



**HAL**  
open science

# Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs

Cristina-Gabriela Grigoraș

► **To cite this version:**

Cristina-Gabriela Grigoraș. Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Sciences agricoles. Université d'Orléans; Universitatea Vasile Alecsandri din Bacău (România), 2012. Français. NNT : 2012ORLE2029 . tel-00772304

**HAL Id: tel-00772304**

**<https://theses.hal.science/tel-00772304v1>**

Submitted on 10 Jan 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES / FACULTATEA DE INGINERIE

Institut de Chimie Organique et Analytique / Școala de Studii Doctorale

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE présentée par :

**Cristina-Gabriela GRIGORAȘ**

soutenue le : 24 septembre 2012

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université d'Orléans  
et de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacău**

Disciplines : Chimie

Génie de l'Environnement

**VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS  
DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS  
PAR EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS**

THÈSE dirigée par :

**Mme. Claire ELFAKIR  
M. Gabriel LAZĂR**

Professeur, Université d'Orléans  
Professeur, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău

RAPPORTEURS :

**Mme. Valérie THIERY  
M. Michel LAFOSSE  
Mme. Carmen TEODOSIU  
M. Valentin NEDEFF**

Professeur, Université de La Rochelle  
Professeur, Université d'Orléans  
Professeur, Université Technique « Gheorghe Asachi » Iași  
Professeur, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău

JURY :

**M. Carol SCHNAKOVSKY**

Professeur, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău  
Président du jury

**Mme. Emilie DESTANDAU**

Docteur, Université d'Orléans

**Mme. Claire ELFAKIR**

Professeur, Université d'Orléans

**M. Michel LAFOSSE**

Professeur, Université d'Orléans

**M. Gabriel LAZĂR**

Professeur, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău

**M. Valentin NEDEFF**

Professeur, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău

**Mme. Carmen TEODOSIU**

Professeur, Université Technique « Gheorghe Asachi » Iași

**Mme. Valérie THIERY**

Professeur, Université de La Rochelle





ÉCOLE DOCTORALES SCIENCES ET TECHNOLOGIES / FACULTATEA DE INGINERIE

Institut de Chimie Organique et Analytique / Școala de Studii Doctorale

TEZĂ ÎN COTUTELĂ INTERNAȚIONALĂ prezentată de :

**Cristina-Gabriela GRIGORAȘ**

susținută pe data de : 24 septembrie 2012

pentru obținerea titlului de :

**Doctor al Universității din Orléans  
și al Universității « Vasile Alecsandri » din Bacău**

Domenii : Chimie

Ingineria Mediului

**VALORIFICAREA FRUCTELOR ȘI A SUBPRODUSELOR  
DIN INDUSTRIA DE PRELUCRARE A FRUCTELOR  
PRIN EXTRAȚIE DE COMPUȘI BIOACTIVI**

**CONDUCĂTORI ȘTIINȚIFICI :**

**Dna. Claire ELFAKIR**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din Orléans

**DI. Gabriel LAZĂR**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea « Vasile Alecsandri » din Bacău

**REFERENȚI :**

**Dna. Valérie THIERY**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din La Rochelle

**DI. Michel LAFOSSE**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din Orléans

**Dna. Carmen TEODOSIU**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea Tehnică « Gheorghe Asachi » Iași

**DI. Valentin NEDEFF**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea « Vasile Alecsandri » din Bacău

**JURIU :**

**DI. Carol SCHNAKOVSKY**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea « Vasile Alecsandri » din Bacău,  
Președintele juriului

**Dna. Emilie DESTANDAU**

Conf. univ. dr. chim., Universitatea din Orléans

**Dna. Claire ELFAKIR**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din Orléans

**DI. Michel LAFOSSE**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din Orléans

**DI. Gabriel LAZĂR**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea « Vasile Alecsandri » din Bacău

**DI. Valentin NEDEFF**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea « Vasile Alecsandri » din Bacău

**Dna. Carmen TEODOSIU**

Prof. univ. dr. ing., Universitatea Tehnică « Gheorghe Asachi » Iași

**Dna. Valérie THIERY**

Prof. univ. dr. chim., Universitatea din La Rochelle



*A mes parents*

*A ma sœur Marina*



*« ...Tant qu'on ne cessera pas de monter, les marches ne finiront pas ...  
sous les pieds qui montent, elles se multiplieront à l'infini... »*

*Franz KAFKA*





## REMERCIEMENTS

*J'adresse tous mes remerciements à Madame Adriana Finaru, professeur à l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau et à Monsieur Gérard Guillaumet, professeur à l'Université d'Orléans, pour avoir instauré le fort partenariat existant entre ces deux universités. Ce travail de thèse n'est qu'un des nombreux fruits de cette collaboration qui perdure depuis plus de dix ans.*

