétique d'extraction sont présentés dans la **Figure 32**.



**Figure 32:** Cinétique d'extraction de l'acide caféique de *Coriandrum sativum* L.

Il apparaît que les meilleurs rendements sont enregistrés pour la durée d'extraction qui varie entre 5 et 10 mn. Le maximum en rendement est atteint après 10 minutes d'extraction. Cela s'explique par la continuité du phénomène de transfert des composés phénoliques de la matrice cellulaire jusqu'au solvant d'extraction, qui ne s'achève qu'après 10 minutes d'extraction. Au-delà de 10 minutes, le rendement en composés phénoliques tend à diminuer. Ceci pourrait être dû à la dégradation thermique des composés phénoliques qui survient lorsque de longues durées d'extraction sont utilisées avec des températures élevées.

### 3.1.4. Validation de la méthode

La méthode développée dans cette étude est validée par la détermination de la répétabilité, la reproductibilité et la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont de l'ordre de 2.41 % pour la répétabilité, 5.39 % pour la reproductibilité et 1.3 % pour la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont dans les normes acceptées ( $\pm 10\%$ ). Ce qui signifie que la méthode est validée.

### 3.1.5. Application de la méthode développée

Après la validation de la méthode, nous l'avons appliquée pour l'extraction des composés phénoliques à partir de trois échantillons différents de coriandre. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12:** Quantification des composés phénoliques de trois échantillons différents de *Coriandrum sativum* L. extraits sous les conditions optimales

	Acide caféique	Quercetin-3-O-glucoside	Quercetin-3-O-glucuronide	Quercetin-3-O-rutinoside
<b>Echant 1</b>	3927.4 $\pm$ 208.2	276.2 $\pm$ 6.6	3077.6 $\pm$ 73.9	406.1 $\pm$ 13.0
<b>Echant 2</b>	2879.2 $\pm$ 138.2	183.3 $\pm$ 5.7	2134.0 $\pm$ 130.2	335.8 $\pm$ 13.8
<b>Echant 3</b>	4261.2 $\pm$ 136.4	89.7 $\pm$ 1.3	3782.1 $\pm$ 39.7	340.2 $\pm$ 17.4

Nous pouvons constater à partir du **tableau 12** que l'acide caféique constitue le composé majoritaire suivi de quercetine-3-O-glucuronide, quercetine-3-O-rutinoside et de la quercetine-3-O-glucoside.

### 3.2. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par ultrasons : application à la lutéoline d'*Apium graveolens* L.

La réponse considérée est la surface du pic qui représente le composé majoritaire du profil en composés phénoliques d'*Apium graveolens* L. Il a été identifié comme étant la lutéoline. La surface du pic reflète la teneur en ce composé considéré.

L'optimisation du processus d'extraction a été réalisée par le plan de Box Behnken à 15 expériences avec 3 répétitions au point central. Trois facteurs (X1, X2, X3) à trois niveaux (-

1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction de la lutéoline à partir de la partie végétative d'*Apium graveolens* L.

Les facteurs choisis dans la présente étude sont : température d'extraction (°C) ( $X_1$ ), le rapport liquide/solide ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ( $X_2$ ) et le méthanol % (% dans l'eau) ( $X_3$ ) (**Tab. 13**).

**Tableau 13** : Les variables indépendantes et leurs niveaux

Variables indépendantes	Unités	Symbole	Niveau codé		
			-1	0	1
Température	(°C)	$X_2$	10	40	70
Rapport L/S	( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$X_3$	5	7.5	10
Méthanol %	(%)	$X_1$	50	75	100

Les résultats obtenus ont été exploités et nous ont permis l'obtention du modèle mathématique représenté par l'équation suivante :  $Y = - 4109 + 708 X_1 + 3618 X_2 - 684 X_3 - 9,2 X_1^2 - 292 X_2^2 + 8,0 X_3^2 - 31 X_1X_2 + 10,3 X_1X_3 + 34 X_2X_3$ .

En attribuant des valeurs aux X il sera possible d'obtenir immédiatement la teneur en polyphénols totaux avec ce présent modèle.

La surface du pic étudié varie entre 13107 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) et 107464 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) en fonction des conditions expérimentales **Tableau 14**. Cette approche a été utilisée dans le but d'étudier l'effet de chaque facteur et de l'interaction entre les différents facteurs sur le rendement en lutéoline.

**Tableau 14** : Le plan d'expérience Box Benhken et les résultats obtenus pour la Lutéoline d'*Apium graveolens* L.

Numéro	Température (°C)	Rapport L/S (mL·g <sup>-1</sup> )	pourcentage de méthanol (%)	Rendement (µv*sec)
1	40	7,5	75	54777
2	10	7,5	50	28082
3	70	7,5	100	90718
4	70	5	75	75718
5	40	10	100	107464
6	40	5	100	83410
7	70	7,5	50	30835
8	10	7,5	100	57201
9	10	10	75	18687
10	40	5	50	13107
11	70	10	75	56946
12	40	7,5	75	44291
13	40	10	50	28566
14	10	5	75	28068
15	40	7,5	75	65720

### 3.2.1.1. Validation du modèle

La valeur de  $R^2$  de ce modèle est de l'ordre de 0.86, ce qui confirme l'existence d'une très bonne et significative corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. De plus, cela signifie que le modèle peut expliquer 86 % des variations, ceci confirme la haute signification du modèle.

Les résultats de l'analyse de la variance réalisée sur les données de l'expérimentation, sont présentés dans le **Tableau 15**. Une variable ou l'interaction entre deux variable présente un effet significatif lorsque la valeur de signification  $p < 0.05$ .

L'analyse de la variance de la régression du modèle montre que le model est très significatif ( $P < 0.05$ ) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ( $P > 0.05$ ) ce qui confirme que le modèle est satisfaisant (**Tab. 15**).

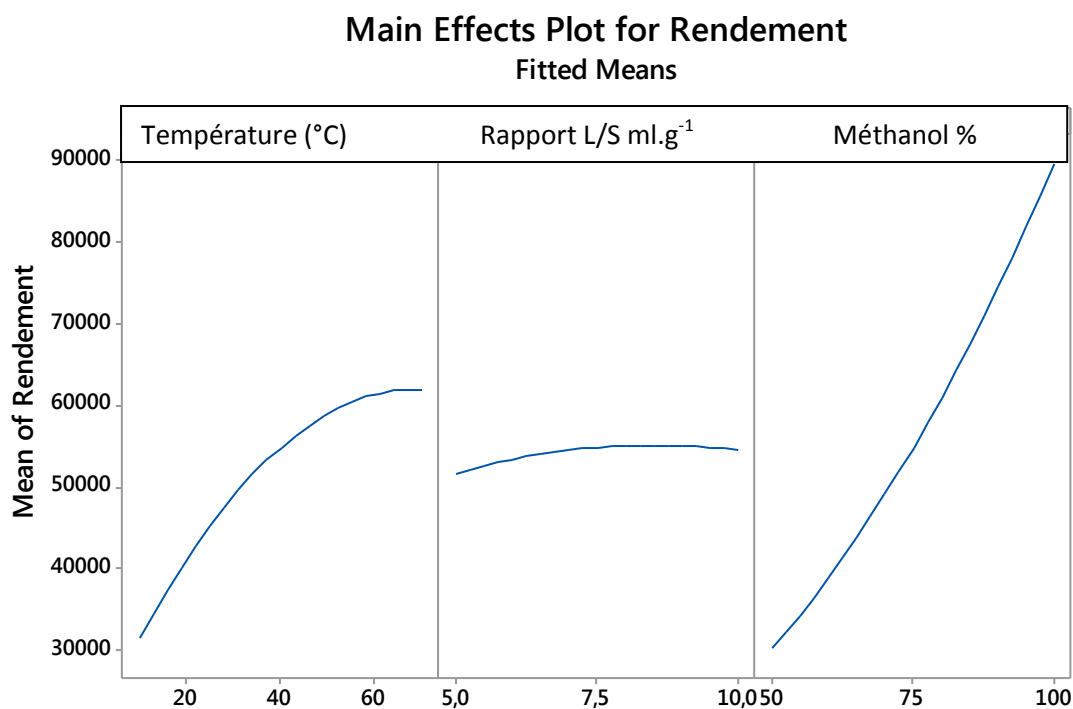


**Tableau 15:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Source	P-value
<b>Model</b>	0.017
<b>X<sub>1</sub></b>	0.058
<b>X<sub>2</sub></b>	0.829
<b>X<sub>3</sub></b>	0.005
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0.411
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0.851
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0.608
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>2</sub></b>	0.828
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.801
<b>X<sub>2</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.421
<b>Lack-of-Fit</b>	0.212
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.8604</b>

Comme le montrent les résultats, seule la concentration de méthanol a un effet linéaire significatif avec une *p*-value inférieure à 0.05. Tous les effets d'interactions et les effets quadratiques sont d'un effet négligeable sur le rendement en Luteoline.

La variation du rendement en composés phénolique en fonction des 3 facteurs étudiés est présentée dans la **Figure 33**. Nous constatons une augmentation du rendement en lutéoline avec l'augmentation de la concentration de méthanol



**Figure 33** : Effets des conditions expérimentales sur le rendement en Lutéoline extraite à partir d'*Apium graveolens* L.

D'une autre part, nous constatons une augmentation ralentie du rendement en Lutéoline simultanément avec l'augmentation de la température. Ceci peut être justifié par l'importance de la température dans l'amélioration de la solubilité des composés phénoliques et, par conséquent, rendre leur extraction plus facile.

### 3.2.1.2. Optimisation de la réponse et validation du modèle

La combinaison des conditions expérimentales qui assure un rendement meilleur en Lutéoline est présentée dans le **tableau 16**.

**Tableau 16** : Conditions expérimentales optimales pour maximiser le rendement en Lutéoline extraite à partir d'*Apium graveolens* L.

Variables	Valeurs critiques
Concentration de méthanol (%)	100
Température (°C)	70
Rapport liquide/solide (mL.g <sup>-1</sup> )	8.33

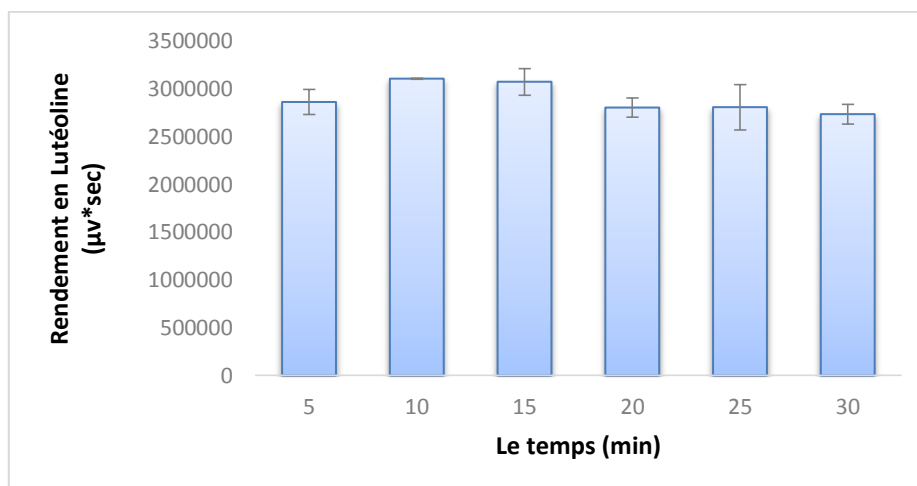
La vérification du modèle au point optimum a été réalisée par l'extraction des composés phénoliques dans les conditions optimales prédéfinies. Le modèle développé prédit un rendement en Lutéoline avec une surface correspondant à 104652 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ), vérifié expérimentalement avec une variabilité de l'ordre de 4.67 % inférieure à 5 % (**Tab. 17**).

**Tableau 17** : Valeurs prédites et expérimentales du rendement en Lutéoline *d'Apium graveolens* L. extraite dans les conditions optimales

Valeur prédite	Valeur expérimentale
104652 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) $\pm$ 15764	99872,44 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) $\pm$ 8718,58

### 3.2.1.3. La cinétique d'extraction

Les résultats de l'étude de la cinétique d'extraction de la lutéoline sont présentés dans la **Figure 34**.



**Figure 34** : La cinétique d'extraction de la Lutéoline à partir des échantillons *d'Apium graveolens* L.

A partir de la figure, nous pouvons constater que le rendement en Lutéoline augmente légèrement avec l'augmentation de la durée d'extraction. Le meilleur rendement est enregistré dans l'intervalle de temps allant de 10 à 15 minutes. Au-delà de 15 minutes, le rendement tend à baisser, probablement à cause de la dégradation thermique du composé étudié suite à son exposition à une température élevée (70° C) pendant de longues durées.

La différence entre le rendement obtenu après 10 minutes d'extraction et celui obtenu après 15 minutes n'est pas significative (< 5%) ; par conséquent, le temps idéal pour une extraction rentable et rapide est de 10 minutes.

#### **3.2.1.4. Validation de la méthode**

La méthode développée dans cette étude est validée par la détermination de la répétabilité, reproductibilité et la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont de l'ordre de 1.15% pour la répétabilité, 2.4 % pour la reproductibilité et 1.8 % pour la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont dans les normes acceptées ( $\pm 10\%$ ), ce qui signifie que la méthode est validée.

### **3.3. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par micro-ondes : application à *Apium graveolens* L.**

#### **3.3.1. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par micro-ondes : application aux composés identifiés chez *Apium graveolens* L.**

La réponse considérée est la somme des aires des composés phénoliques qui ont été identifiés par UPLC. Il s'agit de l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, luteoline ainsi que luteoline-7-glucoside.

L'optimisation du processus d'extraction a été réalisée par le plan de Box Benkhen à 27 expériences avec 3 répétitions au point central. Quatre facteurs (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>4</sub>) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction des composés phénoliques à partir de la partie végétative d'*Apium graveolens* L.

Les facteurs choisis dans la présente étude sont : le méthanol % (% dans l'eau) (X<sub>1</sub>), température d'extraction (°C) (X<sub>2</sub>), le temps d'extraction (mn) (X<sub>3</sub>) et le rapport liquide/solide (mL·g<sup>-1</sup>) (X<sub>4</sub>) (**Tab. 18**).

**Tableau 18:** Les variables indépendantes et leurs niveaux

Variables indépendantes	Unités	Symbole	Niveaux		
			s	-1	0
Méthanol %	(%)	X <sub>1</sub>	50	75	100
Température	(°C)	X <sub>2</sub>	10	40	70
Temps	(mn)	X <sub>3</sub>	10	12.5	15
Rapport L/S	(mL·g <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub>	5	7.5	10

Les résultats obtenus ont été exploités pour obtenir un modèle mathématique représenté par l'équation suivante :  $Y = 842954 - 96070 X_1 - 14000 X_2 + 243644 X_3 + 26420 X_4 + 5058 X_1^2 + 78,5 X_2^2 - 24400 X_3^2 - 116,1 X_4^2 + 154 X_1 X_2 - 5937 X_1 X_3 - 578 X_1 X_4 - 662 X_2 X_3 + 27,9 X_2 X_4 - 2245 X_3 X_4$

La somme des surfaces des quatre pics considérés varie entre 625372,8 (μv\*sec) et 889318,5 (μv\*sec) (**Tab. 19**). Cette approche a été utilisée dans le but d'étudier l'effet de chaque facteur et de l'interaction entre les différents facteurs sur la somme des surfaces des quatre pics considérés.

**Tableau 19** : Le plan d'expérience Box Benkhen et les résultats obtenus pour *Apium graveolens* L.

Numéro	Temps (min)	solvant (% MeOH)	Poids (g)	température (°C)	Valeurs prédites
1	10	75	1	65	869118,1
2	12,5	75	2	50	625372,8
3	12,5	75	1,5	65	775491,9
4	12,5	50	1	65	809555,3
5	10	75	1,5	50	687540,4
6	15	50	1,5	65	821376,0
7	10	75	1,5	80	826309,1
8	10	75	2	65	801506,1
9	12,5	100	1,5	80	837248,1
10	12,5	50	1,5	50	791247,7
11	12,5	50	2	65	729285,7
12	12,5	75	1	80	870362,5
13	12,5	100	1,5	50	782909,8
14	15	75	1,5	80	796243,6
15	10	100	1,5	65	847258,3
16	12,5	75	2	80	717947,9
17	12,5	100	2	65	775970,6
18	15	75	1	65	826008,8
19	10	50	1,5	65	864478,4
20	12,5	75	1,5	65	765980,5
21	12,5	75	1,5	65	760660,4
22	12,5	100	1	65	889318,5
23	15	100	1,5	65	842566,7
24	15	75	2	65	728710,5
25	12,5	75	1	50	710429,2
26	12,5	50	1,5	80	803694,0
27	15	75	1,5	50	744171,3

### 3.3.1.1. Validation du modèle

La valeur de  $R^2$  de ce modèle est de l'ordre de 0.89, ce qui confirme l'existence d'une très bonne et significative corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. De plus, cela signifie que le modèle peut expliquer 89 % des variations et cela confirme la haute signification du modèle.

Une analyse de la variance a été réalisée sur les résultats obtenus, avec le logiciel Minitab 17. (**Tab. 20**). Une variable ou l'interaction entre deux variables présente un effet significatif lorsque la valeur de signification  $p < 0.05$ . L'analyse de la variance de la régression

du modèle montre que le modèle est très significatif ( $P < 0.005$ ) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ( $P > 0.05$ ) ce qui confirme que le modèle est satisfaisant (**Tab. 20**).

**Tableau 20:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Source	P-value
<b>Model</b>	0.001
<b>X<sub>1</sub></b>	0.450
<b>X<sub>2</sub></b>	0.394
<b>X<sub>3</sub></b>	0.004
<b>X<sub>4</sub></b>	0.011
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0.004
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0.041
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0.667
<b>X<sub>4</sub><sup>2</sup></b>	0.083
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>2</sub></b>	0.713
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.776
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.410
<b>X<sub>2</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.751
<b>X<sub>2</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.622
<b>X<sub>3</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.521
<b>Lack-of-Fit</b>	0.058
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.89</b>

Il ressort des résultats du **tableau 20** que le rapport solide/liquide et la température ont un effet linéaire significatif avec une  $p$  value inférieure à 0.05. Ce résultat est contradictoire avec ce qui a été trouvé dans le cas de *Coriandrum sativum* L. Ça pourrait être expliqué par la différence du matériel végétal mais aussi de la méthode d'extraction adoptée.

L'effet quadratique du méthanol % et du temps d'extraction sont également significatifs. Cela reflète l'importance de ces deux facteurs dans l'extraction des composés phénoliques à partir d'*Apium graveolens* L.

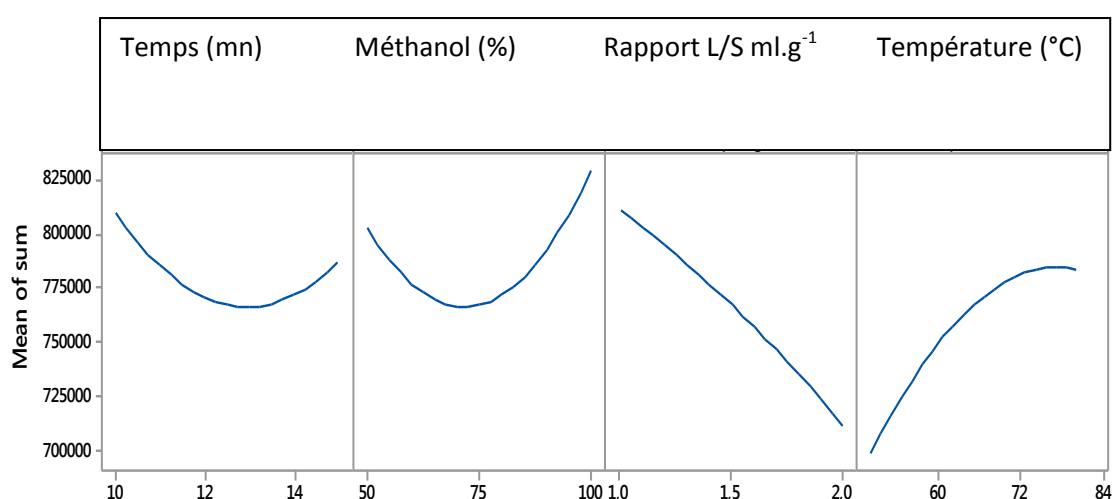
Toutes les interactions se sont avérées non significatives sur le rendement en composés phénoliques d'*Apium graveolens* L.

D'une manière générale, le solvant d'extraction est d'une grande influence sur le rendement en composés phénoliques. Dans le cas d'*Apium graveolens* L., le pourcentage du méthanol dans l'eau ne s'est pas manifesté hautement significatif, à cause de la variabilité de

la composition en composés phénoliques qui renferme des acides phénoliques et des flavonoïdes nécessitant des polarités différentes pour leur extraction.

La variation du rendement en composés phénolique en fonction des 4 facteurs étudiés est présentée dans la **figure 35**. Nous constatons :

- d'une part, une baisse du rendement en composés avec l'augmentation du poids de l'échantillon et cela peut être expliqué par la saturation du solvant d'extraction.
- d'une autre part, augmentation de ce rendement simultanément avec l'augmentation de la température.



**Figure 35** : Effets des conditions expérimentales étudiées sur le rendement des composés phénoliques d'*Apium graveolens* L.

D'après Galvan D'Alessandro (2013) et Larrauri *et al.*, (1997), l'augmentation de la température facilite l'extraction des composés phénolique par l'augmentation de la solubilité ainsi que la diffusivité des composés phénoliques dans solution d'extraction et de même diminue sa viscosité.

### 3.3.1.2. Optimisation de la réponse et validation du modèle

Cette étude montre que le modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié. Il apparait que les conditions expérimentales optimales qui ont assuré l'extraction du maximum de composés phénoliques à partir de la partie végétative de *Apium graveolens* L. n'appartiennent pas au domaine expérimental (**Tab. 21**).



**Tableau 21** : Les conditions expérimentales optimales pour maximiser le rendement en phénols totaux d'*Apium graveolens* L.

Variables	Valeurs critiques
Méthanol % (%)	100
Température (°C)	80
Temps	10
Rapport liquide/solide	10

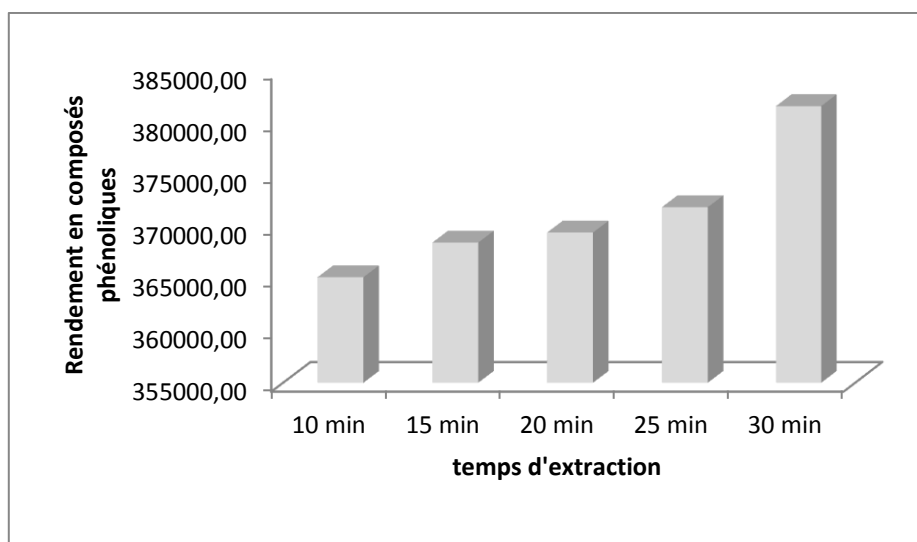
La vérification du modèle au point optimum a été réalisée par confrontation nouvelle avec l'expérimentation. Le modèle développé prédit un rendement en composés phénoliques [Surface des pics = 37790 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ )] vérifié expérimentalement avec une variabilité inférieure à 10 % (**Tab. 22**).

**Tableau 22** : les valeurs prédites et expérimentales du rendement en composés phénoliques totaux d'*Apium graveolens* L. dans les conditions optimales

Valeur prédite	Valeur expérimentale
972649 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) $\pm$ 48729	858451,44 ( $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$ ) $\pm$ 8718,58

### 3.3.1.3. La cinétique d'extraction

Les résultats de l'étude de la cinétique d'extraction sont représentés dans la **figure 36**.



**Figure 36:** La cinétique d'extraction des phénols totaux *d'Apium graveolens* L. par la méthode assistée par micro-ondes

La **figure 36** montre une augmentation du rendement en composés phénoliques avec l'augmentation du temps d'extraction. Un maximum de composés phénoliques a été extrait après 30 minutes. Cependant la différence entre le rendement obtenu après 10 minutes et celui obtenu après 30 minutes n'est pas significative ( $< 5\%$ ). Ainsi, une durée d'extraction de 10 minutes assure l'extraction de la quantité suffisante de composés phénoliques de plus, elle permet d'économiser l'énergie. A partir de là, nous optons pour une durée d'extraction de 10 minutes au lieu de 30 minutes.

#### 3.3.1.4. Validation de la méthode

La méthode développée dans cette étude est validée par la détermination de la répétabilité, la reproductibilité et la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont de l'ordre de 2.16% pour la répétabilité, 3.18 % pour la reproductibilité et 2.65 % pour la replicabilité. Les valeurs de l'erreur standard sont dans les normes acceptées ( $\pm 10\%$ ), ce qui signifie que la méthode est validée.

#### 3.3.2. Optimisation de l'extraction par la méthode assistée par micro-ondes : application à la lutéoline identifiés chez *Apium graveolens* L.

La réponse considérée est la surface du pic de la lutéoline qui représente le composé majoritaire du profil en composés phénoliques *d'Apium graveolens* L.

L'optimisation du processus d'extraction a été réalisée par le plan de Box Benken à 27 expériences avec 3 répétitions au point central. Quatre facteurs (X1, X2, X3 et X4) à trois niveaux (-1, 0 et +1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction des composés phénoliques à partir de la partie végétative d'*Apium graveolens* L. (Tab 23.).

**Tableau 23:** Les variables indépendantes et leurs niveaux

Variables indépendantes	Unités	Symbole	Niveaux		
			-1	0	1
Temps	(mn)	X <sub>1</sub>	10	12.5	15
Méthanol %	(%)	X <sub>2</sub>	50	75	100
Température	(°C)	X <sub>3</sub>	10	40	70
Rapport L/S	(mL·g <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub>	5	7.5	10

Les résultats obtenus ont été exploités pour obtenir un modèle mathématique représenté par l'équation suivante :  $Y = 1081711 - 80148 X_1 - 19520 X_2 + 178089 X_3 + 14242 X_4 + 3675 X_1^2 + 124,4 X_2^2 - 29742 X_3^2 - 39,9 X_4^2 + 93 X_1 X_2 - 219 X_1 X_3 - 336 X_2 X_3 - 485 X_1 X_4 + 15,4 X_2 X_4$  (°C) - 1866 X<sub>3</sub> X<sub>4</sub>

La surface du pic de la lutéoline varie entre 377345,87 (µv\*sec) et 631502 (µv\*sec) (Tab. 24). Cette approche a été utilisée dans le but d'étudier l'effet de chaque facteur et de l'interaction entre les différents facteurs sur la surface du pic de la lutéoline.

**Tableau 24:** Le plan d'expérience Box Benkhen et les résultats obtenus pour la lutéoline extraite à partir d' *Apium graveolens* L.

Numéro	Temps (min)	solvant (% MeOH)	Poids (g)	température (°C)	Valeurs expérimentales ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ )
1	10	75	1	65	566019,64
2	12,5	75	2	50	377345,87
3	12,5	75	1,5	65	494195,35
4	12,5	50	1	65	566573,65
5	10	75	1,5	50	433503,35
6	15	50	1,5	65	573813,65
7	10	75	1,5	80	574200,65
8	10	75	2	65	502583,00
9	12,5	100	1,5	80	593651,18
10	12,5	50	1,5	50	549854,86
11	12,5	50	2	65	510049,68
12	12,5	75	1	80	607831,07
13	12,5	100	1,5	50	557891,36
14	15	75	1,5	80	558015,14
15	10	100	1,5	65	606121,99
16	12,5	75	2	80	497947,39
17	12,5	100	2	65	550745,93
18	15	75	1	65	523430,23
19	10	50	1,5	65	603554,26
20	12,5	75	1,5	65	499624,92
21	12,5	75	1,5	65	492766,12
22	12,5	100	1	65	631502,00
23	15	100	1,5	65	599560,28
24	15	75	2	65	458898,78
25	12,5	75	1	50	431252,23
26	12,5	50	1,5	80	562576,91
27	15	75	1,5	50	467721,03

### 3.3.2.1. Validation du modèle

La valeur du coefficient de corrélation de ce modèle est de l'ordre de 0.946, ce qui confirme l'existence d'une très bonne et significative corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. Donc le modèle peut expliquer 94 % des variations, ceci confirme la haute signification du modèle.

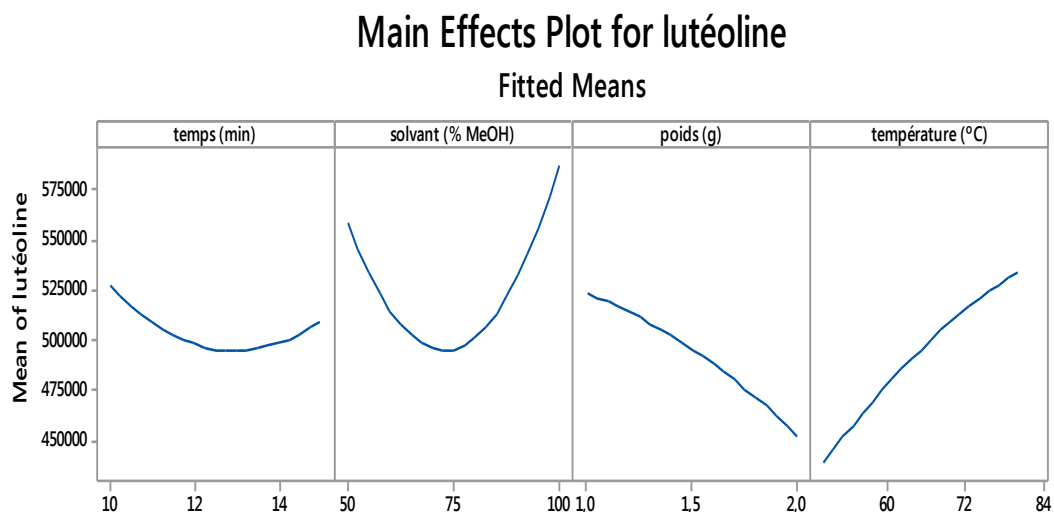
Les résultats de l'analyse de la variance réalisée sur les données de l'expérimentation, ont confirmé que le modèle est hautement significatif avec une valeur de  $p = 0.01 < 0.05$  (**Tab. 25**). Ce qui signifie que le modèle est adéquat pour la prédiction des valeurs.

**Tableau 25:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Source	P-value
<b>Model</b>	0.001
<b>X<sub>1</sub></b>	0.334
<b>X<sub>2</sub></b>	0.121
<b>X<sub>3</sub></b>	0.001
<b>X<sub>4</sub></b>	0.000
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	0.102
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	0.000
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	0.577
<b>X<sub>4</sub><sup>2</sup></b>	0.502
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>2</sub></b>	0.902
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.706
<b>X<sub>1</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.986
<b>X<sub>2</sub>*X<sub>3</sub></b>	0.417
<b>X<sub>2</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.693
<b>X<sub>3</sub>*X<sub>4</sub></b>	0.707
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.8958</b>

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats a bien mis en évidence un effet linéaire significatif de deux facteurs : la température et le rapport liquide/solide, et un effet quadratique significatif du méthanol % avec une  $p$ -value inférieure à 0.05. Tous les effets d'interactions et les autres effets quadratiques sont d'une influence négligeable sur le rendement en Lutéoline.

La variation du rendement en composés phénoliques en fonction des 4 facteurs étudiés est présentée dans la **Figure 37**. Nous constatons une augmentation du rendement en lutéoline avec l'augmentation de la température. Nous justifions cette augmentation par l'effet exercé par les températures élevées sur l'amélioration de la solubilité des composés phénoliques.

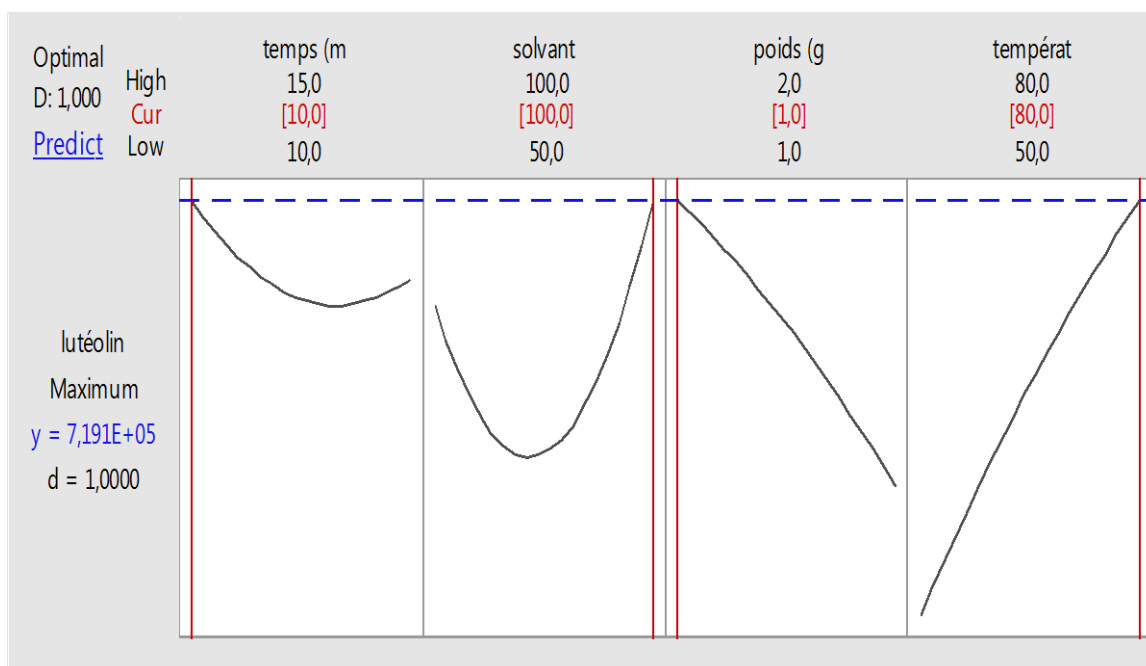


**Figure 37** : Effets des conditions expérimentales sur le rendement en Lutéoline extraite à partir d'*Apium graveolens* L. par micro-ondes

Nous constatons également la diminution du rendement en lutéolines avec l'augmentation du poids de l'échantillon (diminution du rapport liquide/solide). Cela s'explique par la saturation du solvant d'extraction.

### 3.3.2.2. Optimisation de la réponse et vérification du modèle

La combinaison des conditions expérimentales qui assure un rendement meilleur en Lutéoline est illustrée par la **figure 38**.



**Figure 38 :** Les conditions optimales pour maximiser le rendement en Lutéoline extraite à partir de *Apium graveolens* L.

Le meilleur rendement de la lutéoline est assuré par extraction de 1g d'échantillon dans 10 ml du méthanol pur (100%) pendant 10 min à une température de 80 °C.

La vérification du modèle a été effectuée par la comparaison des valeurs expérimentales avec les valeurs prédites par le modèle polynomial (**Tab 26.**).

**Tableau 26** : Valeurs prédites et expérimentales du rendement en Lutéoline *d'Apium graveolens* L. extraite par micro-onde

Valeurs expérimentales ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ )	Valeurs prédites ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ )	Erreur standard
566019	555255	2
377345	409296	8
494195	495529	0
566573	581147	3
433503	457571	5
573813	567350	1
574200	578882	1
502583	484296	4
593651	632559	6
549854	507608	8
510049	521756	2
607831	576911	5
557891	524931	6
558015	536256	4
606121	613616	1
497947	477416	4
550745	538482	2
523430	538378	3
603554	596364	1
499624	495529	1
492766	495529	1
631502	622104	1
599560	607781	1
458898	466324	2
431252	452814	5
562576	592198	5
467721	465349	1

Selon le **tableau 26**, la variabilité entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites est satisfaisante et ne dépasse pas 5 % sauf dans trois cas. Nous pouvons conclure que le modèle est efficace pour prédire les valeurs de la variable étudiée.



### 3.4. Comparaison des conditions optimales des 3 espèces étudiées

Dans le **tableau 27**, nous avons rassemblé les conditions optimales permettant de maximiser le rendement en composés phénoliques des trois espèces étudiées.

**Tableau 27** : Comparaison des conditions optimales d'extractions des composés phénoliques à partir des 3 espèces étudiées

	Méthanol (%)	Temps d'extraction (min)	Rapport liquide/solide	Température d'extraction (°C)	Méthode
<i>Cynara scolymus</i>	100	1h	10	ND	Macération
Acide caféique De <i>Coriandrum sativum</i>	55	10	6.67	70	Méthode assistée par ultrasons
Lutéoline D' <i>Apium graveolens</i>	100	10	8.33	70	Méthode assistée par ultrason
Phénols totaux d' <i>Apium graveolens</i>	100	10	10	80	Méthode assistée par Micro-ondes

ND : Non déterminée (température ambiante)

Il ressort du tableau que les températures élevées améliorent l'extraction des composés phénoliques lorsque le temps d'exposition à ces températures est court, cela afin d'éviter la dégradation des composés phénoliques.

Il est intéressant de remarquer que le méthanol % le plus adéquat pour meilleur rendement, varie selon le composé à extraire. Le méthanol % le plus approprié pour maximiser le rendement en acide caféique de *Coriandrum sativum* L. est de 55%. Ce dernier se caractérise par une polarité moyenne, ce qui explique la nécessité d'un solvant polaire (eau) pour améliorer sa solubilité et pouvoir l'extraire de la matrice cellulaire.

La Lutéoline représente le composé majoritaire d'*Apium graveolens* L. Son extraction a nécessité l'utilisation du méthanol pur parce que la Lutéoline est un flavonoïde de faible polarité et ne se solubilise que dans un solvant de faible polarité.

Il est utile de noter aussi que le méthanol % approprié pour maximiser le rendement en phénols totaux d'*Apium graveolens* L. ne diffère pas de celle nécessaire pour maximiser le rendement en lutéoline. C'est peut-être dû au fait que la lutéoline est le composé majoritaire

d'*Apium graveolens* L., et que pour optimiser le rendement en composés phénoliques, il faut passer par l'optimisation du rendement en composés majoritaires.

#### **4. Comparaison de la méthode assistée par ultrasons et la méthode assistée par micro-ondes dans l'extraction de la lutéoline à partir des échantillons d'*Apium graveolens* L.**

Par comparaison des rendements en lutéoline extraite par micro-ondes (**Tab. 24**) et les rendements obtenus par extraction aux ultrasons (**Tab. 26**), nous concluons que la méthode d'extraction assistée par micro-ondes est la plus efficace pour extraire un maximum de lutéoline. En effet, plusieurs auteurs ont démontré l'efficacité d'extraction par cette méthode par rapport aux méthodes classiques ou l'extraction assistée par ultrasons (Pan *et al.*, 2003 ; Gallo *et al.*, 2010 ; Ince *et al.*, 2013).

Lors de l'extraction par micro-ondes, les mélanges échantillons-solvants ont été introduits dans des tubes à extraction parfaitement fermés. De plus, le dispositif expérimental assure une extraction dans des conditions d'obscurité et à l'abri de l'air. Toutes ces conditions réunies empêchent la perte des composés phénoliques après leur extraction et s'opposent également à l'évaporation du solvant d'extraction.

En ce qui concerne la méthode d'extraction par ultrasons, les mélanges échantillons-solvants ont été exposés à l'air et à la lumière tout au long du processus d'extraction, parce que le dispositif ne permet pas de réaliser l'extraction dans des tubes fermés. Par conséquent, nous pouvons supposer qu'une perte des composés phénoliques par oxydation est survenue après leur extraction des matrices cellulaires. Sans compter le solvant qui s'évapore conduisant à une saturation du milieu extracellulaire par les composés phénoliques extraits.

D'un point de vue rapidité de l'extraction, la méthode assistée par micro-ondes semble être la meilleure. Il est possible de lancer à la fois l'extraction de 16 mélanges. Tandis que dans le cas de la méthode assistée par ultrasons, on est obligé d'effectuer les extractions une par une ce qui nécessite beaucoup de temps.

En conclusion, la méthode assistée par micro-ondes est la méthode la plus efficace aussi bien sur le plan rentabilité que le plan économique (économie du temps et du solvant).

## 5. Comparaison de la méthode de dosage des composés phénoliques par UV avec la méthode de Folin-Ciocalteu

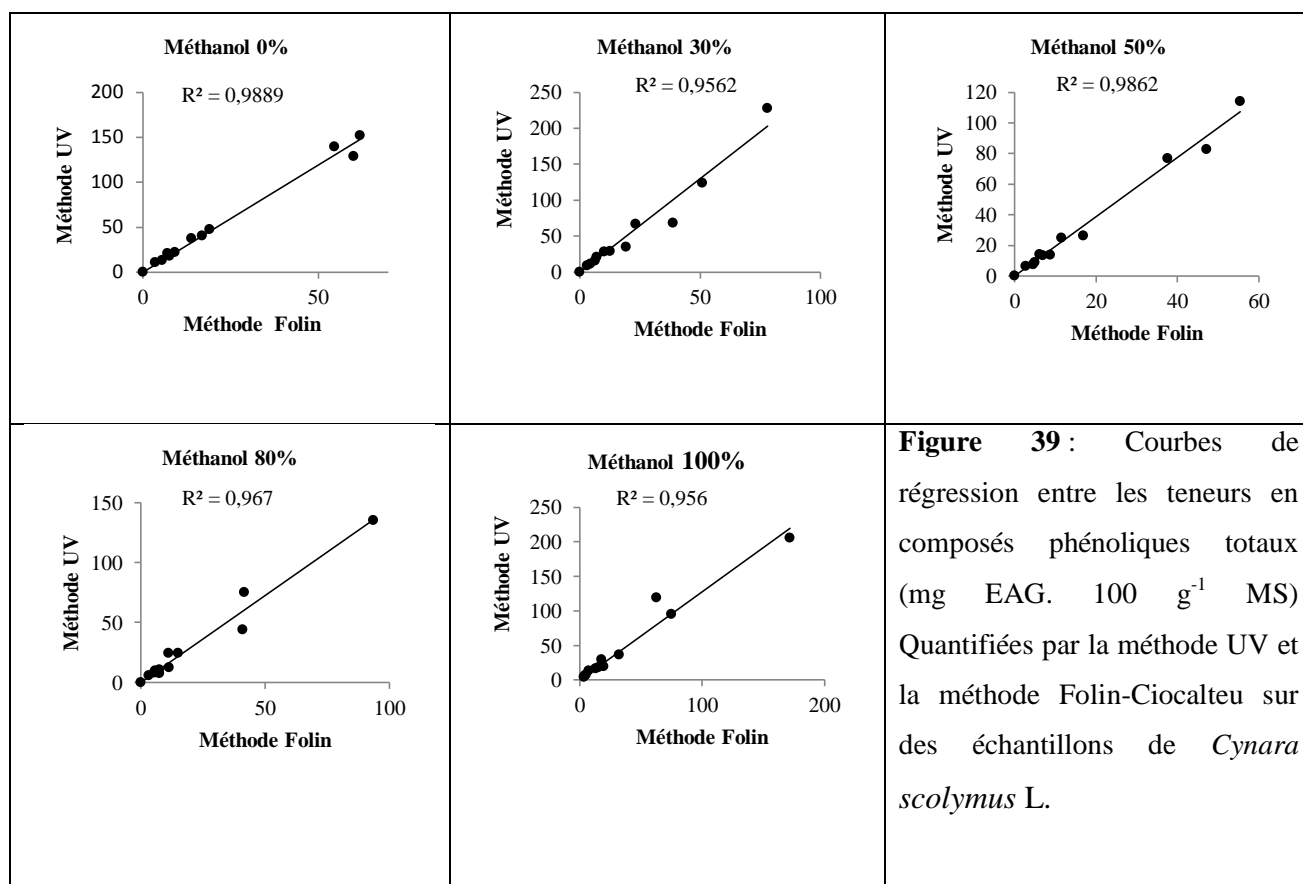
De nombreuses méthodes spectrophotométriques ont été mises en place pour la quantification des composés phénoliques (Naczka and Shahidi 2006). La méthode la plus répandue est la méthode de Folin-Ciocalteu, choisie pour sa simplicité et la disponibilité du réactif (Magalhaes *et al.*, 2010).

A cette méthode de Folin-Ciocalteu, s'ajoute une méthode rapide basée sur la lecture directe des absorbances des extraits en particulier les cycles aromatique à 280 nm (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000 ; Spigno *et al.*, 2007).

Nos résultats ont montré l'existence d'une corrélation entre les teneurs enregistrées par la méthode d'absorption directe à 280 nm et celles données par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette corrélation est significativement affectée par le méthanol % et le solvant d'extraction.

### 5.1. Application à l'artichaut (*Cynara scolymus* L.)

La corrélation entre les deux méthodes de dosage des composés phénoliques extraits à partir de l'artichaut est illustrée par la **figure 39**.



**Figure 39 :** Courbes de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g<sup>-1</sup> MS) Quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons de *Cynara scolymus* L.

Ce qui peut être intéressant à mentionner, ce sont les corrélations élevées enregistrées entre les teneurs en composés phénoliques déterminées par les deux méthodes.

Les coefficients de corrélation (R) calculés à partir du coefficient de détermination R<sup>2</sup> sont respectivement de l'ordre de (0,994, 0,978, 0,993, 0,983 et 0,977) pour les pourcentages de méthanol (0 %, 30 %, 50 %, 80 % et 100 %).

Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Yilmaz and Toledo (2006) et qui confirment l'existence d'une corrélation positive et significative entre les deux méthodes avec un coefficient de corrélation R de l'ordre de 0,94.

Les résultats du rapport UV/FC sont illustrés par le **tableau 28** et la **figure 40**. Nous avons constaté que la valeur de ce rapport est inversement proportionnelle à la concentration de méthanol, solvant d'extraction. Autrement dit, la valeur du rapport diminue avec l'augmentation de la concentration de méthanol et se rapproche de la valeur 1. Plus la valeur du rapport est proche de 1, plus les teneurs enregistrées par les deux méthodes sont proches.

**Tableau 28 :** Les valeurs du rapport UV/FC en fonction de la concentration de méthanol

Méthanol %	0	30	50	80	100
UV/FC	2,5	2,4	1,9	1,4	1,2

L'analyse de la variance a montré que le rapport UV/FC est significativement influencé par le méthanol % et le temps d'extraction (**Tab. 29**). Les résultats par rapport au pourcentage de méthanol sont en accord avec les données de la littérature.

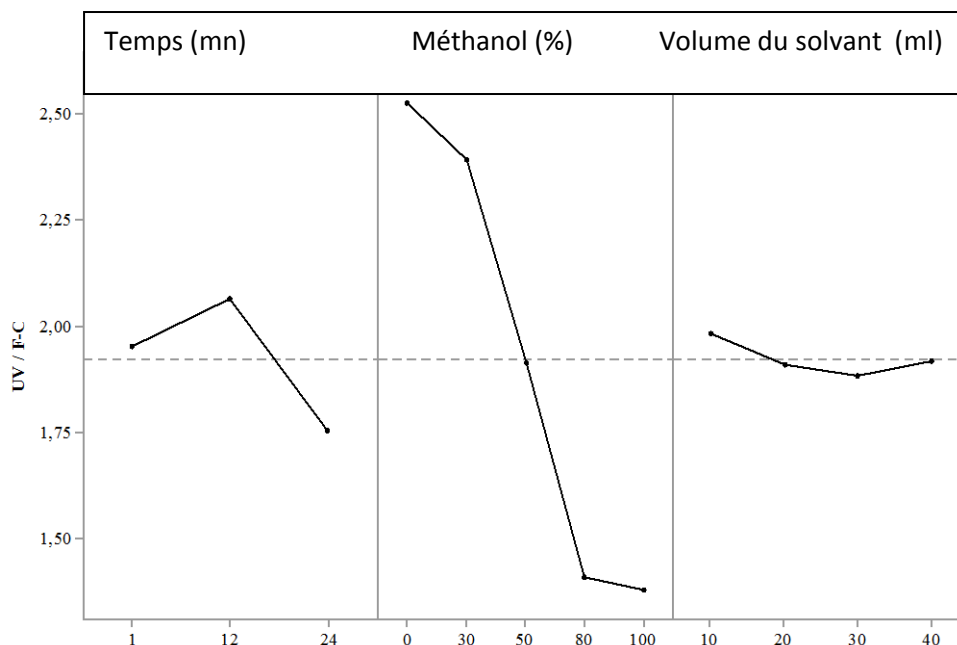
Il a été cité dans la littérature que l'absorption des composés phénoliques à 280 nm est affectée par la nature du solvant, le pH de la solution ainsi que les interférences qui peuvent avoir lieu par des substances ayant une forte absorption dans l'UV (280 nm) tels que les protéines, les acides aminés et les acides nucléiques (Naczak and Shahidi 2006). En effet, une diminution de la quantité d'eau présente dans le mélange du solvant permet de réduire la valeur enregistrée par la méthode UV. Cela peut être expliqué par l'extraction de moins de composés hydrosolubles comprenant les protéines et les acides aminés susceptibles d'absorber à 280 nm. En conséquence, les absorbances vont diminuer entraînant ainsi une baisse du rapport. Pour des concentrations de 80 % et 100 % méthanol le rapport varie entre 1.4 et 1.00, autrement dit les teneurs données par les deux méthodes deviennent presque égales.

**Tableau 29:** Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Source	F-Value	P-Value
Temps (h)	14.94	0,000*
Concentration methanol	106.93	0,000*
volume du Solvant	0.84	0.487
Temps*concentration de methanol	12.25	0,000*
temps *volume du solvant	0.74	0,622
Concentration de méthanol*volume du solvant	1.79	0.109
Erreur	N/D	N/D
Total	N/D	N/D

N/D: non déterminée ;  $R^2$  (coefficient de détermination) = 96.05%;

$R$  (coefficient corrélation) = 0.98



**Figure 40 :** Effets des conditions expérimentales sur le rapport UV/FC

Le **tableau 28** montre que la méthode UV surestime la teneur en composés phénoliques au vu du rapport UV/FC supérieur à 1.

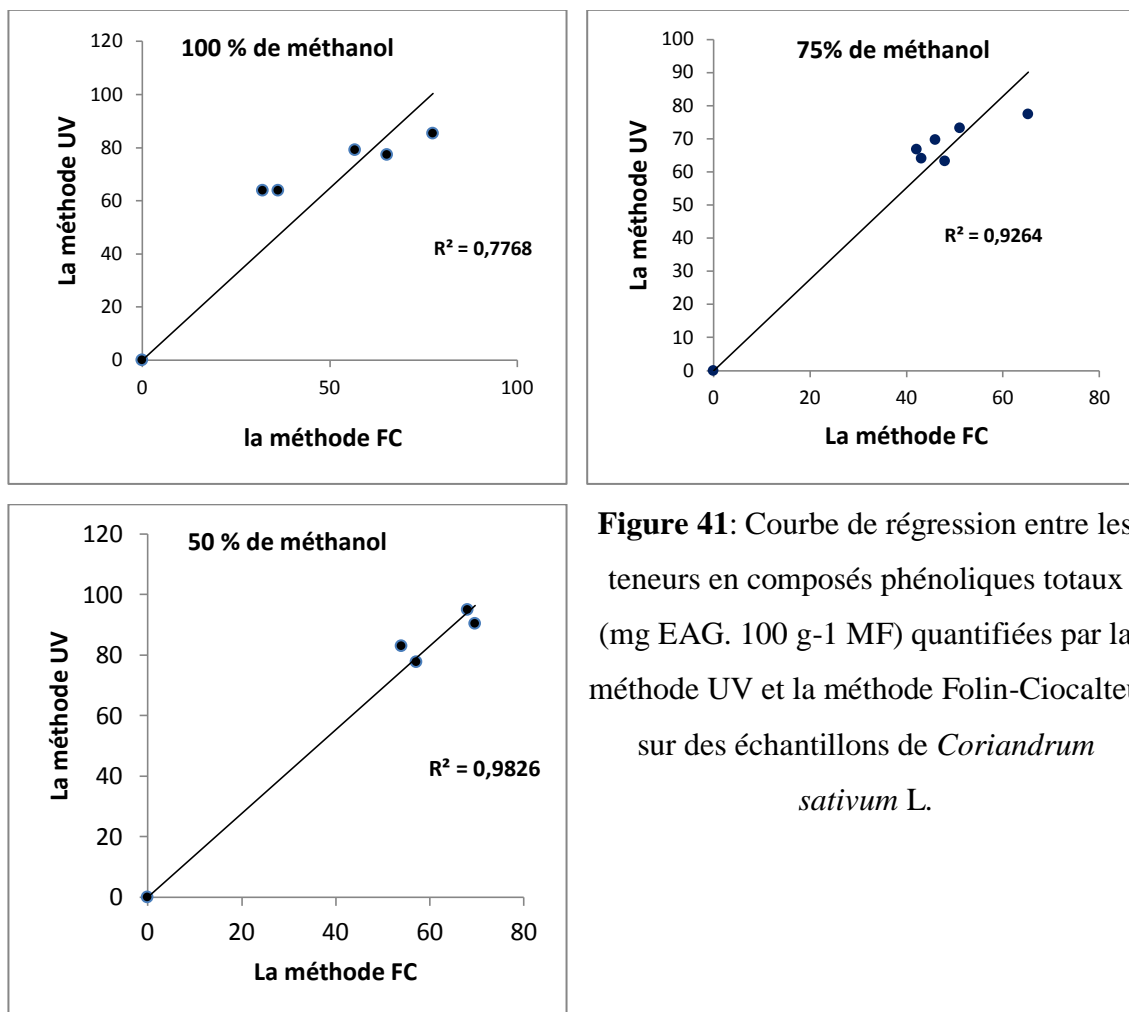
- En absence du méthanol (0 % méthanol) : quel que soit le temps d'extraction ou le volume considéré le rapport se rapproche du triple
- En présence du méthanol : nous avons constaté une diminution du rapport étudié proportionnellement avec la diminution de la concentration en eau et inversement avec la concentration de méthanol.

## 5.2. Application à la coriandre et au céleri (*Coriandrum sativum* L. et *Apium graveolens* L.)

Nous avons choisi ces deux herbes vue la facilité d'extraction de leurs composés phénoliques ainsi que leur appartenance à la même famille mais différente de celle de *Cynara scolymus* L., ce qui va nous permettre d'établir une comparaison et de donner plus de pertinence aux résultats.

### 5.2.1. Application à *Coriandrum sativum* L.

Comme pour *Cynara scolymus* L., nous avons étudié la correspondance entre les deux méthodes de dosage. Les résultats sont représentés par la **Figure 41**.



**Figure 41:** Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons de *Coriandrum sativum* L.

Selon la **figure 41**, les deux méthodes (UV et FC) de dosage sont positivement corrélées. Ceci est clairement vérifié par les coefficients de corrélation qui sont de l'ordre de (0.9201, 0.966 et 0.99) respectivement pour les pourcentages de méthanol suivants (100 %, 75 % et 50%).

Les résultats du rapport UV/FC sont donnés par le **tableau 30** et la **figure 42**. Il est à remarquer que les résultats donnés par la coriandre (*Coriandrum sativum* L.) sont pratiquement les mêmes que ceux donnés par l'artichaut malgré la différence de l'origine botanique des deux espèces.

Le rapport UV/FC présenté dans le **tableau 30** est supérieur à 1, ce qui indique que la méthode UV surestime toujours la teneur en composés phénolique tout comme pour le cas de l'artichaut. De plus, le rapport se rapproche d'avantage de la valeur 1 avec l'augmentation du pourcentage du méthanol et inversement avec la concentration en eau du solvant.

**Tableau 30** : Les valeurs du rapport UV/FC en fonction de la concentration de méthanol  
(*Coriandrum sativum* L.)

Méthanol (%)	50	75	100
UV/FC	1,3	1,3	1,2

Comme le nombre des pourcentages de méthanol étudiés n'est pas élevé, l'analyse de l'ANOVA (**Tab. 31**) a montré un effet négligeable de ce facteur sur la variation du rapport UV/FC, à l'inverse des échantillons de l'artichaut qui ont enregistré un effet hautement significatif de ce pourcentage sur le rapport UV/FC.

**Tableau 31**: Récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

Paramètres	Les valeurs <i>p</i>
poinds (g)	0,468
Températures (°C)	0,948
Méthanol (%)	0,691

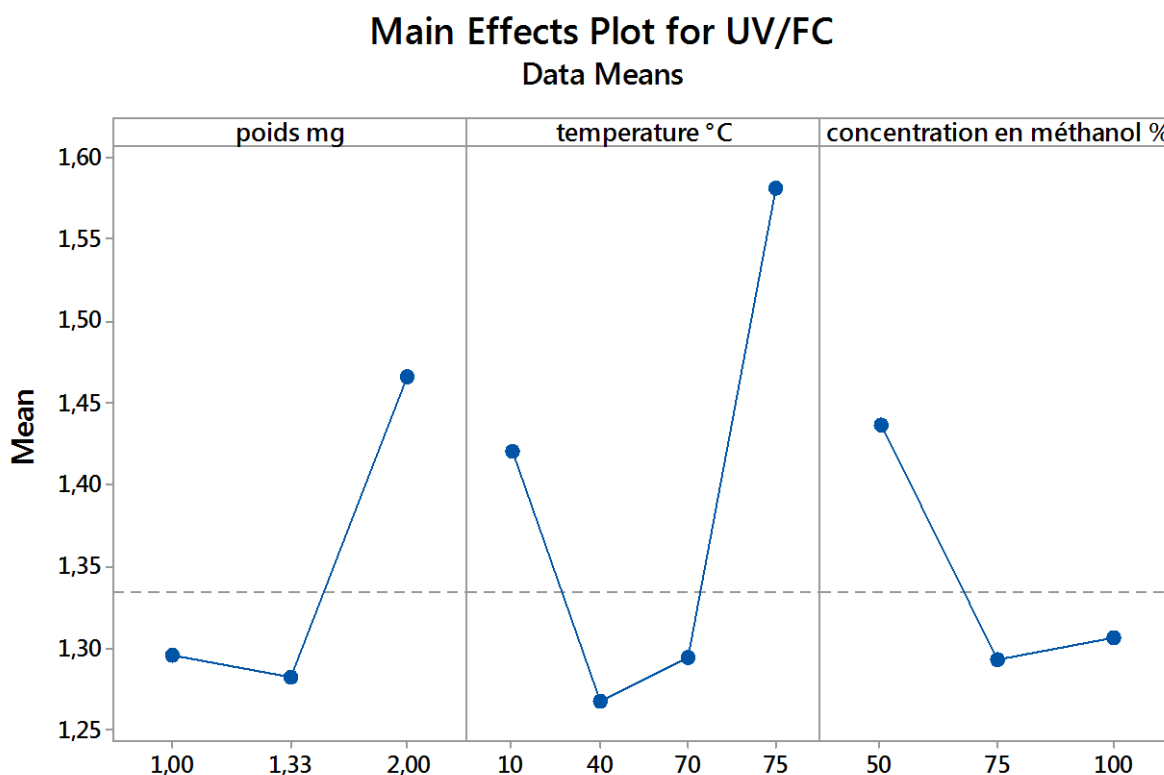
La température ainsi que le poids de la prise d'essai semblent n'avoir aucun effet significatif sur la variation du rapport UV/FC avec des valeurs de *p* très élevées (**Tab. 31**).

La variation du rapport UV/FC est représentée par la **Figure 42**. Nous pouvons clairement constater que la courbe des pourcentages de méthanol se caractérise par une même allure que celle de l'artichaut. La valeur du rapport a tendance à diminuer proportionnellement avec pourcentage de méthanol dans l'eau.

D'un autre côté, la courbe de la température se caractérise par une partie descendante, et la valeur du rapport semblant diminuer avec l'augmentation de la température pour atteindre une valeur très proche de 1 à une température de 40° C. Cela signifie que les deux méthodes estiment de la même façon la teneur en composés phénoliques.



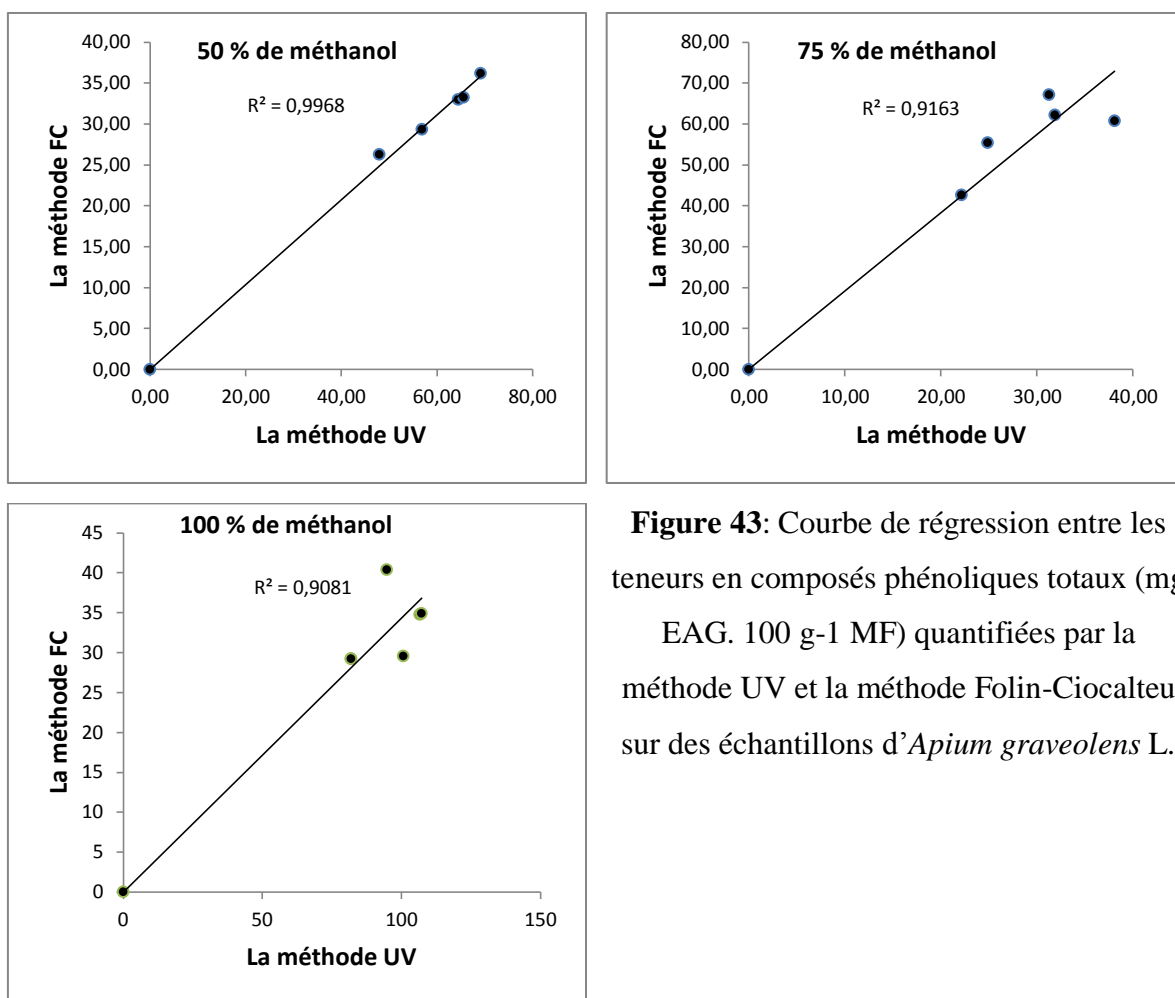
Pour des températures supérieures à 40° C, la valeur du rapport tend à augmenter. Cette augmentation indique que la méthode UV surestime davantage la teneur en composés phénoliques. Ce résultat peut être justifié par l'effet de la température qui favorise l'extraction des composés hydrosolubles. Ces composés absorbent fortement dans l'UV et faussent, par conséquent, l'estimation de la teneur en composés phénoliques.



**Figure 42** : Effets des conditions expérimentales sur le rapport UV/FC de la coriandre (*Coriandrum sativum* L.)

### 5.2.2. Application au céleri (*Apium graveolens* L.)

Les résultats de l'étude de la correspondance entre les deux méthodes analytiques : la méthode UV et la méthode conventionnelle FC appliquées au céleri sont regroupés dans la **figure 43**.



**Figure 43:** Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g-1 MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons d'*Apium graveolens* L.

Les valeurs des coefficients de corrélations calculés à partir des coefficients de détermination  $R^2$  sont de l'ordre de 0,998, 0,957 et 0,952 respectivement pour les pourcentages de méthanol dans l'eau de 50 %, 75% et 100 %.

Elles sont toutes des valeurs très proches de 1, ceci confirme la corrélation positive et significative entre les deux méthodes analytiques.

Ce résultat est en accord avec les résultats précédents sur l'artichaut et la coriandre, ainsi que les résultats de l'étude menée par (Yilmaz and Toledo 2006) sur les composés phénolique des grains du raisin.

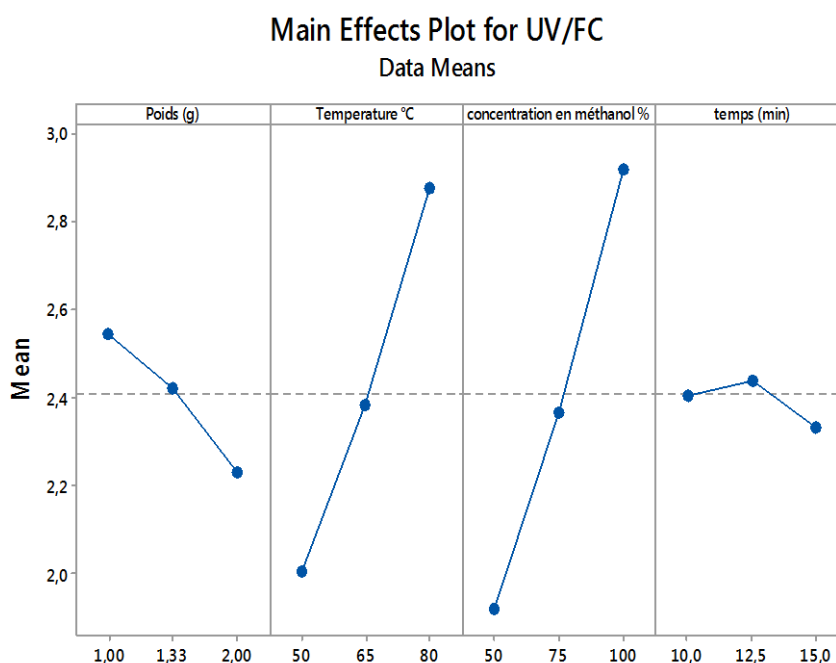
Quant au rapport UV/FC, les résultats sont regroupés dans le **Tableau 32**. En comparaison de ces résultats avec ceux de *Coriandrum Sativum* L. et *Cynara Scolymus* L., nous constatons que la méthode UV surestime toujours la teneur en composés phénoliques.

**Tableau 32** : Valeurs du rapport UV/FC selon la concentration de méthanol (*Apium graveolens* L.)

Méthanol (%)	50	75	100
UV/FC	1.9	2.4	2.9

Il est à noter, cependant, que les valeurs de ce rapport augmentent simultanément avec l'augmentation de la concentration de méthanol dans le solvant d'extraction,

La **figure 44** représente la variation du rapport UV/FC en fonction des 4 facteurs étudiés (le temps, la température, la concentration de méthanol ainsi que la poids de la prise d'essai).



**Figure 44** : Effets des condition experimentales sur le rapport UV/FC (*Apium graveolens* L.)

Nous constatons que le rapport augmente proportionnellement avec l'augmentation de du pourcentage du méthanol et de la température inversement à ce qui a été décrit précédemment pour *Coriandrum Sativum* L. qui est de la même famille botanique que *Apium graveolens* L. et pour *Cynara Scolymus* L. qui est botaniquement différent de *Apium graveolens* L.

Ce résultat nous mène à dire que le rapport UV/FC est indépendant de l'origine botanique de l'espèce considérée. Cependant, cette différence pourrait être expliquée par la composition de chaque espèce en protéines et acides aminés, en plus de la nature des composés phénoliques qui la caractérisent.

D'après Bonnaillie *et al.*, (2012), Les composés non phénoliques tels que les glucides et les protéines sont susceptibles de former avec les composés phénoliques des complexes colloïdaux non détectables par l'appareil de dosage.

En outre, certains composés phénoliques se trouvent liés à d'autres structures cellulaires telles que les sucres. Sous cette forme, les composés phénoliques deviennent plus solubles dans l'eau (Alberti *et al.*, 2014), c'est la raison principale qui fait que la présence de l'eau comme solvant polaire est indispensable pour augmenter le rendement d'extraction. Quoique la présence de l'eau soit importante, sa quantité doit être contrôlée pour éviter l'extraction des composés non phénoliques tels que les glucides et les protéines.

L'analyse de variance de l'effet des 4 conditions expérimentales étudiées (temps, température, concentration de méthanol, poids de la prise d'essai) sur le rapport UV/FC dont les résultats sont donnés dans le **Tableau 33**, indique un effet très hautement significatif ( $<0,01$ ) du pourcentage de méthanol.

Le pourcentage du méthanol semble être un facteur déterminant qui affecte significativement le rapport UV/FC. Ce résultat est en accord avec ceux de *Cynara scolymus* L. et des résultats rapportés par Yelmaz and Toledo (2006).

La température aussi semble avoir un effet significatif ( $<0,05$ ), contrairement au temps et au poids de la prise d'essai qui ont enregistrés des effets négligeables avec des valeurs de signification supérieures à 0.05

**Tableau 33:** Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse de la variance

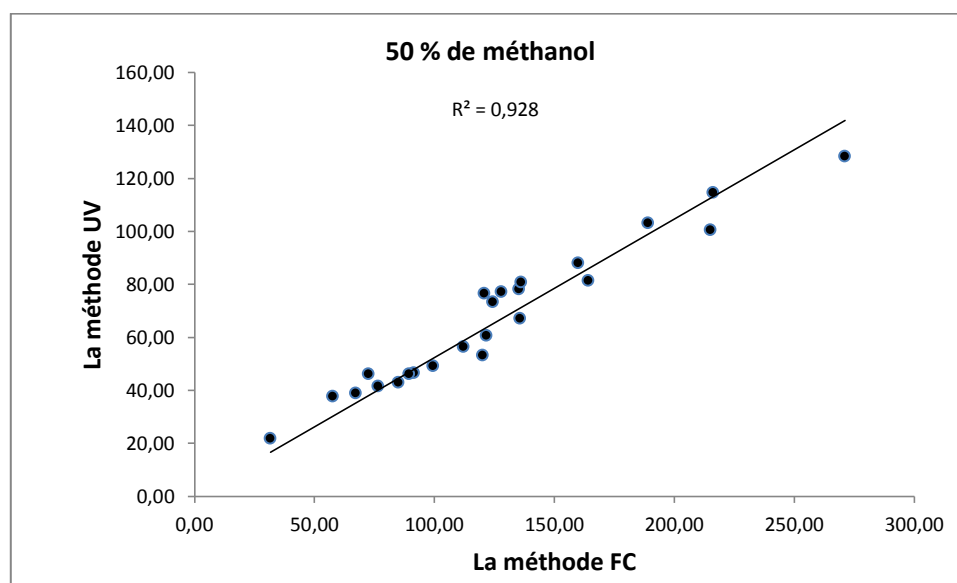
Paramètres	Les significations ( <i>p</i> )
Températures (°C)	0.022
Pourcentage de méthanol (%)	0.005
Poids (g)	0.321
Temps (mn)	0.779

### 5.3. Application au raisin (*Vitis vinifera* L.)

Le peu d'études qui ont traité de la comparaison entre la méthode UV et la méthode F-C, ont porté sur le raisin. C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour le choix de ce matériel végétal afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux décrits précédemment par d'autres auteurs.

Nous avons effectué une série d'extractions par un même solvant (Méthanol 50 %) tout en variant le temps d'extraction, le volume du solvant et le poids de l'échantillon.

Comme pour les espèces précédentes, nous avons procédé à une étude comparative des deux méthodes de quantification des composés phénoliques (la méthode UV et la méthode FC). La correspondance entre ces deux méthodes est illustrée dans la **Figure 45**.



**Figure 45:** Courbe de régression entre les teneurs en composés phénoliques totaux (mg EAG. 100 g<sup>-1</sup> MF) quantifiées par la méthode UV et la méthode Folin-Ciocalteu sur des échantillons du raisin (*Vitis vinifera* L.)

La valeur du coefficient de corrélation calculé à partir du coefficient de détermination R<sup>2</sup> est de l'ordre de 0.963. C'est une valeur très proche de 1, ceci confirme l'existence d'une bonne corrélation positive et significative entre les deux méthodes analytiques étudiées.

Ce résultat est en accord avec les résultats précédents sur l'artichaut et la coriandre, Le céleri ainsi que les résultats de l'étude menée par Yilmaz and Toledo (2006) sur les composés phénolique des grains du raisin.

Les résultats de la détermination du rapport UV/FC sont reportés dans le **tableau 34**. Il est intéressant de noter que dans le cas du raisin, et contrairement aux 3 autres espèces étudiées (*Coriandrum Sativum* L. et *Cynara Scolymus* L., *Apium graveolens* L.), le rapport UV/FC est inférieur à 1 (entre 0.4 et 0.7). Cela signifie que la méthode FC surestime la teneur en composés phénoliques, à l'inverse des autres cas où c'était la méthode UV qui surestimait la teneur en composés phénoliques.

**Tableau 34** : Variation du rapport UV/FC selon les conditions expérimentales pour les extraits du raisin (*Vitis vinifera* L.)

temps (h)	Volume du solvant (ml)	Poids	UV/FC
10mn	25	4,11	0,5
		3,79	0,5
		4,05	0,6
20mn	25	3,16	0,6
		3,15	0,5
	50	2,96	0,5
		2,89	0,5
		2,69	0,5
1h	25	2,65	0,6
		2,35	0,5
		3,05	0,5
	50	2,36	0,6
		2,57	0,7
		3,06	0,7
	10	2,77	0,4
		2,83	0,6
		2,56	0,5
24h	25	2,84	0,6
		2,64	0,5
		2,69	0,6
	50	2,46	0,6
		2,9	0,5
48h	25	2,9	0,5
		3	0,6
		2,38	0,5
	50	2,82	0,5
		2,49	0,4
		3,09	0,5

Ce résultat a été déjà rapporté par Spigno et son équipe en 2007 dans le travail qu'ils ont mené sur la quantification de la teneur en composés phénoliques du raisin par les deux méthodes spectrométriques. Ils ont constaté que la teneur en composés phénoliques estimée par la méthode de FC est supérieure à celle enregistrée par la méthode UV. Ils ont attribué cette différence de résultats à la différence des principes de dosage des deux méthodes : réaction avec un réactif oxydant (méthode Folin-Ciocalteu) et l'absorption par un noyau aromatique pour la méthode UV.

Du moment qu'il y a une différence entre les résultats enregistrés pour le raisin et ceux des autres espèces, donc il doit y avoir une autre explication (autre que celle liée à la différence des principes) pour la variation des teneurs en composés phénoliques données par les deux méthodes.

Le principe de la méthode FC est basé sur une réaction d'oxydoréduction non spécifique aux composés phénoliques (Khodami *et al.*, 2013). Elle mesure la capacité de réduction de l'acide phosphomolybdique / phosphotungstique par des composés phénoliques et non phénoliques tels que les acides organiques (ascorbique, citrique et tartrique), les sucres (fructose, glucose, saccharose), les sulfates de fer et les sulfites de sodium (Prior *et al.*, 2005 ; Rover and Brown 2013 ; Khodami *et al.*, 2013).

En comparant les 4 espèces de point de vue composition chimique, le raisin est le plus riche en glucose qui est susceptible d'interagir avec le réactif de Folin et de donner, donc, la coloration bleuâtre. Cela explique le fait que la teneur en composés phénoliques estimée par la méthode FC dépasse du double celle estimée par la méthode UV dans le cas du raisin.

A partir de là, nous pouvons déduire que la différence de principe de dosage ne peut justifier à elle seule la variation des teneurs en composés phénoliques données par les deux méthodes.

Les valeurs du rapport UV/FC fluctuent entre 0.7 et 0.5 pour une même concentration de méthanol quelles soient les conditions (**Tab. 34**). La significativité des conditions expérimentales considérées sur ce rapport est étudiée par l'analyse de la variance dont les résultats sont représentés dans le **tableau 35**.

Il est à constater qu'aucun des facteurs étudiés (volume du solvant, poids de l'échantillon, temps d'extraction) n'a un effet sur le rapport UV/FC. Cela est vérifié par les valeurs de signification ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 35** : Résultats de l'analyse Statistique

<b>Paramètres</b>	<b>Les significations (<i>p</i>)</b>
Volume du solvant	0.566
Poids (mg)	0.992
Temps (mn)	0.994

L'ensemble des résultats de cette partie ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive et significative entre la méthode UV et la méthode FC. De plus, le rapport UV/FC est affecté principalement par la concentration de méthanol, la température ainsi que la composition chimique de l'espèce considérée.



## Conclusion générale

### Conclusion Générale

Dans la première partie de ce travail, nous avons évoqué l'effet des conditions expérimentales sur le rendement en composés phénoliques et de l'activité antioxydante.

Nous avons également identifié quelques composés phénoliques de la coriandre et de céleri en plus de l'optimisation des conditions expérimentales d'extraction des composés phénoliques à partir de *Cynara scolymus* L., *Coriandrum sativum* L. et *Apium graveolens* L. par différentes méthodes : la macération dans le cas de *Cynara scolymus* L., la méthode assistée par ultrasons dans le cas de l'acide caféique de *Coriandrum sativum* L. et des composés phénoliques totaux d'*Apium graveolens* et, enfin, la méthode assistée par micro-ondes dans le cas de la lutéoline d'*Apium graveolens* L.

Nous avons, ainsi, constaté que la teneur en composés phénoliques de *Cynara scolymus* L. varie considérablement avec la variation du pourcentage de méthanol, la teneur en composés phénoliques augmentant proportionnellement avec le pourcentage du méthanol dans l'eau.

Le méthanol pur s'est avéré le solvant le plus efficace pour l'extraction du maximum de composés phénoliques à partir du réceptacle de l'artichaut comparativement aux mélanges méthanol-eau.

Le volume du solvant est à son tour un facteur déterminant dans le processus d'extraction des composés phénoliques. Il affecte significativement le rendement qui s'est avéré inversement proportionnel au volume du solvant. Quant au temps d'extraction, il semble avoir un effet négligeable sur la teneur en composés phénoliques extraits à partir du réceptacle de *Cynara scolymus* L.

En ce qui concerne l'effet des conditions expérimentales sur l'activité de piégeage du radical DPPH (activité anti radicalaire), tous les paramètres étudiés ont un effet significatif sur cette activité. Il apparaît que le pourcentage de méthanol est le facteur le plus déterminant sur cette activité. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres DPPH augmente avec l'augmentation du pourcentage de méthanol pratiquement pour tous les échantillons. Il atteint un maximum d'inhibition à un pourcentage de 80 %, une durée d'incubation d'une heure et un volume de solvant égal à 10 ml. Pour tout pourcentage de méthanol dépassant 80%, le pourcentage d'inhibition diminue.

## Conclusion générale

Le rapport solide : liquide exerce lui aussi un effet remarquable sur l'activité de piégeage du radical DPPH. Il a été constaté que cette dernière est inversement proportionnelle au volume du solvant, ce qui signifie que les activités les plus intéressantes sont enregistrées pour les volumes les plus faibles.

Le temps d'extraction est à son tour un facteur qui affecte considérablement l'activité de piégeage du DPPH. L'activité de piégeage du radical DPPH a enregistré un maximum après une heure d'extraction. Au-delà de cette durée d'incubation, l'activité a connu une baisse.

Nous avons également étudié la correspondance entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante. Les résultats ont mis en évidence l'absence de corrélation entre ces deux variables. Ceci est confirmé par des coefficients de corrélation de l'ordre de 0.43 et de 0.068 pour les échantillons de *Cynara scolymus* L. et du raisin respectivement.

Nous avons pu identifier 4 composés phénoliques dans les extraits de la coriandre (*Coriandrum sativum* L.) : un acide phénolique qui est l'acide caféique et trois flavonoïdes qui sont des dérivés de la quercétine : quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-glucuronide et quercétine-3-O-rutinoside.

Le rendement en acide caféique de *Coriandrum sativum* L. est fortement influencé par la concentration de méthanol. Les meilleurs rendements sont obtenus dans la région de du pourcentage de méthanol allant de 58 à 72 %. Au-delà de 72 %, une baisse du rendement a été constatée.

Les conditions expérimentales optimales qui ont assuré l'extraction du maximum de l'acide caféique à partir de la partie végétative de *Coriandrum sativum* L. sont les suivantes : 55% de méthanol, une température de 70° C, un rapport liquide : solide de l'ordre de 6.67 ml.mg<sup>-1</sup> et une durée d'incubation de 10 minutes.

Quatre composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait d'*Apium graveolens* L. Le rendement d'extraction de ces 4 composés par la méthode assistée par micro-ondes s'est avérée être liée au pourcentage du méthanol dans l'eau, le rapport liquide/solide ainsi que la température. Le meilleur rendement est assuré par les conditions expérimentales suivantes : 100 % de méthanol, une température de 80 °C, un rapport liquide /solide de l'ordre de 10 ml.mg<sup>-1</sup> et une durée d'incubation de 10 minutes.

## Conclusion générale

En ce qui concerne l'extraction de la lutéoline à partir des échantillons *d'Apium graveolens* L. par la méthode assistée par ultrasons, seule la concentration de méthanol a un effet significatif sur le rendement d'extraction. Tous les autres facteurs ont montré un effet négligeable. Le rendement maximum en lutéoline est obtenu par extraction de 1 g du broyat *d'Apium graveolens* L. dans 10 ml de méthanol pur pendant 10 minutes à une température de 70° C.

Dans la troisième partie de cette présente étude, la comparaison entre la méthode FC et la méthode UV a mis en évidence l'existence d'une corrélation positive et significative entre les teneurs enregistrés par la méthode d'absorption directe à 280 nm et celles donnés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette corrélation a été confirmée par les coefficients de corrélation très proches de 1 pour les quatre espèces étudiées, quel que soit le volume du solvant et quelle que soit la méthode méthodes d'extraction adoptée. De plus, le rapport UV/FC s'est avéré fortement influencé par le pourcentage du méthanol. Il est inversement proportionnel à ce pourcentage dans le cas de *Cynara scolymus* L. et de *Coriandrum sativum* L., et proportionnel au pourcentage du méthanol dans le cas *d'Apium graveolens* L. La méthode UV surestime la teneur en composés phénoliques dans le cas de *Cynara scolymus* L., *Coriandrum sativum* L. et *Apium graveolens* L., le rapport UV/FC étant supérieur à 1. Par contre, dans le cas du raisin c'est la méthode FC qui surestime la teneur en composés phénoliques où le rapport UV/FC été trouvé très inférieur à 1. A priori, le rapport UV/FC est influencé par la nature du matériel végétal ainsi que de la composition chimique du matériel considéré.

Dans la continuité de ce travail, il est souhaitable d'approfondir l'investigation sur la quantification des composés phénoliques par les deux méthodes spectrométriques sur d'autres espèces végétales dans le but de généraliser et valider la méthode UV.

Il serait aussi intéressant d'étudier les facteurs qui peuvent influencer le rapport UV/FC et particulièrement la composition en protéines, en acides aminés, et en glucides.

Le compromis température-temps d'extraction suggère qu'il peut être utilisé des températures dépassant 80° C pour l'extraction des composés phénoliques sans causer une dégradation de ces derniers. Il serait donc utile d'étudier d'autres combinaisons pour de futures extractions moins couteuses (économie du temps et d'énergie).

## **Conclusion générale**

La relation entre les conditions optimales permettant de maximiser le rendement en composés phénoliques totaux et celles permettant de maximiser le rendement en composés majoritaires doit être confirmée par confrontation de nouvelles extractions à partir d'autres matériels végétaux.

Il serait aussi important d'étudier la corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés majoritaires à fin de mieux cibler les objectifs de l'extraction.

**Références bibliographiques**

- **Aadil R.M., Zeng X.A., Wang M.S., Liu Z.W., Han Z., Zhang Z.H., Hong J., Jabbar S. (2015).** A potential of ultrasound on minerals, micro-organisms, phenolic compounds and colouring pigments of grape fruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, **50**: 1144-1150.
- **Abozed S.S., El-kalyoubi M., Abdelrashid A., Salama M.F. (2014).** Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. *Annals of Agricultural Science*, **59**(1): 63-67.
- **Akar Z., Küçük M., Doğan H. (2017).** A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **32** (1): 640–647.
- **Alberti A., Ferreira Z.A.A., Zardo D.M., Demiate I.M., Nogueira A., Mafra L.I. (2014).** Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, **149**: 151-158.
- **Alexis P. (2015).** Cours de plan d'expérience (forme littérale). 35 p.
- **Al-Snafi A.E. (2016).** A review on chemical constituents and pharmacological activities of *Coriandrum sativum*. *IOSR Journal of Pharmacy*, **6**(7): 17-42.
- **Alothman M., Bhat R., Karim A.A. (2009).** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, **115**: 785–788.
- **Amaechina F.C., Ayid B.A., Omagbai E.K. (2007).** Pharmacognosy and hypotensive evaluation of focus exasperate vahl leaf. *Acta poloniae pharmaceutica* **64**: 543-546.
- **Anonyme (2000).** Le Calcul d'incertitude Dans Les Méthodes De Mesurage De l'exposition professionnelle. 1-20.
- **Anonyme (2015).** Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. p.p.1-29. <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca>.
- **Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. (2000).** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, **125**: 989-1009.
- **Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mc Donald S. Robards K. (2001).** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**: 183–198.

- **Amanvermez R., Demir S., Tunçel O., Alvur M., Agar E. (2005).** Alcohol-induced oxidative stress and reduction in oxidation by ascorbate/l-cys/ l-met in the testis, ovary, kidney, and lung of rat. *Advances In therapy*, **6**: 548-558.
- **Appel K., Hist H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Revue of Plant Biology*, **55**: 373-99.
- **Attia F. (2007).** Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique et la maturité phénolique de la vigne *vitis vinifera* l.: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, l'Institut National Polytechnique De Toulouse, 185p.
- **Aumarawanna, Wannapornk, (2016).** Effect of methanol concentration on total phenolic content, antioxidant activity and antibacterial activity of spent coffee ground extract. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, **4**(2): 132-135.
- **Aurousseau B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.*, **15** (1): 67-82.
- **Bachir bey M., Meziant L., Benchikh Y., Louaileche H. (2014).** Deployment of réponse surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and anti-oxydant activity. *Food chemistry*, **162**: 277-282.
- **Badakhshan M.P., Subramanion L.J., Lachimanan Y.L., Yeng C., Sreenivasan S. (2012).** Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**(12): 960-965.
- **Baiano A., Del Nobile M.A. (2016).** Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**(12): 2053-2068.
- **Badakhshan M.P., Subramanion L.J., Lachimanan Y.L., Yeng C., Sreenivasan S. (2012).** Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2**(12): 960-965.
- **Barros L., Duenas M., Dias M.I., Sousa M.J., Santos-Buelga C., Ferreira I. (2012).** Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, **132**: 841-848.

- **Bauer K. (1990).** Common fragrance and flavor materials, preparation, properties and uses second, revised edition. VCH, Weinheim, 218p.
- **Becker L. (2014).** Identification et suivi par Spectrométrie de Masse de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par leur niveau de résistance au mildiou. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, Bordeaux, 215 p.
- **Beguel J., P. (2012).** Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat Université de Bretagne occidentale, Bretagne, 145 p.
- **Benito-Roman O., Alonso E., Cocero M.J. (2013).** Ultrasound-assisted extraction of beta-glucans from barley. *LWT-Food Science and Technology* **50**: 57-63.
- **Birben I., Sahiner M., Sackesen, Erzurum S., Kalayci O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, **5**: 9-19.
- **Berna A., Chafer A., Monton J.B., Subirats S. (2001).** High-pressure solubility data of system ethanol (1)+catechin (2)+CO<sub>2</sub> (3). *Journal of Supercritical Fluids*, **20**: 157–162.
- **Bhardwaj S.K., Dwivedi K., Agarwal D.D. (2015).** A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **5**(4): 76-81.
- **Bhebhe M., Chipurura B., Muchuweti M. (2015).** Determination and comparison of phenolic compound content and antioxidant activity of selected local Zimbabwean herbal teas with exotic *Aspalathus linearis*. *South African Journal of Botany*, **100**: 213–218.
- **Blois M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 199–200.
- **Boguszewska D., Zagdańska B. (2012).** ROS as Signaling Molecules and Enzymes of Plant Response to Unfavorable Environmental Conditions. In: Lushchak V. (Eds.). *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. p.p. 341-362.
- **Boizot N., Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration génétique et physiologie Forestière.
- **Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E., Saykova I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, **7** : 35-45.

- **Bonnefont-Rousselot D. (2007).** Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*, **157**: 23-26.
- **Bower A., Marquez S., de Mejia E.G. (2016).** The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**(16): 2728-2746.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, **111**: 925-929.
- **Briones-Labarca V., Plaza-Morales M., Giovagnoli-Viuna C., Jamett F. (2014).** High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Science and Technology*, **60**(1): 525-534.
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie : photochimie, plantes médicinales. Lavoisier, Paris, 1269p.
- **Bruno R.S., Traber M.G. (2006).** Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. *Pathophysiology*, **13**: 143–149.
- **Buthelezi M.N.D., Soundy P., Jifon J., Sivakumar D. (2016).** Spectral quality of photo-selective nets improves phytochemicals and aroma volatiles in coriander leaves (*Coriandrum sativum* L.) after postharvest storage. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* **161**: 328–334.
- **Callemien D., Collin S. (2010).** Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer-A Review. *Food Reviews International* **26**: 1-84.
- **Canon F. (2010).** Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins. Thèse de Doctorat, Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, Montpellier, 265p.
- **Cardin G. (2008).** Rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'induction de mécanismes d'adaptation au cadmium dans les cellules caco-2. Thèse de Doctorat Université de Québec, Montréal, 57p.
- **Carrera C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M., Barroso C.G. (2012).** Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, **732**: 100–104.



- **Carreras M. (2004).** Etat pro/antioxydant en relation avec le métabolisme lipidique dans les plaquettes sanguines lors du diabète. diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole Pratique Des Hautes Etudes, Lyon, 42p.
- **Castellano G. (2012).** Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *posidonia oceanica* (L.) Delile. Match Communications in Mathematical and in Computer Chemistry, **67**: 231-250.
- **Causse C. (2005).** Les secrets de santé des antioxydants. Alpen Edition s.a.m.95p.
- **Cerda-Carrasco A.D.L., López-Solís R., Nuñez-Kalasic H., Peña-Neira A., Obreque-Slier E. (2014).** Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Journal of Science Food and Agriculture, **7(95)**: 1521-1527.
- **Cerou S. (1994).** Radicaux libres et pathologie humaine, actualization et perspective d'avenir. Thèse de Doctorat Université Limoge, France. p.p. 165.
- **Chan C.H., See T.Y., Yusoff R., Ngoh G.C., Kow K.W. (2017).** Extraction of bioactives from *Orthosiphon stamineus* using microwave and ultrasound-assisted techniques: Process optimization and scale up. Food Chemistry, **221**: 1382-1387.
- **Chawla G., Ranjan C. (2016).** Principle, instrumentation, and applications of UPLC: a novel technique of liquid chromatography. Open Chemistry Journal, **3**: 1-16.
- **Cheftel H., 1977.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Lavoisier, Paris, 801p.
- **Chen H., Min L., Jing L.W. et al. (2009).** Inhibitory effects of four plant flavonoids extracts on fatty acids the tase. Journal of Environmental Science, **21**: 5131-5134.
- **Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.S., Abert-Vian M. (2017).** Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry **34**: 540-560.
- **Cheyrier V. Sarni-Manchado P.** Lavoisier et document, paris, pp 300-398.
- **Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan A.W.M., Ho C.W. (2011).** Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. International Food Research Journal, **18**: 571-578.

- **Chira K., Suh J.H., Saucier C., Teissedre P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**: 75–82.
- **Chuyen H.V., Roach P.D., Golding J.B., Parks S.E., Nguyen M.H. (2017).** Optimisation of extraction conditions for recovering carotenoids and antioxidant capacity from Gac peel using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
- **Cillard J. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations Laboratoire de biologie cellulaire et végétale, « groupe de recherche en thérapeutique anticancéreuse, GRETAC ». Faculté de pharmacie, Rennes, 13(1) :p.p.9-24.
- **Collard J. (2014).** Stress oxydant – Généralités. Laboratoire Dr Collard SC/SPRL – Synlab, Belgique.
- **Coloumb J.L. (2010).** Dimensionnement des composants électriques. Grenoble, 23 p.
- **Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000).** Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rock Ville, p.p. 1250-1318.
- **Corynne A. (2013).** Les antioxydants dans la lutte contre le cancer. *Journal des Sciences de la Santé Et de la Nutrition*, **2** (1): 55-62.
- **Costa E., Cosme F., Jordão A.M., Cotovio A.M.F. (2014).** Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated In: two portuguese wine regions. *Journal International Science. Vigne Vin*, **48** (1): 51-62.
- **Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural. Product. Reports*, **26**: 1001–1043.
- **Culter R.G., (2003).** Critical reviews of oxidative stress and aging: advences in basic science, diagnostic and intervention. *World scientific*, **1** : 1532-1542.
- **Dahmoune F., BoulekbacheL., Moussi K., Aoun O., Spigno G., Madani K. (2013).** Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound applicationto solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, **50**: 77– 87.
- **Dahmoune F., Boulekbache L., Spigno G., Moussi K., Remini H., Cherbal A., Madani K. (2014).** *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products* **61**: 31–40.

- **Dai J., Mumper R.J. (2012):** Plant phenolics: extraction, analysis and their anti-oxidant and anticancer properties. *Molécules*, **15**: 7313-7352.
- **Defeng W., Cederbaum A.I. (2003).** Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, **27** (4): 277-284.
- **Defraign J.O., Pincemail J. (2007).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège*, **62** (4): 1-10.
- **Dehaven c. (2007).** Oxidative stress & free radical damage. *Science of Skincare*.
- **Denat F. (2010).** Chromatographie. Dijon .p.p. 1-41.
- **Descheemaeker K. (2003).** Nutrition et phytothérapie. Garant, 85p.
- **Desmier T. (2016).** Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de Doctorat, Université de Limoges. France, 85 p.
- **Diáz J., Bernal A., Po Mar F., Merino F. (2001).** Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, **161** : 179-188.
- **Diederichsen A. (1996).** Coriander (*Coriandrum sativum* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 3. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 83 p.
- **Dirk A., Andre B., Jan T., Peter C. (2013).** Les antioxydants et la protection contre la lumière solaire. *Nutrifacts*.
- **Divya P., Puthusseri B., Neelwarne B. (2014).** The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. *LWT-Food Science and Technology* **56**: 101-110
- **Durazzo T.C., Mattsona N., Weinera M.W., Koreckae M., Trojanowskie J.Q., Shawe L.M. (2014).** History of cigarette smoking in cognitively-normal elders is associated with elevated cerebrospinal fluid biomarkers of oxidative stress. *Drug and Alcohol Dependence*, **142**: 262–268.
- **Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B., Hosni, K. (2012).** Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of Functional Foods*, **4**: 423-432.
- **Elboughdiri N., Jamoussi A., Hannachi B., Romdhane M., Abderraba A. (2007).** Séparation des composés phénoliques de la margine. *Revue francophone d'écologie industrielle*, **47**: 17-23.

- **El Bourimi O. (2015).** Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle de la qualité. Mémoire de fin d'étude, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques, Fès, 40p.
- **El-Shirley B. (2002).** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **5** : 218-223.
- **EL-Zaeddi H., Calin-Sanchez A., Nowicka P., Martinez-Tome J., Noguera-Artiaga L., Burlo F., Wojdylo A., Carbonell-Barrachina A.A. (2017).** Preharvest treatments with malic, oxalic, and acetylsalicylic acids affect the phenolic composition and antioxidant capacity of coriander, dill and parsley. *Food chemistry* **226**: 179-186.
- **Espada-Bellido E., Ferreiro-Gonzalez M., Carrera C., Palma M., Barroso C.G., Barbero G.F. (2017).** Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry* **219**: 23-32.
- **Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E. (2008).** Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3774-3779.
- **Etsinda M.F. (2008).** Nouvelle approche hybride d'optimisation multiobjective basée sur la méthode des surfaces de réponse et le système de colonies de fourmis. Maitrise, Ecole De Technologie Supérieure, Université Du Québec, Montréal, 135 p.
- **European Medicines Agency (2012).** Assessment report on *Cynara scolymus* L., folium. London, Royaume uni, 42p.
- **Eversley T.C. (2012).** Le potentiel antioxydant de l'alimentation tel qu'estimé par le score ORAC : une comparaison des apports des personnes âgées avec démence du type Alzheimer avec ceux des témoins sans problèmes cognitifs. Thèse de Doctorat Université de Montréal, Canada, 150p.
- **Eymard S. (2003).** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France, 126p.
- **Fardet A. (2017).** Le pouvoir antioxydant des produits laitiers une propriété méconnue de leur potentiel protecteur. Centre de Recherche et d'Information Nutritionnelles. Cholé Doc, 155p.
- **Favier A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

- **Favier I.H. (2009).** Le Stress oxydant. Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble.
- **Faucher, J., 2006.** Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Institut National Polytechnique de Toulouse 198.
- **Feng S., Luo Z., Tao B., Chen C. (2015).** Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *Lwt-Food Science and Technology*, **60**(2): 970-976.
- **Fleuriet A., machiex J.L., Sarni-manchado P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante. Structure, biosynthèse, représentation et rôle des polyphénols en agroalimentaire.
- **Ferracane R., Pellegrini N., Visconti A., Graziani G., Chiavaro E., Miglio C., Fogliano V. (2008).** Effects of Different Cooking Methods on Antioxidant Profile, Antioxidant Capacity, and Physical Characteristics of Artichoke. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**: 8601–8608.
- **Franco M.N., Galeano-Díaz T., López O., et al. (2014).** Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, **163**: 289–298.
- **Fraga C.G.** Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. **2010.** Canada. p. 593.
- **Frangipane M.T., Torresi S., De Santis D., Massantini R. (2012).** Effect of drying process in chamber at controlled temperature on the grape phenolic compounds. *Italian Journal of Food Science*, **24**: 1-7.
- **Frenot M., et al., 2001.** Biochimie des aliments. Doin, Paris ,297p.
- **Gallo M., Ferracane R., Graziani G., Ritieni A., Fogliano V. (2010).** Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, **15**(9): 6365-74.
- **Galvan D. (2013).** Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits. Thèse de Doctorat, Université Lille 1, France, 169 p.
- **García-Martínez N., Andreo-Martínez P., Almela L. (2017).** Characterization of Six Artichoke Cultivars and Their Suitability for Agro-industrial Processing. *Journal of Food and Nutrition Research*, **5**, (4): 234-242.

- **Garcia-Perez M.E. (2008).** Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante. Thèse de Doctorat, Université Laval, Canada, 116p.
- **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, **15**: 8813-8826.
- **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. L'actualité chimique. 91-96.
- **Ghio A.J. (2014).** Oxidative Injury Caused by Cigarette Smoking and Air Pollution. In: Ganguly N., Jindal S., Biswal S., Barnes P., Pawankar R. (eds) *Studies on Respiratory Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Humana Press, New York.
- **Giada M.L.R. (2013).** Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources And Their Antioxidant Power. In: *Foxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants*, p.p.87-112.
- **Gill S.S., Tuteja N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909-930.
- **Goh K.M., Lai O.M., Abas F., Tan C.P. (2017).** Effects of sonication on the extraction of free-amino acids from moromi and application to the laboratory scale rapid fermentation of soy sauce. *Food Chemistry*, **215**: 200-208.
- **González-Montelongo R., Lobo M.G., González M. (2010).** The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, **71**: 347-355.
- **Gope P.S., Dutta A.K., Makhnoon S. Banik S. Siddiquee M.A., Kabir Y. (2014).** Effect of solvent and extraction time on the antioxidant properties of *Citrus macroptera*. *International Journal of Drug Development and Research*, **6**(2): 28-35.
- **Goupy J., Creighton L., (2006).** Introduction aux plans d'expériences-3ème édition. Dunod 336.
- **Goupy J. (2006).** Introduction aux plans d'expériences- 5ème édition Dunod.

- **Gueye M. (2007).** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 120 p.
- **Gutowski M., Kowalczyk S. (2013).** A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica.*, **60** (1): 1-16.
- **Hadjmohammadi M., Sharifi V. (2009).** Investigation of Optimum Extraction Conditions for Determination of Quercetin and Kaempferol in Coriander (*Coriandrum sativum* L.) by Using Experimental Design and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis* **17**: 293-299
- **Haleng F.J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, **62** (10) 628-638.
- **Harborne J.B. (1990).** Role of secondary metabolites in chemical defense-mechanisms in plants. Whiteknights, Ukraine.
- **Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E. (2002).** Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J. Agric. Food Chem*, **50** : 1785-1790.
- **Hercberg S. (2003).** Intérêt des antioxydants, à doses nutritionnelles, dans la prévention primaire des cancers et des maladies cardiovasculaires. Synthèse d'article de santé. 1-2.
- **Ho C.T. (1992).** Phenolic Compounds in Food. In: Huang M., T., Ho C., T., Lee C. Phenolic compounds in food and their effects on health: volume ii: antioxydants and cancer prevention. American Chemical Society, pp. 402.
- **Hyardin A. (2008).** Etude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels. Institut national polytechnique de lorraine. France, 236p.
- **Ichai C. et al., (2011).** Désordre métabolique et réanimation : de la physiologie au traitement. Springer, 507p.
- **Ilaiyaraja N., Likhith K., Sharath B.G.R., Khanum F. (2015).** Optimization of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food chemistry*, **173**: 348-354.
- **Illés V., Daood H.G., Perneczki S., Szokonya L., Then M. (2000).** Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, **17**: 177–186.

- **Inan M, Kirici S, Giray E.S, Turk M, Taghikhani H. (2014).** Determination of suitable coriander (*Coriandrum sativum* L.) Cultivars for eastern mediterranean region. Turkish Journal of Field Crops **19**: 1-6.
- **İnce A.E., Şahin S., and Şümnü S.G. (2013).** Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. Turkey Journal of Agriculture and Forestry, **37**: 69-75.
- **Institut Européen des Substances Végétales (2011).** L'artichaut (*Cynara scolymus*). Paris.
- **Izadifar Z. (2013).** Ultrasonics Sonochemistry, **20**: 1359–1369.
- **Izmir J., Zaidul I.S.M., Rahmanet M.M., et al. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, **117**: 426–436.
- **Joseph S.V., Edirisinghe I., Burton-Freeman B.M. (2016).** Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **56**: 419-444.
- **Kala H.K., Mehta R., Tandey R., Sen K.K., Mandal V. (2016).** Ten years of research on phenolics (2005 - 2015): A status report. Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering, 1-4.
- **Kallel F., Driss D., Chaari F., Belghith L., Bouaziz F., Ghorbel R., Chaabouni S.E. (2014).** Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. Industrial Crops and Products, **62**: 34-41.
- **Kankara S.S., Mustafa M., Ibrahim H.M., Nulit R., Go R. (2014).** Effect of drying methods, solid-solvent ratio, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant activity of *Guiera senegalensis* j.f. gmel (combretaceae) leaves water extract. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, **2**(12): 2321 – 2748.
- **Kapell C.D. (2010).** Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin. Thèse de Doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux. France, 176p.
- **Katalinić V., Maleš P. (1997).** Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. Journal of Wine Research, **8**(3): 169-177.
- **Katalinić V. (1999).** Grape Catechins-Natural Antioxidants. Journal of Wine Research, **10**(1): 15-23.



- **Kaur C, Kapoor H.C. (2002).** Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* **37**: 153-161.
- **Kaymaz M.B., Kandemir F.M., Pamukçu E., Eröksüz Y., Özdemir N. (2017).** Effects of Aqueous Artichoke (*Cynara scolymus*) Leaf Extraction Hepatic Damage Generated by Alpha-Amanitine. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, **23** (1): 155-160.
- **Kchaou w., Abbès F., Blecker C., Attia H., Besbes S. (2013).** Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products*, **45**: 262– 269.
- **Khater F. (2011).** Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques. Thèse de Doctorat, Centre International d'études Supérieures En Sciences Agronomiques - Montpellier Supagro. France, 198p.
- **Khodami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, **18**: 2328-2375.
- **Kim J.S. (2004).** Production, separation and applications of phenolic-rich bio-oil – A review. *Bioresource Technology*, **178**: 90-98.
- **Knasmüller S. (2009).** Chemoprevention of cancer and DNA damage by damage by dietary factors. Wiley-VCH, 787p.
- **Kollia E., Markaki P., Zoumpoulakis P., Proestos C. (2016).** Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques. *Natural Product Research*, 1-5.
- **Kondo N., Kawashima M. (2000).** Enhancement of tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidant enzymes. *Journal of Plant Research*, **113**(3): 311-317.
- **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Muséum national d'histoire naturelle, 243p.
- **Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R. (2011).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, **89**: 217-233.
- **Kumari B., Tiwari B.K., Hossain M.B., Rai D.K., Brunton N.P. (2017).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from potato peels: profiling and kinetic modelling. *International Journal of Food Science and Technology* **52**: 1432-1439.

- **Kunwar A., Priyadarsini K.I. (2011).** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, **1**(2): 53-60.
- **Lacombe T. (2012).** Contribution à l'étude de l'histoire évolutive de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) par l'analyse de la diversité génétique neutre et de gènes d'intérêt. Thèse de Doctorat, Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier, 72p.
- **Lafka T.L., Lazou A.E., Sinanoglou V.J., Lazos E.S., (2011).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, **125**: 92–98.
- **Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL*, **14** (5) : 278-292.
- **Lambert C. (2011).** Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux Segalen, France, 180p.
- **Larrauri J.A., Ruperez P., Saura-Calexto F. (1996).** Antioxydant activity of wine pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**: 369pp.
- **Larrauri J.A., Ruperez P., Saura-Calexto F. (1997).** Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** (4): 1390-1393.
- **Lattanzio, V., Cicco, N., (2005):** Antioxidant Activities of Artichoke Phenolics. *Acta horticulturae*, **681**: 421-428.
- **Lepengue N.A., Mouaragadja I., Ibrahim B., Ake S., M'Batchi B. (2012).** Réponse du maïs (*Zea mays* var. LG 60) au stress salin : étude de la synthèse de quelques composés biochimiques. *Journal of Animal & Plant Sciences*, **14** (1): 1866-1872.
- **Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2017).** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, **130**: 928–936.
- **Lima G.P.P., Vianello F., Corrêa C.R., Campos R.A.D.S., Borguini M.G. (2014).** Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition Sciences*, **5**: 1065-1082.
- **Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F. (2005).** Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53** (7):2433- 2440.

- **Lôliger J., Badoud R., Bauer W.J. (2010).** Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. In : Science et technologie des aliments. PPUR Presses polytechniques, 720p.
- **Lombardo S., Pandino G., Mauro R., Mauromicale G. (2009).** Variation of Phenolic Content in Globe Artichoke in Relation to Biological, Technical and Environmental Factors. *Italian Journal of Agronomy*, **4**: 181-189.
- **Lombardo S., Pandino G., Knödler M., Carle R., Schieber A. (2010).** Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, **119**: 1175-1181.
- **Luthria D.L. (2008).** Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, **107**: 745–752.
- **Luthria, D.L. (2012):** Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. *Journal of functional foods*, **4**: 842-850.
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J.** Fruit Phenolics. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990.
- **Macheix J. (2005),** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Coll.Biologie.Ed.Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 192p.
- **Maestra S.I., De-Flora S., Micale T.R. (2014).** Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **218**(1):117-22.
- **Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. (2010).** Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* **83**: 441-447.
- **Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, **9**: 35-40.
- **Maqsood S., Benjakul S., Abushelaibi A., Alam A. (2014).** Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**: 1125-1140.

- **Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., et al. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine /Sciences*, (20): 458-463.
- **Marinova G., Batchvarov V. (2011).** Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **17** (1) : 11-24.
- **Marzocchella L., Fantini M., Benvenuto M. (2011).** Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*, **5**: 200–220.
- **Massaux C. (2012).** Polyphénols : des alliés pour la santé. *Abeilles & Cie*, (149) : 1-4.
- **Médart J. (2009).** Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative *Médecine : spécialités. Édition De Boeck Supérieur*, 314 p.
- **Mehinagic E., Bourles E., Jourjon F. (2011).** Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **43** (6): 364–368.
- **Messiaen-Pagotto F., Messiaen C.M. (2009).** Le potager familial méditerranéen. *Editions Quae*, 191 p.
- **Melo E.D., Mancini J., Guerra N.B. (2005).** Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *LWT-Food Science and Technology* **38**: 15-19.
- **Meneses N.G.T., Martins S., Teixeira K.A., Mussatto S.I. (2013).** Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, **108**: 152-158.
- **Merghem R. (2009).** *Elément de Biochimie végétale*. Bahaeddine editions, 912 p.
- **Michalak A. (2006).** Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environment and Study*, **15**(4) : 523-530.
- **Michiels J.A., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., Dommes J. (2012).** Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, **130**: 986-993.
- **Migdal C., Serres M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress. *Medecine science*, **27** (4): 405 – 412.
- **Miniati E. (2007).** Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Annali dell Istituto Superiore di Sanità*, **43**(4): 362-368.

- **Mirali M., Ambrose S., Wood S.A., Vandenberg A., Purves R.W. (2014).** Development of a fast extraction method and optimization of liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of phenolic compounds in lentil seed coats. *Journal of Chromatography B*, **969**: 149-161.
- **Moharram H.A., Youcef M.M. (2014).** Methods for Determining the Antioxidant Activity. *Journal of Food Science & Technology*, **11**(1): 31-42.
- **Mokrani A., Madani K. (2016).** Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*.
- **Moll M., Moll N., 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218 p.
- **Moller P., Wallin H., Knudsen L.E. (1997).** Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions*, **102**: 17-36.
- **Moussa F., Benoist J.F., Thioulouse E., Berthe M.C., Couderc R. (2011).** Spectrométrie de masse et maladies métaboliques héréditaires. *Revue Francophone Des Laboratoires*, **437** : 65-72.
- **Muanda F.N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, France, 239 p.
- **Murray M.T., Pizzorno J. (2010).** *The Encyclopedia of Healing Foods*, 912 p.
- **Nacz M., Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1523-1542.
- **Nacz M., Zadernowski R., Shahidi F. (2007).** Antioxidant Measurement and Applications: Antioxidant Capacity of Phenolic Extracts from Selected Food By-Products. In *Antioxidant Measurement and Applications: ACS Symposium Series*, American Chemical Society, p.p. 184-194.
- **Nadeem M., Anjum F.M., Khan M.I., Tehseen S., El-ghorab A., Sultan J.I. (2013).** Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.) A review. *British Food Journal* **115**: 743-755.

- **Naresh K., Bhawani S., Kumar T.M. (2014).** Ultra performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmacy Medicine & Biological Sciences*, **3**(3): 84-94.
- **Nijveldt R.J., Nood V.E., Hoorn V.D.E. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **74**: 418–425.
- **Nimish P.L., Sanjay K. B., Nayna B.M., Jaimik R.D. (2011).** Phytopharmacological Properties of *Coriander Sativum* as a Potential Medicinal Tree: An Overview. *Journal of applied pharmaceutical science*, **1**(4): 20-25.
- **Odabas H.I., Koca I. (2016).** Application of response surface methodology for optimizing the recovery of phenolic compounds from hazelnut skin using different extraction methods. *Industrial Crops and Products* **91**: 114-124
- **Oliveira A.P., Valentão P., Pereira J.A., Silva B.M., Tavares F., Andrade P.B. (2009).** *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 2841-2846.
- **Outaleb T. (2010).** Huiles essentielles et extraits de romarin : Composition chimique et activité antioxydante. Thèse Magister en science agronomique. Thèse de Magister Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, 112p.
- **Ozcan T., Akpınar-Bayazit A., Yılmaz-Ersan L., Delikanlı B. (2014).** Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, **5** (5): 393-396.
- **Pacaut P. (2005).** Les bons sucres pour maigrir. Alpen Editions s.a.m, 95p.
- **Pain I.M., Casazza A.A., Aliakbarian B., Perego P., Binello A., Cravotto G. (2016).** Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science and Technology*, **51**: 349-358.
- **Palermo M., Colla G., Barbieri G., Fogliano V. (2013).** Polyphenol Metabolite Profile of Artichoke Is Modulated by Agronomical Practices and Cooking Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**: 7960-7968.
- **Palli D., Sera F., Giovannelli I. (2009).** Environmental ozone exposure and oxidative DNA damage in adult residents of Florence, Italy. *Environmental Pollution*, **157**: 1521–1525.

- **Palma, M., Barbero, G.F., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C.G., Rostagno, M.A., Prado, J.M., Meireles, M.A.A. (2013).** Natural Product Extraction: Principles and Applications. In: Rostagno, M.A., Prado, J.M. (eds.). *Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects*. Cambridge, p.p. 58-88.
- **Palma M., Taylor L.T. (2001).** Supercritical fluid extraction of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 628-632.
- **Pan X., Niu G., Liu H. (2003).** Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process*, **42**: 129-133.
- **Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G., Williamson G. (2011).** Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**: 148-153.
- **Pastre J.O.C. (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 116 p.
- **Patil P., Tathe R.D., Devdhe S.G., Angadi S.S, Kale S.H. (2011).** Ultra performance liquide chromatography : A review. *International research journal of pharmacy*, **2(6)**: 39-44.
- **Pednault A. (2011).** Feuille de chou. *Jardin communautaire*, Montréal, 1-12.
- **Peter K.V. (2004).** *Handbook of Herbs and Spices*. 360 p.
- **Petropoulos S.A., Pereira C., Barros L., Ferreira I.C.F.R., (2017).** Leaf parts from Greek artichoke genotypes as a good source of bioactive compounds and antioxidants. *Food & Function*, **8**: 2222-2029.
- **Pincemail J., Heusele C., Bonté F., Limet R., Defraigne J.O. (2001).** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Actualité en Médecine Internationale. - Métabolismes - Hormones - Nutrition*, **5(4)** : 158-164.
- **Pisoschi A.M., Negulescu G.p. (2011).** Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Anal Biochemistry*, **1:1**: 1-10.
- **Popovi M., Kaurinovi B., Trivi S. (2006).** Effect of celery (*Apium graveolens*) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with carbon tetrachloride. *Phytotherapy Research.*, **20**: 531–537.

- **Portes E., 2008.** Synthèses et études de tetrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat en chimie organique, Université de Bordeaux I, France, 244 p.
- **Pothitirat W., Chomnawang M.T., Supabphol R., Gritsanapan W. (2010).** Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, **80**: 442-447.
- **Prasad K.N., Yang E., Yi, C., Zhao M., Jiang Y. (2009).** Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**: 155-159.
- **Predescu N.C., Papuc C., Nicorescu V., Gajaila I., Goran G.V., Petcuc D., Stefan G. (2016).** The Influence of Solid-to-Solvent Ratio and Extraction Method on Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Properties of Some Ethanolic Plant Extracts. *Revue of Chimestry*, **67**(10): 1922-1927.
- **Preedy V. (2008).** Botanical medicine in chemical practice. CABI, 915p.
- **Preedy V.R. (2008).** Beer in health and diseases. Academic press, 1101p.
- **Prior E. (2003).** Lipides et corps gras alimentaires : usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, Paris, p.p. 157-187.
- **Proestos C., Varzakas T. (2017).** Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation. *Foods*, **6**(28): 1-7.
- **Ravanat J.L., Sauvaigo S. (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage: Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biological Chemistry* **383**, 933-943.
- **Qilong R., Huabin X., Zongbi B., Baogen S., Qiwei Y., Yiwen Y., Zhiguo Z. (2013).** Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **21**(9): 937-952.
- **Ramel F. (2008).** Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *arabidopsis thaliana*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1 France, 179 p.



- **Razali N., Mat-Junit S., Abdul-Muthalib A.F., Subramaniam S., Abdul-Aziz A., (2012).** Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. Food Chemistry, **131**: 441-448.
- **Ribe´reau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2000).** Handbook of Enology. The chemistry of wine Stabilization and Treatments, **2**: 157-162.
- **Ribeiro-Santos R., Andrade M., Sanches-Silva A., de Melo N.R. (2017).** Essential oils for food application: natural substances with established biological activities.
- **Richard H., Horsey T. (2016).** Ugly Food: Overlooked and Undercooked. Oxford University Press, 288 p.
- **Robard K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Gloveret W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, **66**: 401-436.
- **Rock E., Fardet A. (2014).** Les antioxydants des agrumes : action en solitaire ou matricielle ? Phytothérapie, **12**: 66-75.
- **Rockenbach I.I., Rodrigues E., Gonzaga L.V., Caliari V., Genovese M.I., De Souza A.E., Gonçalves S., Fett R. (2011).** Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chemistry, **127**: 174-179.
- **Rodrigues S., Pinto G.A.S., Fernandes F.A.N.N., (2008).** Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry, **15**: 95-100.
- **Roginsky V., Lissi E.A. (2003).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, **92**: 235–254.
- **Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. OCL , **11** (6) : 419-424.
- **Rostagno M.A., Palma M., Barroso C.G., (2003).** Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A, **1012**(2): 119-128.
- **Routray W., Orsat V. (2014).** MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. Industrial Crops and Products, **58**: 36–45.
- **Rover R.M., Brown R.C., (2013).** Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, **104**: 366-371.
- **Ruiz J.M., Rivero R.M., Lo Ez-Cantarero I., Romero L. (2003).** Role of Ca<sup>2+</sup> in metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). Plant Growth Reg, **41**(2) : 173-177.

- **Sacks J., Welch W.J., Mitchell T.J., Wynn H.P. (1989).** Design and analysis of computer experiments. *Statistical Science*, **4** (4): 433-435.
- **Sakihama Y., Ya Masaki H. (2002).** Lipid peroxidation induces by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biology Plantarum*, **45** (2): 249-254.
- **Samatha Y., Srividya A., Ajitha A., Maheswara-Rao V.U. (2015).** Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, **4**(8): 356-367.
- **Santana C.M., Ferrera Z.S., Torres-Padrón M.E., Santana R.J.J. (2009).** Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. *Molecules*, **14**: 298-320.
- **Sarma A.D., Mallick A.R., Ghosh A.K. (2004).** Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, **1**(3): 185-192.
- **Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, 398 p.
- **Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005).** Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(1): 215-217.
- **Schneider S.D., de Oliveira A.R. (2004).** Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Revista Brasileira Medicina Esporte*, **10** (4): 314-318.
- **Setyaningsih W., Saputro I.E., Palma M., Barroso C.G. (2016).** Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. *Food Chemistry*, **192**: 452-459.
- **Shahidi F., Naczki M. (2006).** Phenolics in Food and Nutraceuticals. Print Edition, 539 p.
- **Shahidi F., Tang C.H. (2005).** Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products. American Chemical Society, 308 p.
- **Sharma, M.M. and Sharma, R.K. (1999).** Coriander. *Handbook of Herbs and Spices*. Wood Head Publishing Ltd., Sawston, 1-6.
- **Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. (2012).** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, (2012), Article ID: 217037.

- **Singh G., de Lampasona M. M. P.S., Catalanet C. A. N. (2006).** Studies on essential oils, Part 41. Chemical composition, antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**(3): 472-479.
- **Singleton V. L., Ortofer R., Lamuela-Raventos R. M., (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In: Packer L. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Orlando: Academic Press, p.p.152–178.
- **Silva F., Domingues F.C. (2017).** Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**: 35-47.
- **Singleton V.L., Rossi J.A.J.R. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.
- **Song J., Li D., Liu C., Zhang Y. (2011).** Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **12**: 282-287.
- **Sowbhagya H.B., Srinivas P. (2013).** Enrichment of bio-active phthalides in celery seed oil. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, **3**: 250-257.
- **Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, **81**(1): 200-208.
- **Sriti J., Wannes W.A., Talou T., Ben Jemia M., Kchouk M.E., Marzouk B. (2012).** Antioxidant properties and polyphenol contents of different parts of coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, **89**: 253-262
- **Stalikas C.D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, **30**: 3268-3295.
- **Stevanovic T. (2005).** Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec.
- **Stookey L. (1970).** Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. **42**(7): 779-781.
- **Švarc-Gajic´ J., Stojanovic´Z., Carretero b A.S., Román D.A., Borrás I., Vasiljevic´ I. (2013).** Development of a microwave-assisted extraction for the analysis

- of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. Journal of Food Engineering, **119**: 525–532.
- **Swartz M.E. (2005)**. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. Separation science redefined, 8-14.
  - **Syed B. (2015)**. Le pouvoir antioxydant des additifs phylogéniques. Biomin Holding GmbH, Herzogenburg, 1-5.
  - **Takahama U., Oniki T. (2000)**. Flavonoid and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. Journal of Plant Research, **113**(3) : 301-309.
  - **Tao Y., Zhang Z., Sun D. (2014)**. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. Ultrasonics Sonochemistry, **21**: 1461-1469.
  - **Tay P.Y., Tan C.P., Abas F., Yim H.S., Ho C.W. (2014)**. Assessment of Extraction Parameters on Antioxidant Capacity, Polyphenol Content, Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin Gallate (ECG) and Iriflophenone 3-C- $\beta$ -Glucoside of Agarwood (*Aquilaria crassna*) Young Leaves. Molecules, **19**: 12304-12319.
  - **Tela Botanica (2011)**. *Cynara scolymus* L. (Artichaut).
  - **Teofilovic B., Grujic-Letic N., Golocorbin-Kon S., Stojanovic S., Vastag G., Gadzuric S. (2017)**. Experimental and chemometric study of antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum*) extracts. Industrial Crops and Products **100**: 176-182.
  - **Thiery F. (Anonyme)**. Valorisation des polyphénols végétaux dans l'alimentation. Module de valorisation des ressources végétales, 16 p.
  - **This P., Lacombe T., Thomas M.R. (2006)**. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in Genetics, **22**(9): 511-518.
  - **Thoo Y.Y., Ho S.K., Liang J.Y., Ho C.W., Tan C.P. (2010)**. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). Food Chemistry, **120**: 290-295.
  - **Tinsson W. (2010)**. Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques. Springer Science & Business Media, 532p.
  - **Tremblin G., Marouf A. (2009)**. Cellules végétales et animales. In : abrégé de biochimie appliquée. Editeur et la ville, p.p 341 -351 (Grenoble science abrégé de biochimie appliquée).

- **Tiwari R., Rana C.S. (2015).** Plant secondary metabolites: A review. International Journal of Engineering Research and General Science, **3**(5): 661-670.
- **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. LWT - Food Science and Technology, **43**: 632-639.
- **Triboulet P. (2008).** Notions de bases sur les plans d'expériences. Lycée Niepce – Chalon sur Saône, 49 p.
- **Uma D., Ho C., Wan Aida W. (2010).** Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. Sains Malaysiana, **39** : 119-128.
- **Urcan D.E., Nastasia P.,1, Rolle L., Bora F.D. (2016).** Importance of grape phenols in the human diet. Journal Of Horticulture, Forestry And Biotechnology, **20**(1): 46- 50.
- **Vasco K. (2009).** Phenolic compounds in ecuadorian fruits. Swedish University of Agricultural Sciences. 60p.
- **Veggia P.C., Pradob J.M., Bataglione G.A., Eberline M.N., Angela A.M. Lasefi M. (2014).** Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. Journal of Supercritical Fluids, **89**: 68–77.
- **Verdu C. (2013).** Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme. Thèse de Doctorat, Université d'Angers, Nante, 205 p.
- **Vermerris W., Nicholson R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. The Netherlands, 267p.
- **Vivier S. (2002).** Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis. Thèse de Doctorat, université de sciences et technologie de l'Ile, France, 301 p.
- **Vongsak B., Sithisarn P., Mangmool S., Thongpraditchote S., Wongkrajang Y., Gritsanapan W. (2013).** Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops and Products, **44**: 566-571.
- **Vuong Q.V., Van-Tang N., Dang-Trung T., Bhuyan D.J, Goldsmith C.D., Sadeqzadeh E., Scarlett C.J., Bowyer M.C. (2015).** Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology. Industrial Crops and Products **63**: 197-202.
- **Wangensteen H., Samuelsen A.B., Malterud K.E. (2004).** Antioxidant activity in extracts from coriander. Food Chemistry **88**: 293-297.
- **Waston R.R. (2009).** Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables. Academic press, 737p.

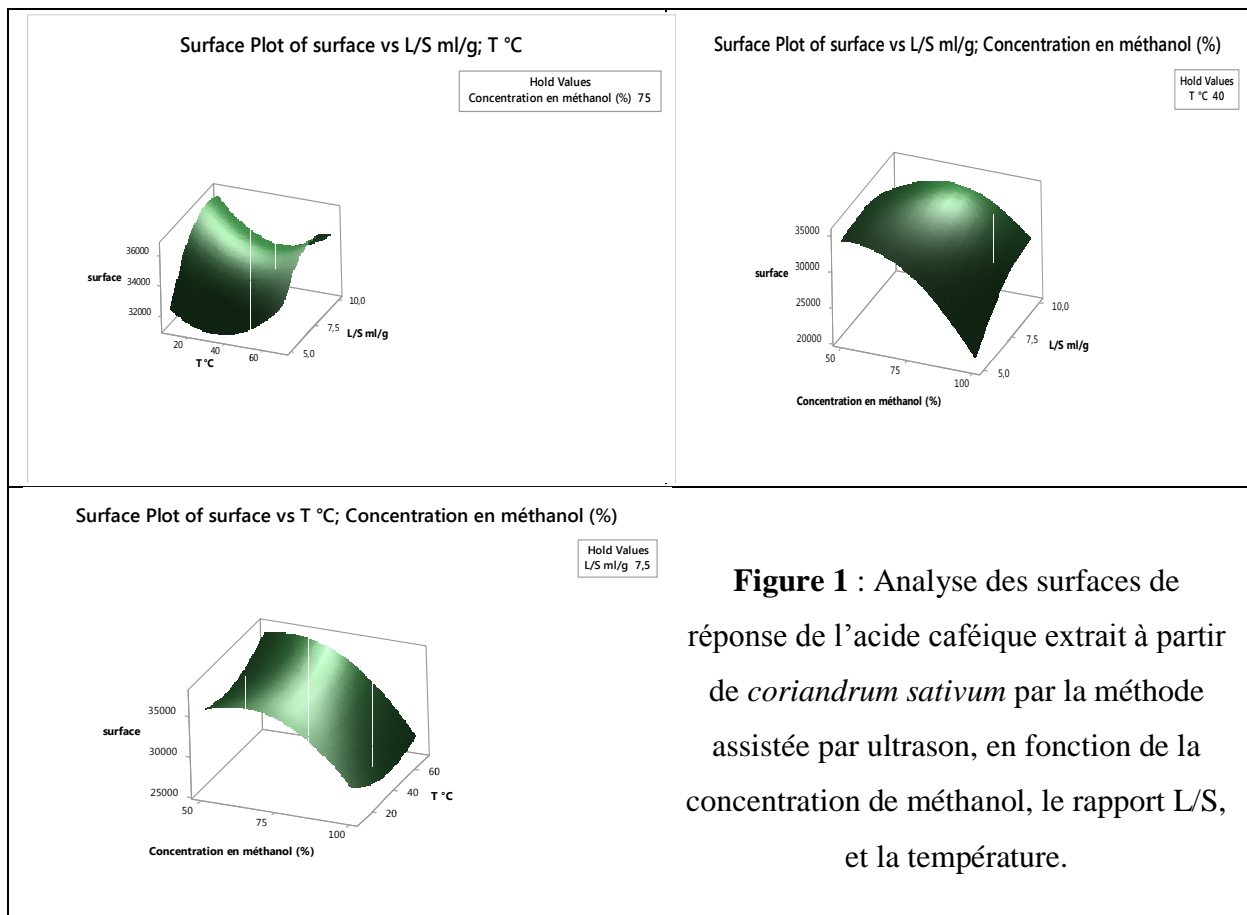
- **Weaver, L. M. and K. M. Herrmann (1997).** "Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, **2**(9): 346-351.
- **Wincker L. (2005).** Nouveau regard sur la vision : enjeux, recherche, perspective. *CLM Communication*, 287p.
- **Winkel-Shirley B. (2001).** It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of Flavonoid metabolism. *Plant Physiol*, **127**: 1399-1404.
- **Wong P.Y.Y., Kitts D. (2006).** Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, **97**: 505-515.
- **Yang W., Omay S.T. (2009).** Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutation Research*, **674**: 45–54.
- **Ya-Qin M., Jian-Chu C., Dong-Hong L., Xing-Qian Y. (2009).** Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, **16**: 57–62.
- **Yap C., Ho C., Aida W.W., Chan S., Lee C., Leong Y. (2009).** Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, **38** : 511-520.
- **Yao Y., Ren G. (2011).** Effect of thermal treatment on phenolic composition and antioxidant activities of two celery cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, **44**: 181-185.
- **Yilmaz Y., Toledo R.T. (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**: 41-48.
- **Yim H.S., Chye F.Y., Rao V., Low J.Y., Matanjun P., How S.E., Ho C.W. (2013).** Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, **50**(2): 275-283.
- **Yordi E.G., Pérez E.M., Matos M.J., Villares E.U. (2012).** Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: *Nutrition, Well-Being and Health*. Bouayed J., Bohn T. (eds). p.p. 24-48.
- **Yoshikawa T., Naito Y. (2002).** What Is Oxidative Stress? *Japan Medical Association Journal*, **45**(7): 271–276.
- **Yu M., Liu H.Z., Yang Y., Shi A.M., Liu L., Hui H., Wang Q. (2016).** Optimisation for resveratrol accumulation during peanut germination with phenylalanine feeding & ultrasound-treatment using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology* **51**: 938-945.

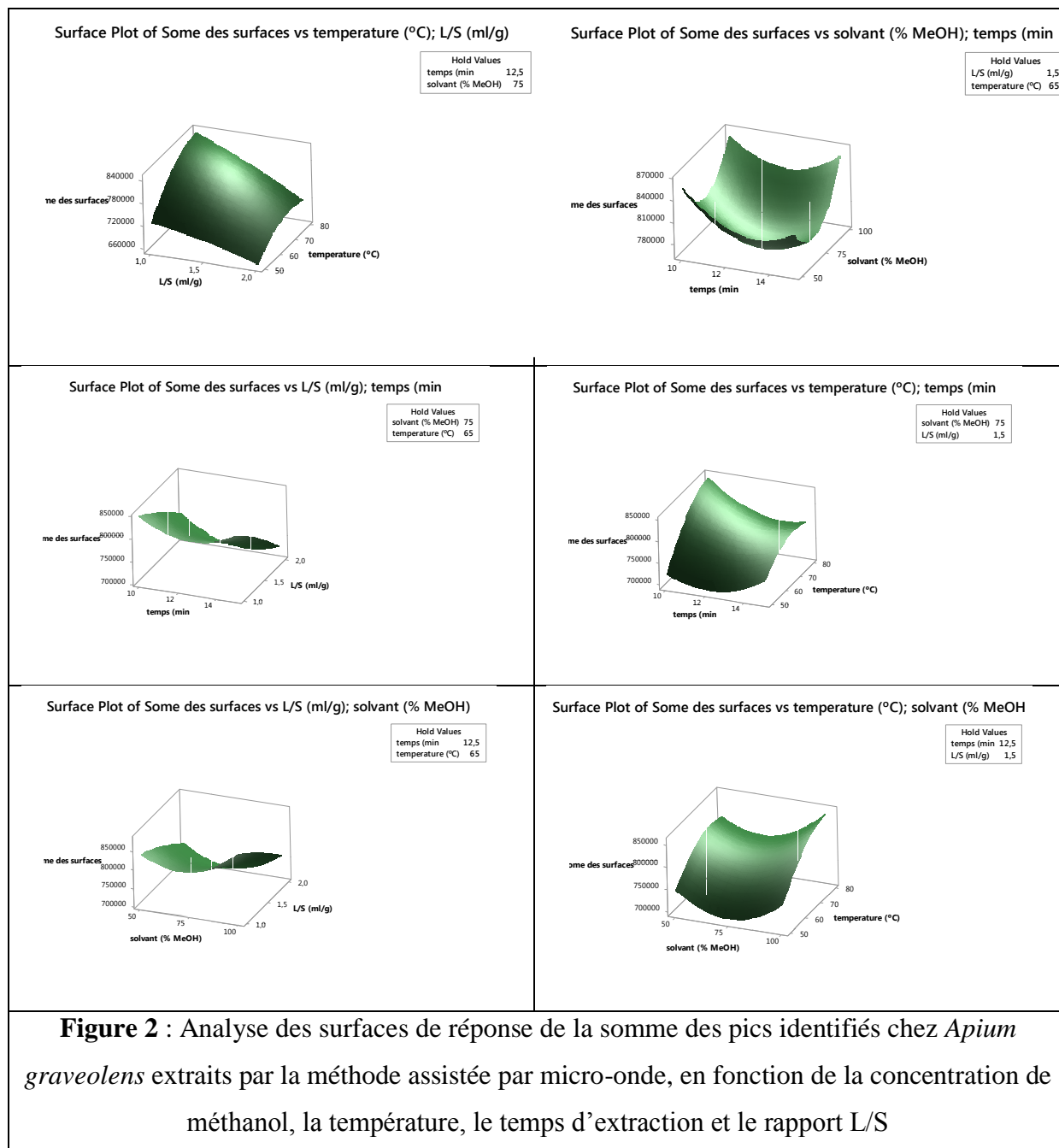
- **Zarena A.S., Sachindra N.M., Sankaret B.K.U. (2012).** Optimisation of ethanol modified supercritical carbon dioxide on the extract yield and antioxidant activity from *Garcinia mangostana* L. *Food Chemistry*, **130**: 203–208.
- **Zekovic Z., Basic A., Komes D., Vladic J., Adamovic D., Pavlic B. (2015).** Coriander seeds processing: Sequential extraction of non-polar and polar fractions using supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing* **95**: 218-227.
- **Zekovic Z., Kaplan M., Pavlic B., Olgun E. O., Vladic J., Canli O., Vidovic S. (2016).** Chemical characterization of polyphenols and volatile fraction of coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts obtained by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products* **87**: 54-63.
- **Zekovic Z., Pavlic B., Cvetanovic A., Durovic S. (2016).** Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. *Industrial Crops and Products* **94**: 353-362.
- **Zekovic Z., Vladic J., Vidovic S., Adamovic D., Pavlic B. (2016).** Optimization of microwave-assisted extraction (MAE) of coriander phenolic antioxidants - response surface methodology approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**: 4613-4622.
- **Zhang Z.S., Li, D., Wang L.J., Ozkan N., Chen X.D., Mao Z.H., Yang H.Z. (2007).** Optimization of ethanol–water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, **57**: 17-24.
- **Zhang Q., Fan X.H., Li T., Zhang Z.Q., Liu Y.K., Li X.P. (2013).** Optimisation of ultrasound extraction for flavonoids from semen *Astragali complanati* and its identification by HPLC-DAD-MS/MS. *International Journal of Food Science and Technology* **48**: 1970-1976.
- **Zulkafli Z.D. Wang H., Miyashita F., Utsumi N., Tamura K. (2014).** Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). *Journal of Supercritical Fluids*, **94**: 123–129.
- @<sup>1</sup>: [http://www.fr.sgs.com/fr/polyphenols\\_oct\\_04\\_y.gervaise.pdf](http://www.fr.sgs.com/fr/polyphenols_oct_04_y.gervaise.pdf)
- @<sup>2</sup>: [https://www.google.dz/search?q=ARTICHAUT&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi6tMediNXgAhWMxoUKHf89BcYQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=E\\_7rE2dtrBoymM](https://www.google.dz/search?q=ARTICHAUT&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi6tMediNXgAhWMxoUKHf89BcYQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=E_7rE2dtrBoymM)

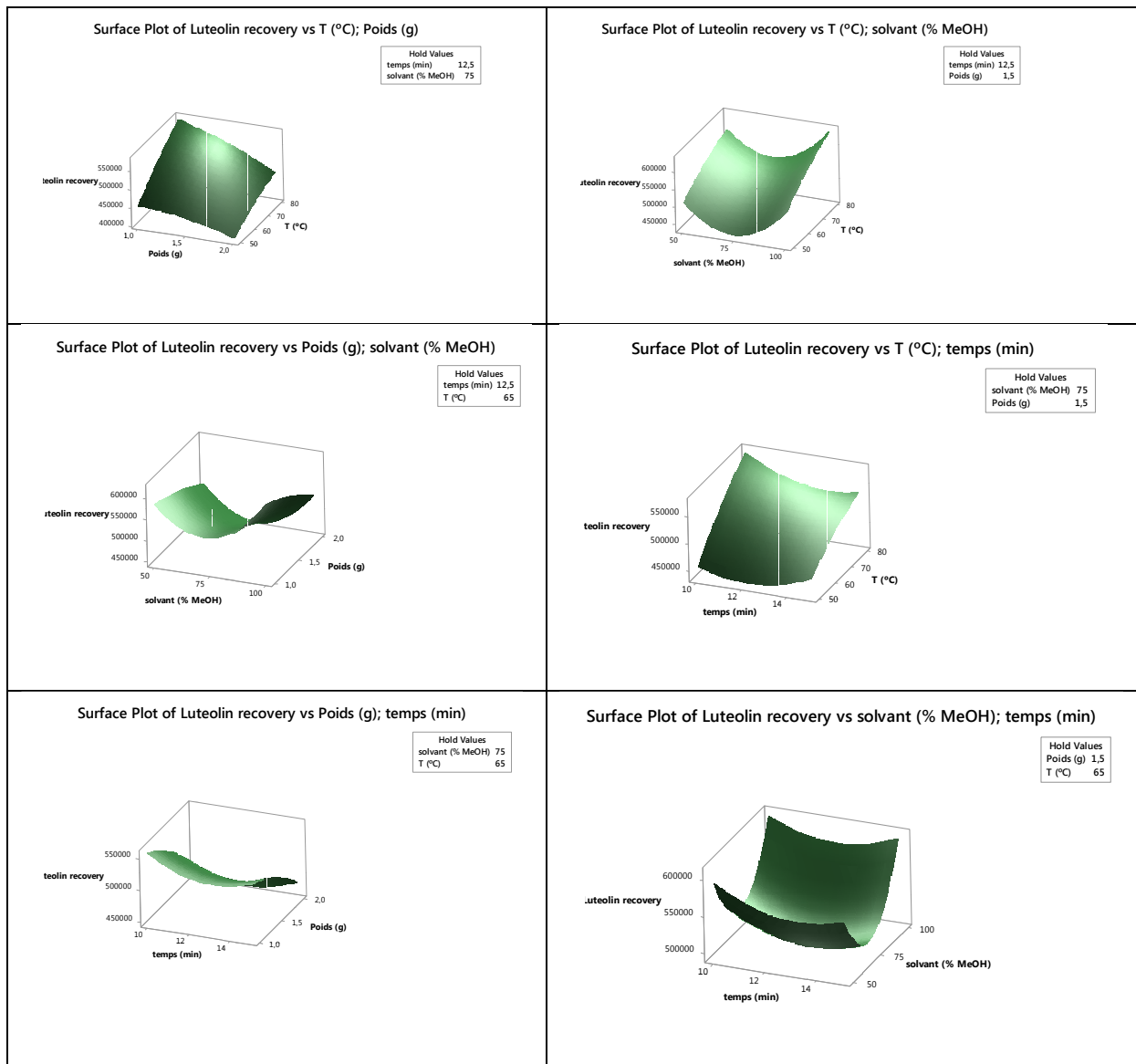
- @<sup>3</sup>:[https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=HOtyXITzJ8SCk74PgP2rkAo&q=RAISIN+NOIR&oq=RAISIN+NOIR&gs\\_l=img.3..015j0i5i30l5.52533.56737..57155...0.0..0.259.1451.1j9j1.....0....1..gws-wiz-img.....0i67j0i30.oIZ2A\\_o3j14](https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=HOtyXITzJ8SCk74PgP2rkAo&q=RAISIN+NOIR&oq=RAISIN+NOIR&gs_l=img.3..015j0i5i30l5.52533.56737..57155...0.0..0.259.1451.1j9j1.....0....1..gws-wiz-img.....0i67j0i30.oIZ2A_o3j14).
- @<sup>4</sup>:[https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=VutyXMeBMq2Ck74PyNe8mAY&q=coriandre&oq=corandre&gs\\_l=img.1.0.0i10i24.64339.66254..68275...0.0..0.165.950.2j6.....0....1..gws-wiz-img.....0i67j0j0i10j0i30j0i5i30j0i5i10i30.VioRWKT65nQ](https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=VutyXMeBMq2Ck74PyNe8mAY&q=coriandre&oq=corandre&gs_l=img.1.0.0i10i24.64339.66254..68275...0.0..0.165.950.2j6.....0....1..gws-wiz-img.....0i67j0j0i10j0i30j0i5i30j0i5i10i30.VioRWKT65nQ).
- @<sup>5</sup>:[https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=netyXKSCF8UlWTD46XAAQ&q=C%C3%A9leri&oq=C%C3%A9leri&gs\\_l=img.3...28573.30596..32900...0.0..0.0.0.....0....1..gws-wiz-img.CRHTw4E9wbI](https://www.google.dz/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=netyXKSCF8UlWTD46XAAQ&q=C%C3%A9leri&oq=C%C3%A9leri&gs_l=img.3...28573.30596..32900...0.0..0.0.0.....0....1..gws-wiz-img.CRHTw4E9wbI).



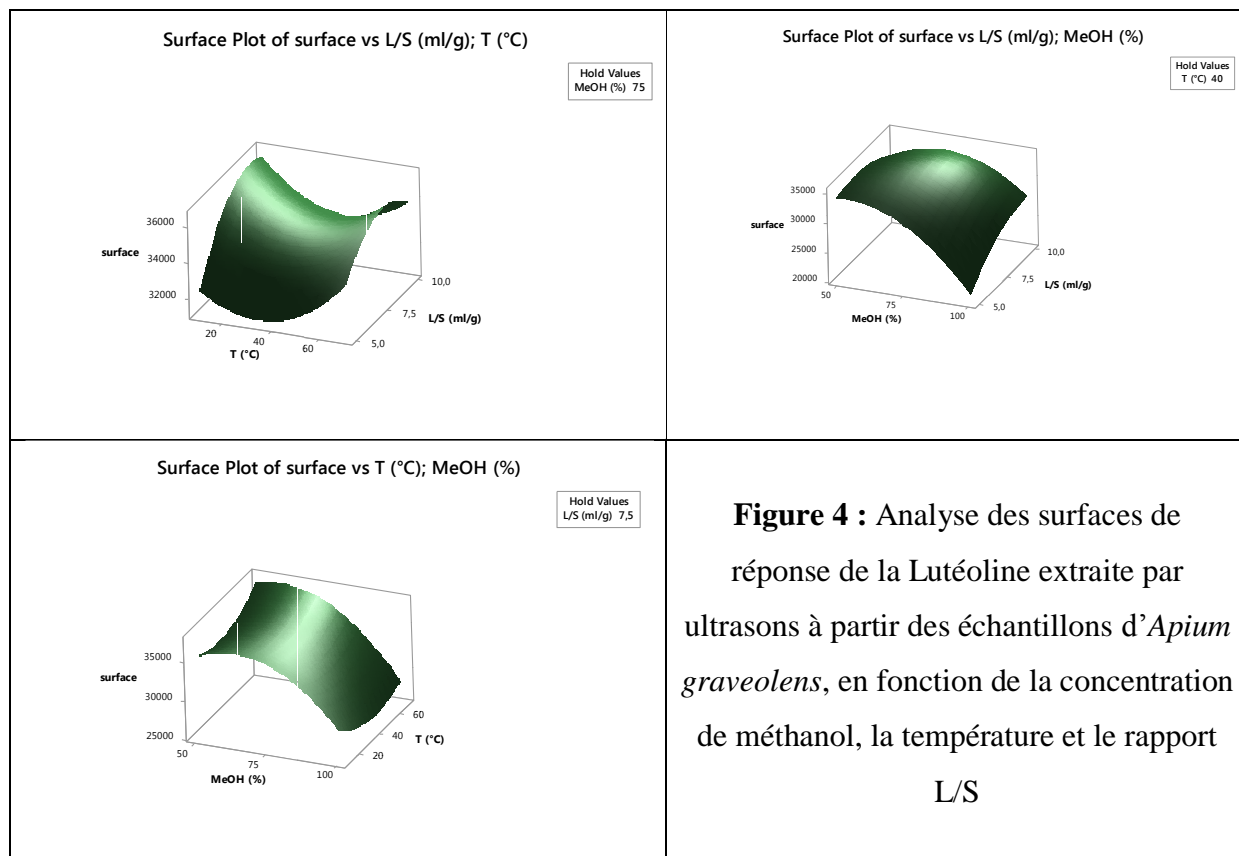
## Annexes







**Figure 3 :** Analyses des surfaces de réponse de la Lutéoline extraite par la méthode assistée par micro-onde, à partir des échantillons *d'Apium graveolens* en fonction de la concentration de méthanol, la température, le temps d'extraction et le rapport L/S



## OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION CONDITIONS FROM ARTICHOKE (*Cynara scolymus* L.), ANTIOXIDANT ACTIVITY AND COMPARISON BETWEEN FOLIN-CIOCALTEU AND UV METHODS FOR TOTAL PHENOLIC CONTENT QUANTIFICATION

Lynda MESSAOUDENE<sup>\*,\*\*</sup>, Miguel Palma LOVILLO<sup>\*\*\*</sup>, Mohammed HAZZIT<sup>\*</sup>, Réda DJEBBAR<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of food technology and human nutrition, High School of Agronomic Sciences, El Harrach, Algiers, Algeria

<sup>\*\*</sup>Laboratory of Biology and Physiology of Organisms, Faculty of Biological Sciences, University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), BabEzzouar, Algiers, Algeria

<sup>\*\*\*</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), University of Cadiz, Campus del Rio San Pedro, 11510, Puerto Real, Cádiz, Spain

Corresponding author: Réda Djebbar, Laboratory of Biology and Physiology of Organisms, Faculty of Biological Sciences, University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), BP 32 BabEzzouar 16111, Algiers, Algeria. Phone: +21321247913, fax: +21321247217, e-mail: rdjebbar@usthb.dz, reda\_djebbar@yahoo.fr

**Abstract.** Artichoke (*Cynara scolymus* L.) is well known for its various health benefits, most of which are related to the phenolic composition. The present study concerns the optimization of phenolic compounds extraction conditions from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.), the assessment of antioxidant activity and the comparison of two methods for total phenolic content quantification by spectrophotometry, Folin Ciocalteu and UV methods. The investigated parameters included methanol concentration, solvent to solid ratio and extraction time. It was found that methanol concentration and solvent to solid ratio are the most significant factor that influences the TPC. The optimal extraction conditions were found to be: 24 hours extraction time, 10 ml for solvent volume and 100 % for methanol concentration. The second variable, the DPPH scavenging capacity was strongly affected by all the studied factors. The best experimental conditions are different from those of TPC. They were found to be 1 hour extraction time, 10 ml for solvent volume and 80 % for methanol concentration. The experimental results obtained revealed a poor correlation between TPC and DPPH scavenging capacity. The last studied response is the TPC based on UV method to TPC based on FC method ratio. We had recorded a significant effect of extraction time and methanol concentration; we had recorded also a positive and significant correlation between the phenolics content determined by using the two different analytical methods. The results suggest that the UV method can be employed as an efficient and fast tool for the determination of total phenolic compounds in artichoke samples.

**Keywords:** *Cynara scolymus* L.; antioxidant activity; phenolic compounds; Folin-Ciocalteu; UV method.

### INTRODUCTION

Phenolic compounds are the most commonly used and important class of natural antioxidants [33, 60]. These compounds are the most widely distributed group of secondary metabolites in the plant kingdom and are ubiquitous in all plant organs. These bioactive substances are usually produced as a response to defend plants against pathogens and stress, and they are responsible in part for the organoleptic properties of plant foods. More than 8000 phenolic structures are currently identified and these ranged from simple molecules such as phenolic acids to highly polymerized substances such as tannins [15]. These secondary metabolites have received increasing interest in recent years from consumers and the food industry due to their flavor, color, biological properties and preventive effect against diseases associated with oxidative stress [9, 26]. Extraction of bioactive compounds from plant material is the initial and the most important step in both the analysis and exploitation of phenolic compounds [15, 65]. Several novel extraction techniques have been investigated for the extraction of phenolic compounds from plant material with the aim of improving the efficiency, extract quality, extraction time and solvent consumption [8]. However, conventional methods (maceration, decoction and Soxhlet) are still hugely preferred over newer techniques (ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction and supercritical fluid extraction). Indeed, a total of 889 publications were recorded for

phenolics based on conventional methods in comparison to 521 publications recorded for extraction of phenolic with newer technique [27]. Maceration is a traditional method which presents the advantage to be simpler, more suitable and economical in terms of instrumentation [46, 74]. The optimal extraction method should be simple and rapid for analytical and industrial applications [12, 52, 55]. The efficiency of an extraction method is influenced by several parameters, such as the chemical nature of the sample, the solvent used, agitation, extraction time, solute/solvent ratio and temperature [17, 22]. It must be noted, however, that many phenolic compounds are easily hydrolyzed and oxidized. The use of long extraction times and high temperatures increases the chance of oxidation of phenolics and this decreases the yield in the extracts [63]. Therefore, maceration methods must be carefully developed and evaluated.

A number of spectrophotometric methods have been developed for quantification of plant phenolics. These assays are based on different principles and are used to determine different structural groups present in phenolic compounds [48]. The most abundant used method in the assessment of total phenolic content of plant extracts is the Folin-Ciocalteu method (FC method). It's well known for its simplicity, easiness and availability of the chemical reagent [41]. A disadvantage of the FC method is that it is nonspecific and can be affected by other non-phenolic reducing molecules as organic acids (ascorbic, citric and tartaric acid), carbohydrates (fructose, glucose, saccharose)

[64]. Furthermore, another faster procedure based on the absorbance of the aromatic ring is employed by some authors in the order to determinate the TPC. It is the direct reading of the absorbance of the sample at 280 nm (UV method) [30, 32, 60, 68]. According to [60], measuring absorption at 280 nm seems preferable to the Folin-Ciocalteu test as it presents a number of advantages such as speed, reproducibility and assessment without reagent. However, some molecules, including cinnamic acids and chalcones, have no absorption maximum at this wavelength.

Artichoke, scientifically called (*Cynara scolymus* L.) is a diploid ( $2n=34$ ), belonging of the Asteraceae family. It is a perennial herbaceous plant with typically Mediterranean cycle. It is a highly appreciated vegetable in the Mediterranean diet due to its high nutritional and pharmacological values that are related to its composition which includes high mineral content (sodium, calcium, potassium, iron, magnesium and phosphorus), vitamins (mainly vitamin C), and high levels of inulin, which has an interesting prebiotic action on intestinal bifidobacteria [21, 53].

The edible part of the plant is the enlarged receptacle and the tender bases of bracts, which is the immature Compositae (Asteraceae) inflorescence, used worldwide as both a fresh and canned delicacy product [37, 51]. The edible portion represents 30-40 % of the plant fresh weight, depending on the variety and the harvesting time [37]. Not only is artichoke a tasty food in the Mediterranean diet but also known since ancient times in folk medicine for its choleric and diuretic effects [38]. Indeed, previous studies had confirmed that artichoke is a very good source of bioactive phytochemicals. It is known that it has a marked health protective capacity: *in vivo* and *in vitro* studies have shown its hepatoprotective functions and the inhibition of cholesterol biosynthesis in hepatocytes [20]. The healthy properties of artichoke extracts have always been related to presence of secondary metabolites such as saponins, alkaloids, tannins, steroids and in particular to the polyphenolic fraction [51].

There has been a renewed interest in this crop as a promising source of polyphenols; it represents a good source of phenolic compounds belonging to different classes: benzoic and cinnamic derivatives, flavonoids and tannins well-documented in literature. Hydroxycinnamoyl derivatives and caffeic acid derivatives are the main phenolic compounds in artichoke, with a wide range of caffeoylquinic acid derivatives with chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid) as the most important of these derivatives. Other phenolics such as the flavonoids apigenin and luteolin (both present as glucosides and rutosides) as well as different cyanidincaffeyl glucoside derivatives have been identified in artichoke tissues [20, 33, 51, 54]. Artichoke phenolics, separately or in a synergistic way, are effective antioxidants enable to scavenging peroxy radicals and, in some conditions, hydroxyl radicals *in vitro* [36].

The aim of the work described here was to use maceration as an efficient method for the extraction of phenolic compounds from artichoke. The present study Concerns the optimization of phenolic compounds extraction conditions from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.), the assessment of antioxidant activity and the comparison of two methods for total phenolic content quantification by spectrophotometry, Folin-Ciocalteu and UV methods.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and preparation of extract

The artichokes used in experiments were purchased from the local market, Algiers, Algeria. Leaves stem and bracts were manually removed, then the edible parts were recovered and ground using a coffee blender and immediately used for the extraction to avoid the oxidation of phenolic compound.

### Standards and reagents

All chemicals used are of analytical grade. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Gallic acid, DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), Sodium carbonates and pure methanol, BHT and Ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich. All aqueous solutions were prepared using bi-distilled water.

### Extraction of phenolic compounds

For the extraction of phenolic compounds, 1 g of sample was extracted with different volumes of methanol at different concentration ranging from 0%, 30%, 50%, 80%, and 100%. Then the mixtures were incubated at different time at ambient temperature. The extraction was carried out in an orbital shaker at 150 rpm. At the end of the extraction, the mixtures were centrifuged at 6000 g for 20 min. The supernatants were recovered and filtered through Whatman paper and the filtrates were stored at 4° C prior to analysis.

### Total phenolic content TPC

The phenolic content of extract was determined by use of two different methods.

*Method 1* (Folin-Ciocalteu method): in this method total phenolic content (TPC) of samples was colorimetrically measured according to previous work, with some modifications. This method is based on the reduction of a phosphowolframate-phosphomolybdate complex to blue products by phenolic compounds. An aliquot (200  $\mu$ l) of appropriately diluted extract was combined with 1 ml of Folin-Ciocalteu's reagent, and the mixture were allowed to react. After 5 min, 1 ml of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5% w/v) solution was added and shaken. The solution was kept in the dark under ambient conditions for 30 min to complete reaction. After that the absorbance was measured at 750 nm using a UV-VIB spectrophotometer (Shimadzu UV-1605).

*Method 2* (UV method): Based on direct reading of absorbance of samples and standard at 280 nm [59]. This is a faster procedure based on the absorbance of the aromatic ring [68]. In both cases, values of TPC were estimated by comparing the absorbance of each

sample with a standard response curve generated using Gallic acid.

In both methods, results are expressed as mg Gallic acid equivalents (GAE) on a dry mass basis (mg GAE/100 g dry mass).

**Antioxydant activity by DPPH method**

Free-radical scavenging capacity of extract was assessed *in vitro* by DPPH assay according to standard method with some adaptations [66]. This assay is based on the principle that DPPH\* on accepting a hydrogen (H) atom from the scavenger molecule i.e. antioxidant (extract), resulting into reduction of DPPH\* to DPPH<sub>2</sub>, the purple color changes to yellow with concomitant decrease in absorbance at 517 nm. In brief, 25 µl of extract were added to 975 µl of DPPH solution (60 µM). The reaction mixture was left in the dark under ambient conditions for 30 min. After incubation the absorbance of the solutions was measured at 517 nm. The radical scavenging capacity (RSC) expressed as a percentage was calculated by the following equation:

$RSC (\%) = (Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}$   
 Where, Abs<sub>control</sub> is the absorbance of DPPH in methanol; Abs<sub>sample</sub> is the absorbance of DPPH solution mixed with sample. All measurements were performed in triplicate (n = 3).

**Statistical analysis**

The data reported in this paper are the averages of three replicates. The experimental data were analyzed using the statistical software Minitab 17. The significance of the difference between all the terms was determined by evaluation of variance (ANOVA). Not significant ( $p > 5\%$ ), \*: significant ( $p < 5\%$ )

**RESULTS**

**Effect of experimental conditions on the total phenolic compounds content**

In the present study, the impacts of three parameters were investigated (Table 1). The significance of each effect was determined by ANOVA. It was checked using the *p*- values of the F test. Variables or combinations of variables had a significant effect on the response if  $p < 0.05$  (Table 2).

The result listed in table 2, revealed that the *p*- values were highly significant only for the solvent volume ( $p = 0.000$ ), significant for the methanol concentration with the *p*- value of 0.035. The *p*- values of the other parameters and interactions between parameters were higher than 0.05, it indicated that they were not significant.

Table 1. Factor Information

Factor	Levels	Values
Time (h)	3	1; 12; 24
Methanol concentration (%)	5	0; 30; 50; 80; 100
Solvent volume (ml)	4	10; 20; 30; 40

Table 2. Analysis of Variance

Source	DF	F-Value	P-Value
Time (h)	2	2.42	0.111
Methanol concentration	4	3.08	0.035*
Solvent volume	3	60.70	0.000*
Time*Methanol	8	2.34	0.051
Methanol*Solvent volume	12	1.54	0.177
Time *Solvent volume	6	0.71	0.648
Error	24	N/A	N/A
Total	59	N/A	N/A

Note: DF: degree of freedom; N/A: not available; R<sup>2</sup> (determination coefficient) = 90.93%; R (correlation coefficient) = 0.95

**Effect of the extraction solvent**

The effects of the methanol concentration in extracting polyphenols were studied by testing 5 levels of methanol concentration (0 %, 30 %, 50 %, 80 %, and 100 %). These results showed that the total phenolic compounds content (TPC) varied greatly among different concentrations of methanol with a *p*-value of 0.035. This indicated the possible influence of methanol concentration on total phenolic contents. An increase in the TPC was recorded with the increase of methanol concentration as illustrated in Figure 1.

Among all the extracts, 100 % methanol was found to be the most efficient solvent for extracting maximum of phenolic compounds from artichoke samples, when compared with all other solvent systems used. The level of these compounds ranged from 2.8 to 171.9 mg GAE \* 100 g<sup>-1</sup> dry weight with 100 % methanol.

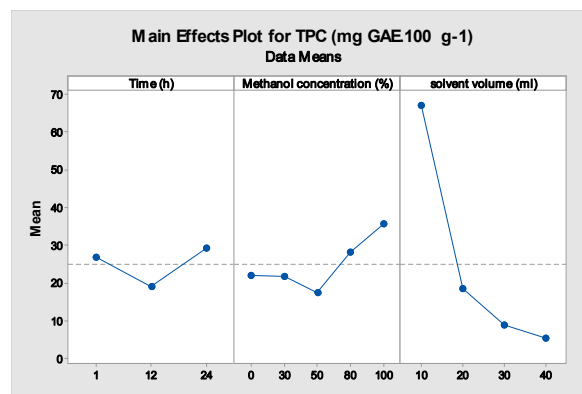


Figure 1. Main effect plots for the TPC (mg GAE \* 100 g<sup>-1</sup> dry mass)

**Effect of solvent volume**

The influence of solvent to solid ratio was studied by carrying out extraction of the same quantities of artichoke samples (1 g) in different volumes of solvent. Various solvent volumes were tested (10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml). It can be seen from the results in Table 2 that the TPC was strongly affected by the volume of solvent with *p*- value of 0.000. The effect of this parameter was illustrated with the two other variables shown in Figure 1. The highest values of TPC were recorded by 10 ml of solvent.

### Effect of extraction time

The results suggested that the extraction time had a negligible effect on the recovery of total phenols with a  $p$ -value of  $0.111 > 0.05$ .

### Optimization of the response

The optimization of extraction conditions were carried out using Minitab statistical software based on the experimental results in order to maximize the recovery of total polyphenols extracted from the vegetative parts of artichoke samples. The final results suggested that the extraction of 1 g of artichoke sample in 10 ml of methanol (100 %) for 24 hours was the best combination which allows obtaining the highest recovery of total polyphenols (Table 3). As represented in Figure 2, the extraction time of 24 h allowed recovering the highest amount of phenolic compounds for all the solvent volumes.

**Table 3.** TPC values under optimal conditions of methanol concentration (100 %), extraction time (24 h) and solvent volume (10 ml)

Response	Predicted value	Experimental value
TPC (mg GAE.100g <sup>-1</sup> Dry mass)	142.08 (SD: 64.78)	171.9 (SD: 20)

Note: SE: standard deviation

### Effect of the experimental conditions on the DPPH scavenging activity

Overall, the results obtained revealed that the  $R^2$  value is closer to one (0.9457); it implied a good correlation between observed and predicted values, and suggested that the model as fitting could explain 94.57 % of the results. According to the statistical results, the developed model can be applied efficiently in the prediction of the responses.

The significance of each parameter was determined using  $F$  Tests and  $p$ -values (Table 5).

**Table 4.** Factor Information

Factor	Levels	Values
Time (h)	3	1; 12; 24
Methanol concentration (%)	5	0; 30; 50; 80; 100
Solvent volume (ml)	4	10; 20; 30; 40

**Table 5.** Analysis of the variance

Source	DF	F-Value	P-Value
Time (h)	2	16.58	0.000
Methanol concentration	4	55.69	0.000*
Solvent volume	3	10.16	0.000*
Time*Methanol	8	8.95	0.000*
Time *Solvent volume	6	2.08	0.093
Methanol*Solvent volume	12	3.94	0.000*
Error	24	N/A	N/A
Total	59	N/A	N/A

Note: DF: degree of freedom; N/A: not available;  $R^2$  (determination coefficient) = 94.57 %; R (correlation coefficient) = 0.972

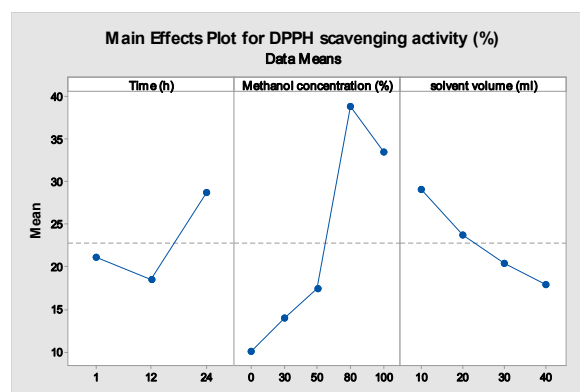
The result listed in table 5, revealed that the  $p$ -values were highly significant for the solvent volume, methanol concentration, extraction time, interaction between extraction time and methanol concentration, and the interaction between methanol concentration and solvent volume with the  $p$ -values lower than 0.05. Only the interaction between extraction time and solvent volume did not have an impact on the antioxidant capacity with the  $p$ -values of 0.093 ( $>0.05$ ).

### Effect of methanol concentration

The percentage of inhibition of the DPPH radical was ranging between 4 and 70.9 %. Despite some of our extract showed a good antioxidant capacity, it can be seen that the capacity of inhibition of the DPPH radical by BHT and Ascorbic acid was better.

In our study, methanol concentration was the main factor influencing the antioxidant capacity with the highest  $F$  value (55.69). Indeed, it can be clearly seen that the percentage of DPPH inhibition increase with the increase of methanol concentration. An increase in antioxidant capacity was observed with increasing of solvent concentration. The maximum yield was registered by 80 % methanol, there after it decreased at the higher concentrations as shown in Figure 2.

The evaluation of antioxidant capacity by determination of the efficiency concentration inhibiting 50 % of DPPH molecules ( $IC_{50}$ ) supported the first results. Only the extracts obtained by 80 % methanol have reached 50 % of inhibition. The  $IC_{50}$  is also lower than the  $IC_{50}$  recorded for BHT and Ascorbic acid.



**Figure 2.** Main effect plots for the DPPH scavenging capacity of the phenolic compounds

### Effect of solvent volume

It can be observed that solid to solvent ratio exert significant effect on the DPPH scavenging capacity ( $p$ -value =  $0.000 < 0.05$ ). 1:10 appeared to be the best solid- solvent ratio for extracting antioxidants and antioxidant activity in artichoke samples. The lower solvent volume (10 ml) showed the best TFC and DPPH scavenging activity as shown in figure 2.

### Effect of extraction time

According to results listed in Table 5, the extraction time had significant effect ( $p < 0.05$ ) on DPPH scavenging capacity.



The maximum concentration of phenolic compounds was achieved at 24 hours extraction time. In term of antioxidant capacity, it was observed that the DPPH scavenging activity decreased after reaching a maximum value at 1 hour (Figure 2).

**Optimization of the response**

The optimization of extraction conditions were carried out using Minitab statistical software based on the experimental results in order to maximize the DPPH scavenging capacity of total polyphenols extracted from the vegetative parts of artichoke. The final results suggested that the extraction of 1 g of artichoke sample in 10 ml of 80 % methanol for 1 hour was the best combination which allows obtaining the highest antioxidant capacity (Table 6).

**Table 6.** Antioxidant capacity under optimal conditions (methanol concentration (80 %), extraction time (1 h) and solvent volume (10 ml))

Response	Predicted value	Experimental value
DPPH scavenging capacity (%)	66.19 (SD: 30.6)	70.90 (SD: 5)

Note: SD: standard deviation

The results listed in the table 6 revealed a value of 70.90 % for the observed antioxidant capacity which is in close agreement with the predicted value (66.19 % ± 30.6) and the relative error was found to be very low (4.8 < 5). Because of the lower relative error obtained by comparison of the predicted and observed values the adequacy of the model in predicting the response was confirmed. Based on the results listed in Table 3 and Table 6, the found best conditions for maximize TPC are different from those of DPPH scavenging capacity.

**Comparison between the UV method and the Folin-Ciocalteu method (FC method)**

The results of statistical analysis of the impact of the three studied parameters on the ratio TPC (280)/TPC (FC) are summarized in Table 7. The ratio was mainly influenced by the methanol concentration, extraction time and the interaction between them. The p- values were lower than 0.05, with a high R<sup>2</sup> value (96.05%).

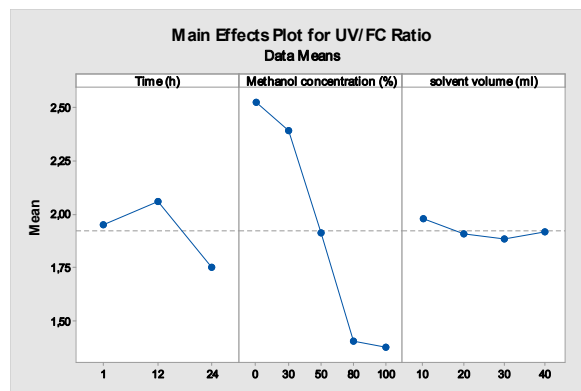
**Table 7.** Analysis of the variance

Source	DF	F-Value	P-Value
Time (h)	2	14.94	0.000*
Methanol concentration	4	106.93	0.000*
Solvent volume	3	0.84	0.487
Time*Methanol	8	12.25	0.000*
Time *Solvent volume	6	0.74	0.622
Methanol*Solvent volume	12	1.79	0.109
Error	24	N/A	N/A
Total	59	N/A	N/A

Note: DF: degree of freedom; N/A: not available R<sup>2</sup> (determination coefficient) = 96.05%; R (correlation coefficient) = 0.98

Solvent system without methanol (0 % methanol): The TPC determined by direct absorbance at 280 nm is three times higher than the value of TPC measured by the FC. It means that the UV method overestimated the TPC.

Solvent system with methanol: We have noticed that the ratio (UV / FC) decreased proportionally with the increase of the methanol concentration as illustrated in Figure 3.



**Figure 3.** Main effect plots for the TPC based on UV / TPC based on FC ratio

Based on statistical analysis; a very high correlations were revealed between TPC based on UV method and TPC based on FC method. The calculated correlation coefficients (R) are between 0.988 and 0.996 for the methanol concentrations (Fig. 4). These results are in agreement with those reported by [76]. They confirmed the existence of positive and significant correlation between the two analytical methods with a correlation coefficient (R) of 0.94.

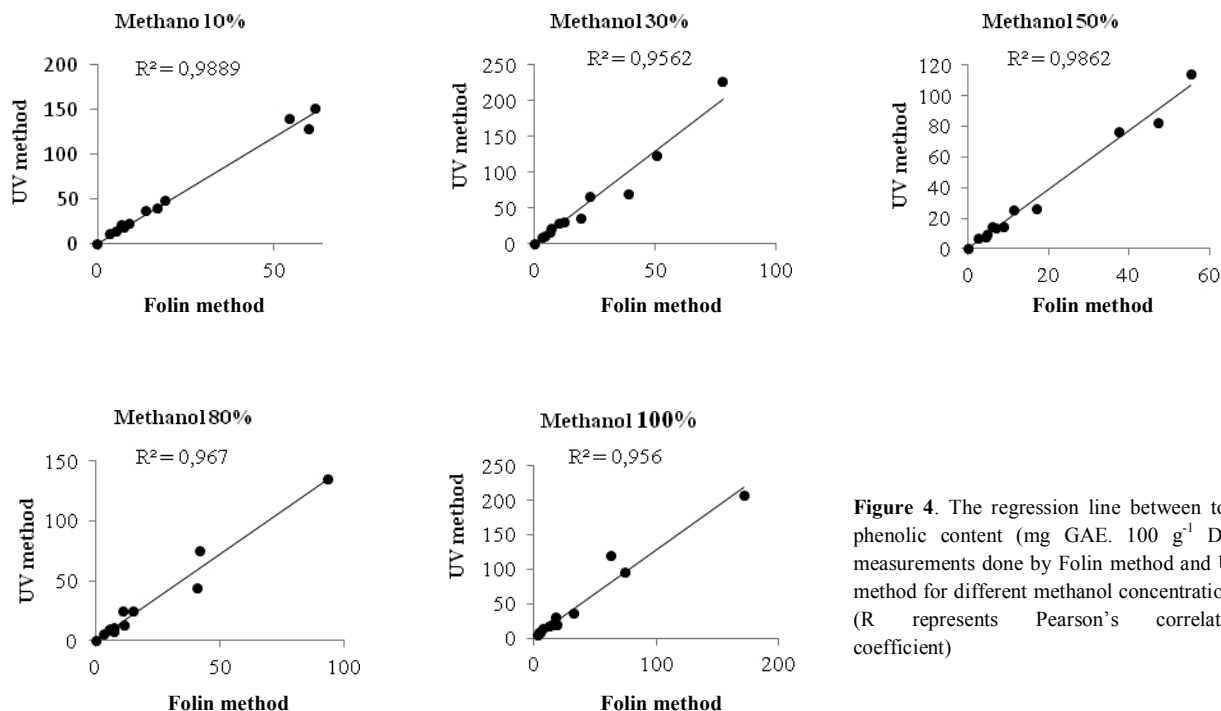
**DISCUSSION**

**Effect of experimental conditions on the total phenolic compounds content**

Several factors such as type and concentration of solvent, temperature, time and pH significantly affect the quantity of polyphenols [69, 70].

**Effect of the extraction solvent**

Amongst the extraction parameters, solvent extraction plays a pivotal role in almost of extraction methods. The recovery of phenolic contents is strongly influenced by the polarity of extracting solvents and the solubility of the studied compound in the solvent used for the extraction process [3]. The mainly used solvents are alcohols: the methanol represents the most employed one followed by the ethanol [59, 68, 43]. Methanol is an organic solvent well known for its efficiency in the extraction of phenolic compound comparatively to the other solvent [16, 18, 28, 56]. Several earlier studies have measured the effect of different solvents in total phenolic compounds and mentioned that methanol is the solvent more efficient in the extraction of phenolic compound from different spices of vegetables [35].



**Figure 4.** The regression line between total phenolic content (mg GAE. 100 g<sup>-1</sup> DM) measurements done by Folin method and UV method for different methanol concentrations. (R represents Pearson's correlation coefficient)

Methanol (100 %) is more appropriate to be used for extraction of phenolic compounds from different samples of artichoke than the mixture with water. It means that the major part of the phenolic compounds contained by the studied vegetable is not soluble in water. Our results are in agreement with previous works relating to the extraction of phenolic compounds from artichoke [42]. In some case the use of mono-solvent system is recommended. As published by Chew *et al.* [13]; the highest recovery of tannins was exhibited at 100% ethanol concentration (mono-solvent). This result could be due to most of tannins presented in bounded or polymerized forms which were more soluble in moderate polar/ weak polar extraction medium. In addition the permeability of solvent into the solid matrix may be achieved by higher concentration of solvent

Our results are in disagreement with the finding of other previous works. They documented that some classes of phenolic compound like phenolic acids present a high polarity and their recovery decreases when the extraction was carried out with pure solvents [69]. In fact only 91.1% of the total phenolic acids were recovered with 100% methanol [39]. Since polyphenols have a wide range of solubility, a mixture of solvent and water may be desirable and effective for separation than single solvents [47, 68]. According to Luthria *et al.* [40], the addition of water to organic solvent induces a swelling of plant material thereby facilitating the penetration of solvent into the solid matrix and improves the extraction of the phenolic compounds. In addition, some phenolic compounds are present in the solid matrix as glycosides, and the sugar makes them more water soluble [2]. Although the

addition of water to the solvent system is essential, its quantity must be controlled to avoid the extraction of non-phenolic compounds [25].

#### Effect of solvent volume

The extraction of bioactive compounds from solid matrix to the solvent is related to the solid - solvent ratio. The Total phenolic content is better when a higher solid-solvent ration is used. It may be explained by the principles of mass transfer; the driving force during mass transfer is the concentration gradient between the solid and the bulk of the liquid, the mass transfer of The transfer is better when a higher solid - solvent ratio is used [39, 45]. When the solvent reach his saturation with the extracted phenolic compounds, the gradient becomes null and the phenomena stops [62]. This is not the case of our results.

Similar results regarding the effect of the solvent-to-solid ratio on the extraction of phenolic compounds have been reported by [45]. Some authors reported a great influence of solid to solvent ratio on the TPC in parsley extracts [39]. However in other published studies; the level of solvent to solid ratio was ineffective in the extraction process. It did not contribute to the release of phenolic compounds from plant material cells [25, 44]. This difference can be attributed to the type and the complexity of plant materials studied and also the phenolic compound considered [76].

#### Effect of extraction time

Some studies confirmed the non-significant effect of time extraction on the recovery of phenolic compounds [2]. Nevertheless, other authors reported that extraction time had a pivotal role in the extraction process of phenolic compounds [8]. Based on their

results, some authors have documented that maceration time of 1 h was determined to be sufficient and time efficient [46], in contrary to our results which revealed that the efficient time to recover a maximum of plant phenolic is 24 h.

The mass transfer from plant material to solvent was related to time and temperature. The mass transfer increase with time until the maximum of extraction was achieved [6]. 24 hours represented the necessary incubation duration for solvent to reach the plant matrix and extract a maximum of phenolic compounds. Using a long extraction time generally had only a small positive effect on the extraction yield, while increasing the possibility of degradation of phytochemicals. As stated by [48] and [13], prolonged extraction time would increase the chance for occurrence of oxidation of phenolic compounds.

#### **Effect of the experimental conditions on the DPPH scavenging activity**

Antioxidants are important substances which possess the ability to protect the cell from damage caused by free radical induced oxidative stress [5]. The antioxidant potential of different plant extracts and pure compounds can be measured using several *in vitro* assays. Each of these tests is based on one feature of the antioxidant activity, such as the ability to scavenge free radicals or the inhibition of lipid peroxidation [10]. In the DPPH test, the ability of the investigated artichoke extracts to act as donors of hydrogen atoms or electrons in transformation of DPPH radical into its reduced form DPPH<sub>2</sub>-H was investigated. Several extraction procedures using different sequences of solvents at different solid to solvent ratio and times were used in this work to investigate their impact on the DPPH scavenging capacity (Table 4).

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) is a very stable organic free radical and presents the ability of accepting an electron or hydrogen radical. We have chosen this colorimetric method taking into consideration on its low cost, easiness, its efficiency and fast evaluation of antioxidant activity [1]. The amount of crude extract required for a 50% inhibition of the DPPH radical presents in the reaction mixture (efficient concentration EC 50 % otherwise called the IC<sub>50</sub> value) was used as a measure for the radical scavenging activity. This parameter is defined as the concentration of substrate that causes 50% loss of the DPPH activity (color) [58]. Strong radical scavenging activity is associated with low EC 50 % values [4].

#### **Effect of methanol concentration**

In our study, methanol concentration is the main factor influencing the antioxidant capacity with the highest *F* value (55.68). The same result was reported by [13], but the considered solvent was ethanol. It means that the concentration of solvent influence greatly the antioxidant capacity of plant extracts. According to the *p*- values and *F* values, the capacity of inhibition of DPPH radical was significantly affected by the variation of methanol concentrations. It can be clearly seen that the percentage of DPPH

inhibition increases with the increase of methanol concentration. This was probably due to the increase in solubility of phenolic compounds.

80 % methanol has a greater effectiveness in extracting the substances which possessed antioxidant properties. Their content decreased at the higher concentrations of methanol, consequently the DPPH activity of extracts decreased as shown in Figure 2. This finding was probably due to the influence exerted by the solvent on the cellular structures [56]. Previous work reported that methanol increased the extraction of flavan-3-ols, it would be expected to also improve extraction of proanthocyanidins, which are oligomers and polymers of flavan-3-ols [46]. These components are known for their antioxidant properties.

Our results are in disagreement with the previous results. It was mentioned that the highest scavenging capacity of phenolic extracted from apple samples are obtained by the methanol without water [45]. Another study reported that 60 % methanol led to obtain the highest antioxidant capacity [4]. It may be due to the difference in the plant materials.

#### **Effect of solid- solvent ratio**

The concentration of total phenolics and the antioxidant activity of the extracts depend on the solid-solvent ratio. The increase of solvent volume increases both the extraction efficiency and the price of the extract, and decreasing the solvent volume lowers the extraction efficiency due to saturation effects, but decreases the cost [57]. However, this phenomenon was not observed in this study as low solvent volume (10 ml) showed best TFC and DPPH scavenging activity as shown in figure 2. This may be explained by the fact that the interaction among bioactive compounds coming into contact with extracting solvent expands as a result of high extraction solvent and this led to increase the extraction of phenolic components [67, 79].

A similar study was reported by [65] on the effect of solid-to-solvent ratio on the antioxidant properties of phenolics extracted from *Guiera senegalensis*. In that study, the strongest DPPH scavenging capacity was obtained for the same solid-solvent ratio (1: 10). In contrast, [71] documented that the DPPH scavenging capacity increased gradually with the increase of solvent volume from 10 to 60 ml.

#### **Effect of extraction time**

Extraction time is crucial in minimizing energy and cost of the extraction process [13]. The maximum concentration of phenolic compounds was achieved at extraction time of 24 hours. In term of antioxidant capacity, it was observed that the DPPH scavenging activity was decreased after reaching a maximum value at 1 hour (Figure 2). It is suggested that prolonged extraction time would lead to exposure of more oxygen, light and temperature, and thus increase the chances for occurrence of oxidation on phenolic compounds [48, 15].

In according to other literature results [14, 23, 24, 72, 79], the antioxidant capacity is closely dependent

on the choice of an appropriate extraction time. The extraction time had a remarkable impact on the DPPH scavenging capacity ( $p < 0.05$ ). However the results of the study carried out on 6 varieties of lentil suggested that extraction time had a negligible effect on antioxidant properties of phenolic extracts [2, 46]. This difference can be attributed to the type and the complexity of plant materials studied and also the phenolic compound considered [5, 67, 75]. Also, the contradictory results are most probably due to differences in the experimental conditions used in different assays [10].

#### **Comparison between the UV method and the FC method**

According to [48], the traditional spectroscopic assays may lead to overestimation of polyphenolic contents of crude extracts from plant materials due to the overlapping of spectral responses, and this may be the explication to the overestimation of the TPC by the UV method in the absence of methanol.

We have noticed that the ratio (UV / FC) decreased proportionally with the decrease of the water concentration in the solvent system and, then, inversely with the methanol concentration.

An opposite finding was reported by [68]. They documented that an increase of water content of ethanol was statistically influent in improving extraction yield for UV method. The reduction of water concentration in the solvent system allowed decreasing the extraction of hydro-soluble compounds such as protein which are non-phenolic components and have an absorption maximum at 280 nm. In this way, we will be sure that the measured absorbance at 280 nm did not include non-phenolic compounds. In fact, for the less water concentrations (80%, and 100 % methanol), the ratio is closer to 1. This result signified that both FC method and the UV method gave the same evaluation of phenolic compounds. Previous study supported our result and they reported that the UV method is affected by the nature of solvent employed and the pH of the solution [48]. Moreover, the possibility of interference by UV-absorbing substances such as proteins, nucleic acids and amino acids should be considered.

Contrary to our results, [68] found that the TPC based on UV method is lower to than those based on FC method and they attributed this difference to the different principle of the two analytical methods: reaction with an oxidizing reagent in the Folin–Ciocalteu analysis and absorption of the aromatic ring in direct reading at 280 nm. These contradictory results can be due to the difference in the plant material and in the chemical composition of the studied extracts. Our results are in agreement with those reported by [77]. They confirmed the existence of positive and significant correlation between the two analytical methods with a correlation coefficient (R) of 0.94.

In conclusion, the results showed statistically significant impact of these factors on the total phenolic compounds content. The best extraction yield of

phenolic compounds was obtained when extraction was carried out for 24 hours with 100 % methanol and for solid: solvent ration of 1 : 10 (g : ml). Interestingly, these optimal extraction conditions did not match the highest antioxidant activity whose extraction conditions corresponded to 1 h, 80 % methanol and solid: solvent ratio of 1 : 10. These results suggest that when long extraction time is used, phenolic compounds are easily hydrolyzed and oxidized. Moreover, our study showed a strong positive correlation between TPC evaluated by the UV and the FC methods whatever used methanol concentration. As the UV:FC ratio was closer to one, mainly for 80 % and 100 % methanol extraction, that means that the TPC gave by the two analytic methods is similar. Then the UV method can be used to evaluate the total phenolic content since it is direct, faster and easier when compared with FC method.

#### **REFERENCES**

- [1] Abozed, S.S., El-kalyoubi, M., Abdelrashid, A., Salama, M. F., (2014): Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. *Annals of Agricultural Science*, 59(1): 63-67.
- [2] Alberti, A., Ferreira, Z.A.A., Zardo, D.M., Demiate, I.M., Nogueira, A., Mafra, L.I., (2014): Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149: 151-158.
- [3] Alothman, M., Bhat, R., Karim, A.A., (2009): Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115: 785-788.
- [4] Aumarawanna, Wannapornk, (2016): Effect of methanol concentration on total phenolic content, antioxidant activity and antibacterial activity of spent coffee ground extract. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 4(2): 132-135.
- [5] Bachir bey, M., Meziat, L., Benchikh, Y., Louaileche, H., (2014): Deployment of réponse surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. *Azenjar*) total phenolic compounds and anti-oxydant activity. *Food chemistry*, 162: 277-282.
- [6] Badakhshan, M.P., Subramanion, L.J., Lachimanan, Y.L., Yeng, C., Sreenivasan, S., (2012): Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(12): 960-965.
- [7] Baiano, A., Bevilacqua, L., Terracone, C., Conto, F., Del Nobile, M.A., (2014): Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *Journal of Food Engineering*, 120: 135–145.
- [8] Baiano, A., Del Nobile, M.A., (2016): Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12): 2053-2068.
- [9] Bower, A., Marquez, S., de Mejia, E.G., (2016): The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16): 2728-2746.

- [10] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igić, R., (2008): Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chemistry, 111: 925-929.
- [11] Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuna, C., Jamett, F., (2014): High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. LWT - Food Science and Technology, 60(1): 525-534.
- [12] Chan, C.H., See, T.Y., Yusoff, R., Ngoh, G.C., Kow, K.W., (2017): Extraction of bioactives from *Orthosiphon stamineus* using microwave and ultrasound-assisted techniques: Process optimization and scale up. Food Chemistry, 221: 1382-1387.
- [13] Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan, A.W.M., Ho, C.W., (2011): Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. International Food Research Journal, 18: 571-578.
- [14] Chuyen, H.V., Roach, P.D., Golding, J.B., Parks, S.E., Nguyen, M.H., (2017): Optimisation of extraction conditions for recovering carotenoids and antioxidant capacity from Gac peel using response surface methodology. International Journal of Food Science and Technology, 52: 972-980.
- [15] Dai, J., Mumper, R.J., (2012): Plant phenolics: extraction, analysis and their anti-oxidant and anticancer properties. Molecules, 15: 7313-7352.
- [16] Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B., Hosni, K., (2012): Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). Journal of Functional Foods, 4: 423-432.
- [17] Espada-Bellido, E., Ferreira-Gonzalez, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C.G., Barbero, G.F., (2017): Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. Food Chemistry, 219: 23-32.
- [18] Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E., (2008): Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food and Chemical Toxicology 46: 3774-3779.
- [19] Feng, S., Luo, Z., Tao, B., Chen, C., (2015): Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. Lwt-Food Science and Technology, 60(2): 970-976.
- [20] Ferracane, R., Pellegrini, N., Visconti, A., Graziani, G., Chiavaro, E., Miglio, C., Fogliano, V., (2008): Effects of Different Cooking Methods on Antioxidant Profile, Antioxidant Capacity, and Physical Characteristics of Artichoke. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56: 8601-8608.
- [21] García-Martínez, N., Andreo-Martínez, P., Almela, A., (2017): Characterization of Six Artichoke Cultivars and Their Suitability for Agro-industrial Processing. Journal of Food and Nutrition Research, 5(4): 234-242.
- [22] Goh, K.M., Lai, O.M., Abas, F., Tan, C.P., (2017): Effects of sonication on the extraction of free-amino acids from moromi and application to the laboratory scale rapid fermentation of soy sauce. Food Chemistry, 215: 200-208.
- [23] González-Montelongo, R., Lobo, M.G., González, M., (2010): The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. Separation and Purification Technology, 71: 347-355.
- [24] Gope, P.S., Dutta, A.K., Makhnoon, S., Banik, S., Siddiquee, M.A., Kabir, Y., (2014): Effect of solvent and extraction time on the antioxidant properties of *Citrus macroptera*. International Journal of Drug Development and Research, 6(2): 28-35.
- [25] Ilaiyaraja, N., Likhith, K., Sharath, B.G.R., Khanum, F., (2015): Optimization of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). Food chemistry, 173: 348-354.
- [26] Joseph, S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B.M. (2016): Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(3): 419-444.
- [27] Kala, H.K., Mehta, R., Tandey, R., Sen, K.K., Mandal, V., (2016): Ten years of research on phenolics (2005 - 2015): A status report. Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering, 18(1): 1-4.
- [28] Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., Chaabouni, S.E., (2015): Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. Industrial Crops and Products, 62: 34-41.
- [29] Kankara, S.S., Mustafa, M., Ibrahim, H., Nulit, R., Go, R., (2014): Effect of Drying Methods, Solid-Solvent Ratio, Extraction Time and Extraction Temperature on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) Leaves Water Extract. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2(12): 1378-1392.
- [30] Katalinić, V., Maleš, P., (1997): Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. Journal of Wine Research, 8(3): 169-177.
- [31] Katalinić, V., (1999): Grape Catechins-Natural Antioxidants. Journal of Wine Research, 10(1): 15-23.
- [32] Kchaou, W., Abbès, F., Blecker, C., Attia, H., Besbes, S., (2013): Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). Industrial Crops and Products, 45: 262-269.
- [33] Kollia, E., Markaki, P., Zoumpoulakis, P., Proestos, C., (2016): Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques. Natural Product Research, 31(10): 1163-1167.
- [34] Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., (2011): A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing, 89(C3): 217-233.
- [35] Lafka, T.L., Lazou, A.E., Sinanoglou, V.J., Lazos, E.S., (2011): Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. Food Chemistry, 125: 92-98.
- [36] Lattanzio, V., Cicco, N., (2005): Antioxidant Activities of Artichoke Phenolics. Acta horticulturae, 681: 421-428.
- [37] Lombardo, S., Pandino, G., Mauro, R., Mauromicale, G., (2009): Variation of Phenolic Content in Globe Artichoke in Relation to Biological, Technical and Environmental Factors. Italian Journal of Agronomy, 4: 181-189.

- [38] Lombardo, S., Pandino, G., Knödler, M., Carle, R., Schieber, A., (2010): Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, 119: 1175-1181.
- [39] Luthria, D.L., (2008): Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 107: 745-752.
- [40] Luthria, D.L., (2012): Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. *Journal of functional foods*, 4: 842-850.
- [41] Magalhães, L.M., Santos, F., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., (2010): Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83: 441-447.
- [42] Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N., (2013): Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie Journal*, 9: 35-40.
- [43] Marinova, G., Batchvarov V., (2011): Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1): 11-24.
- [44] Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, K.A., Mussatto, S.I., (2013): Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108: 152-158.
- [45] Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., (2012): Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130: 986-993.
- [46] Mirali, M., Ambrose, S., Wood, S.A., Vandenberg, A., Purves, R.W., (2014): Development of a fast extraction method and optimization of liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of phenolic compounds in lentil seed coats. *Journal of Chromatography B*, 969: 149-161.
- [47] Mokrani, A., Madani, K., (2016): Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162: 68-76.
- [48] Naczki, M., Shahidi, F., (2006): Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- [49] Naczki, M., Zadernowski, R., Shahidi, F., (2007): Antioxidant Capacity of Phenolic Extracts from Selected Food By-Products. pp. 184-194. In Shahidi, F., Ho, C.T. (eds.): *Antioxidant Measurement and Applications*. Michigan University.
- [50] Oliveira, A.P., Valentão, P., Pereira, J.A., Silva, B.M., Tavares, F., Andrade, P.B., (2009): *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2841-2846.
- [51] Palermo, M., Colla, G., Barbieri, G., Fogliano, V., (2013): Polyphenol Metabolite Profile of Artichoke Is Modulated by Agronomical Practices and Cooking Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 7960-7968.
- [52] Palma, M., Barbero, G.F., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C.G., Rostagno, M.A., Prado, J.M., Meireles, M.A.A., (2013): Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. pp. 58-88. In Rostagno, M.A., Prado, J.M. (eds.): *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Cambridge.
- [53] Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G., (2011): Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 148-153.
- [54] Petropoulos, S.A., Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., (2017): Leaf parts from Greek artichoke genotypes as a good source of bioactive compounds and antioxidants. *Food & Function*, 8: 2222-2029.
- [55] Pothitirat, W., Chomnawang, M.T., Supabphol, R., Gritsanapan, W., (2010): Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, 80: 442-447.
- [56] Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., Jiang, Y., (2009): Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 155-159.
- [57] Predescu, N.C., Papuc, C., Nicorescu, V., Gajaila, I., Goran, G.V., Petcu, D., Ștefan, G., (2016): The Influence of Solid-to-Solvent Ratio and Extraction Method on Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Properties of Some Ethanolic Plant Extracts. *Revue de Chimie*, 67(10): 1922-1927.
- [58] Proestos, C., Varzakas, T., (2017): Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation. *Foods*, 6(28): 1-7.
- [59] Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A.F., Subramaniam, S., Abdul-Aziz, A., (2012): Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chemistry*, 131: 441-448.
- [60] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., (2000): *Handbook of Enology. The chemistry of wine Stabilization and Treatments*, 2: 157-162.
- [61] Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliar, V., Genovese, M.I., De Souza, A.E., Gonçalves, S., Fett, R., (2011): Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127: 174-179.
- [62] Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., Fernandes, F.A.N.N., (2008): Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 95-100.
- [63] Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., (2003): Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography*, 1012(2): 119-128.
- [64] Rover, R.M., Brown, R.C., (2013): Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104: 366-371.
- [65] Setyaningsih, W., Saputro, I.E., Palma, M., Barroso, C.G., (2016): Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. *Food Chemistry*, 192: 452-459.
- [66] Singleton, V.L., Rossi, J.A.J.R., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic

- acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- [67] Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y., (2011): Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 282-287.
- [68] Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., (2007): Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1): 200-208.
- [69] Stalikas, C.D., (2007): Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18): 3268-3295.
- [70] Tao, Y., Zhang, Z., Sun, D., (2014): Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21: 1461-1469.
- [71] Tay, P.Y., Tan, C.P., Abas, F., Yim, H.S., Ho, C.W., (2014): Assessment of Extraction Parameters on Antioxidant Capacity, Polyphenol Content, Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin Gallate (ECG) and Iridoflavanone 3-C- $\beta$ -Glucoside of Agarwood (*Aquilaria crassna*) Young Leaves. *Molecules*, 19: 12304-12319.
- [72] Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W., Tan, C.P., (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120: 290-295.
- [73] Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C., (2010): Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 632-639.
- [74] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W., (2013): Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44: 566-571.
- [75] Vuong, Q.V., Tang, V.N., Dang, T.T., Bhuyan, D.J., Goldsmith, C.D., Sadeqzadeh, E., Scarlett, C.J., Bowyer, M.C., (2015): Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphorb from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 63: 197-202.
- [76] Wong, P.Y.Y., Kitts, D., (2006): Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97: 505-515.
- [77] Yilmaz, Y., Toledo, R.T., (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: 41-48.
- [78] Yim, H.S., Chye, F.Y., Rao, V., Low, J.Y., Matanjun P., How, S.E., Ho, C.W., (2013): Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 50(2): 275-283.
- [79] Zhang, Z.S., Li, D., Wang, L.J., Ozkan, N., Chen, X.D., Mao, Z.H., Yang, H.Z., (2007): Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57: 17-24.

Received: 27 August 2018

Accepted: 21 October 2018

Published Online: 23 October 2018

Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie

<http://www.bioresearch.ro/revistaen.html>

Print-ISSN: 1224-5119

e-ISSN: 1844-7589

CD-ISSN: 1842-6433

University of Oradea Publishing House

## Résumé

L'étude a porté sur les composés phénoliques de la coriandre (*Coriandrum sativum* L.), du céleri (*Apium graveolens* L.), de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et du raisin (*Vitis vinifera* L.). La teneur en composés phénolique de *Cynara scolymus* L. varie considérablement avec la variation du pourcentage du méthanol dans l'eau. Le méthanol pur s'est avéré le solvant le plus efficace pour l'extraction du maximum de composés phénoliques à partir du réceptacle de l'artichaut. Le volume du solvant est à son tour un facteur déterminant dans le processus d'extraction des composés phénoliques de l'artichaut. Un maximum est obtenu à un volume de 10 ml pendant 1 heure d'extraction. Tous les paramètres étudiés ont un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH. Un maximum d'inhibition est atteint à une concentration de 80 %, une durée d'incubation d'une heure et un volume de solvant égal à 10 ml.

4 composés phénoliques ont été identifiés chez *Coriandrum sativum* L. : un acide phénolique qui est l'acide caféique et trois flavonoïdes qui sont des dérivés de la quercétine : quercétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-glucuronide et quercétine-3-O-rutinoside. 4 composés ont été identifiés chez *Apium graveolens* L. : 2 acides phénoliques qui sont l'acide caféique et l'acide p-coumarique et deux flavonoïdes qui sont la lutéoline et son dérivé (lutéoline-7-glucoside).

Les conditions optimales qui permettent l'extraction d'un maximum de composés phénoliques sont 55 % de méthanol, 70 °C, 6.67 ml\*mg<sup>-1</sup> et 10 mn pour la coriandre (*Coriandrum sativum*), 100 % méthanol, 80 °C, 10 ml\*mg<sup>-1</sup> et 10 mn pour les composés phénoliques de céleri (*Apium graveolens*), 100 % méthanol, 70 °C, 10 ml\*mg<sup>-1</sup>, et 10 mn pour la lutéoline d'*Apium graveolens*. Les résultats de l'étude de la correspondance entre la teneur en composés phénoliques et l'activité de piégeage du radical DPPH ont mis en évidence une faible corrélation dans le cas de *Cynara scolymus* et une absence de corrélation entre ces deux variables dans le cas de *Vitis vinifera*, avec des coefficients de corrélation de l'ordre de 0.43 et de 0.068 pour les échantillons de *Cynara scolymus* et du raisin (*Vitis vinifera*) respectivement. La méthode UV et la méthode de Folin-ciocalteu de quantification des composés phénoliques ont montrés une bonne corrélation pour tous les échantillons étudiés. Le rapport UV/FC est fortement influencé par le pourcentage du méthanol. La méthode UV surestime la teneur en composés phénoliques dans le cas de *Cynara scolymus*, *Coriandrum sativum* et *Apium graveolens*, le rapport UV/FC étant supérieur à 1. Par contre, dans le cas du raisin c'est la méthode FC qui surestime la teneur en composés phénoliques où le rapport UV/FC été trouvé très inférieur à 1

**Mots clés :** Composés phénoliques, *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L., *Cynara scolymus* L., *Vitis vinifera* L., La méthode UV, La méthode FC, DPPH.



## Abstract

This work was aimed the study of phenolic compounds obtained from Artichoke (*Cynara scolymus* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), Celery (*Apium graveolens* L.) and grappe (*Vitis vinifera* L.). The recovery of phenolic compounds extracted from *Cynara scolymus* L. change strongly with the variation of methanol percentage. The pure methanol is the most efficient for the extraction of maximum of phenolic compounds from *Cynara scolymus* L. The solvent volume is a determinant factor in the phenolic compounds extraction. The best recovery is obtained with 10 ml methanol for 1 hour. All the studied parameters have a significant effect on the DPPH scavenging capacity. The best activity is obtained with the extracts obtained in the following conditions: 10 ml, 80 % methanol and 1 hour.

Four phenolic compounds were identified from coriander extracts: one phenolic acid which is the caffeic acid and three flavonoids: quercetin-3-O-glucosid, quercetin-3-O-glucuronid and quercetin-3-O-rutinosid. Four phenolic compounds were also identified from *Apium graveolens* L. samples : 2 phenolic acids : caffeic and p-coumaric acid; and two flavonoids : luteolin and luteolin-7-glucosid.

The best conditions that allowed to maximize the recovery of phenolic compounds are (55 % methanol, 70 °C, 6.67 ml\*mg<sup>-1</sup> and 10 min) for coriander (*Coriandrum sativum* L.), (100 % methanol, 80 °C, 10 ml\*mg<sup>-1</sup>, and 10 min) for the TPC of celery (*Apium graveolens* L.), (100 % methanol, 70 °C, 10 ml\*mg<sup>-1</sup>, and 10 min) for luteoline extracted from *Apium graveolens* L.) The investigation of the relation between TPC and the DPPH scavenging properties has shown a poor correlation between the two variables in the case of *Cynara scolymus* L. and absence of correlation in case of grape with very low determination coefficients in the order of 0.43 and 0.068 for artichoke (*Cynara scolymus* L.) and grape (*Vitis vinifera* L.) respectively. The quantification of phenolic compounds using UV an FC method has shown a positive and significant correlation for all of the studied samples. UV/FC coefficient is strongly affected by the methanol percentage. The UV method overestimates the phenolic content in the case of *Cynara scolymus* L., *Apium graveolens* L., *Coriandrum sativum* L. with the UV/FC ratio >. The UV method underestimates the phenolic content in the case of grape with a UV/FC ratio <1

**Key words:** Phenolic compounds, *Coriandrum sativum* L., *Apium graveolens* L., *Cynara scolymus* L., *Vitis vinifera* L., UV method, FC method, DPPH.

## ملخص

تناولنا في هذا العمل دراسة المركبات الفينولية لكل من نبتة الكسبرة، الكرافص، القرنون و العنب. محتوى القرنون من المركبات الفينولية يتغير بتغير نسبة الميثانول في الماء. 100% ميثانول هو المحلول الأمثل لاستخلاص أكبر قدر ممكن من المركبات الفينولية من نبتة القرنون. حجم المحلول يلعب دورا هاما في استخلاص المركبات الفينولية من نبتة القرنون. أكبر كمية تم استخلاصها بإستعمال 10 مل من المحلول لمدة ساعة واحدة. كل المتغيرات المدروسة ذات أهمية معتبرة في الخاصية المضادة للأكسدة لدى مستخلصات نبتة القرنون. أعلى نتيجة تم تسجيلها بإستعمال الميثانول بنسبة 80 % بمعدل 10 مل لمدة ساعة واحدة .

الظروف التجريبية المثلى التي سمحت باستخلاص أكبر كمية ممكنة المركبات الفينولية هي كالتالي: ( 55% من الميثانول، 70 درجة مئوية، 6.67 مل/مغ و 10 دقائق من الوقت) بالنسبة لنبتة الكزبرة (100% من الميثانول، 80 درجة مئوية، 10 مل/مغ ، و 10 المستخلصة من الكرافص، و أخيرا ( 80% من الميثانول، 10 مل/مغ، و 10 دقائق من الوقت) بالنسبة لنبتة الخرشف. أثبتت دراستنا غياب علاقة إيجابية بين مستوى المركبات الفينولية و الخاصية المضادة للأكسدة حيث تم تسجيل قيم جد منخفضة لمعاملات التحديد لكل من عينات الخرشف و العنب و قد قدرت ب: 0.43 و 0.068 على التوالي. أثبتت دراستنا وجود علاقة إيجابية و جيدة بين الطريقتين المختلفتين اللتين تم استعمالهما في تحديد كمية المركبات الفينولية لمختلف العينات المدروسة *FC طريقة*, *UV طريقة*

4 مكونات تم التعرف عليها لدى نبتة الكسبرة: حمض فينولي و الذي هو *l'acide caféique* و ثلاث فلافونويدات. 4 مكونات تم التعرف عليها كذلك في نبتة الكرافص و هي حمضين فينوليين و فلافونودين:

المعامل *UV/FC* يتأثر بشدة بنسبة الميثانول في الماء. طريقة ال *UV* تقدم قيم مرتفعة لمحتوى كل من نبتة الكسبرة، الكرافص و القرنون بحيث قيمته تفوق 1. عكس العنب أين قدمت طريقة *FC* القيم المرتفعة حيث كان المعامل أقل من 1.

**الكلمات المفتاح:** المركبات الفينولية, الكزبرة, الكرافص, الخرشف, العنب, الخاصية المضادة للأكسدة, *FC طريقة*, *UV طريقة*