*Je voudrais ensuite remercier Monsieur le Professeur Olivier Martin, le directeur de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) pour m'avoir accueillie au sein de son institut pendant les études de master et pendant la thèse.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent à Madame la Professeur Claire Elfakir pour m'avoir proposé de faire une thèse sous sa direction, pour son amabilité, sa gentillesse, pour son soutien continu et pour avoir cru en moi même dans les moments les plus difficiles. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour exprimer la reconnaissance que je lui porte pour tous ses conseils, pour ses encouragements et pour toutes les fois qu'elle a trouvé le temps nécessaire pour m'écouter.*

*Je souhaite remercier également Monsieur le Professeur Gabriel Lazar, le co-directeur de cette thèse, pour toute la liberté et la confiance qu'il m'a accordée aux cours de ces années.*

*J'adresse ma plus grande gratitude et mes plus chaleureux remerciements à Emilie Destandau, Maître de Conférences à l'Université d'Orléans, pour avoir co-encadré ces travaux de recherche. Je lui suis très, très reconnaissante pour son soutien sans cesse, pour ses conseils précieux, pour son infinie disponibilité, pour m'avoir accompagnée au quotidien, pour avoir su me reconforter chaque fois quand j'avais des soucis et pour avoir trouvé toujours des solutions à mon plus grand problème : « le manque de temps ».*

*Je remercie Madame Valérie Thiery (professeur à l'Université de la Rochelle), Madame Carmen Teodosiu (professeur à l'Université Technique « Gheorghe Asachi » de Iasi), Monsieur Michel Lafosse (professeur à l'Université d'Orléans) et Monsieur Valentin Nedeff (professeur à l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau) pour avoir accepté aimablement de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteurs ainsi que Monsieur Carol Schnakovszky (professeur à l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau) pour avoir accepté être le président du jury.*

*Je remercie également Eric Lesellier et Caroline West, maîtres de conférences à l'Université d'Orléans, pour leur aide lors des analyses par chromatographie en phase supercritique.*

*J'associe à ces remerciements les autres permanents qu'ils soient des enseignant-chercheurs (Benoit Maunit, Philippe Morin, Sabine Berteina-Raboin, Bérengère Claude, Rehne Nehme, Raphael Delépée, Agnès Chartier) ou faisant partie du corps technique (Florian Coudray, Cédric Mafre, Laoges Thao) ou du secrétariat du laboratoire (Marie-Madeleine, Yann) pour leur soutien et disponibilité continus.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent aussi à Sandrine Zubrzický et à Laëtitia Fougère pour m'avoir initiée dans l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance et de la spectrométrie de masse et pour avoir réalisé avec beaucoup de gentillesse des analyses supplémentaires pour ma thèse. Je les remercie pour chaque fois quand elles ont réussi à remettre en route les détecteurs de l'HPLC, pour toutes les fois qu'elles m'ont écoutée et épaulée. Je pense souvent à nos petites discussions sur la langue française et ses règles de grammaire, sur les restaurants et les plats français ou sur les problèmes de sécurité pouvant apparaître pendant les longues soirées et les fins de semaine que j'ai passé seule à l'ICOA pour mettre à jour mes cahiers de labo ou pour la rédaction de la thèse. Je me rappellerai toujours les nombreux moments agréables que nous avons passés ensemble.*

*Je remercie mes chers collègues et amis de Labo Plantes et de l'ICOA : Thomas, Saïda, Andrea, Alessandra, Aleksandra, Ludivine, Claire, Boutayna, Marie, Syame, Aleksander, Hala, Emmanuelle, Farah, Sabine, Oussama, Oana, Cleopatra, Cristina, Edi et tous ceux que, sans vouloir, j'ai pu oublier. Je les remercie pour leur bon humour, pour leur gaieté et pour avoir réussi m'arracher des fois de mon ordinateur portable pour faire des petites pauses café ou pour manger*

*ensemble. D'ailleurs, je me rappelle les très bons gâteaux que j'ai goûtés pendant ces pauses et les discussions intéressantes que nous avons eues sur beaucoup de sujets.*

*Je souhaite dire merci également à tous les membres de l'équipe de Chimie et Ingénierie de la Sécurité Alimentaire et de la Protection de l'Environnement de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacau, équipe de laquelle je fais partie, pour m'avoir acceptée parmi eux et pour avoir su assurer toujours un climat convivial de travail.*

*Je tiens remercier sincèrement Monsieur le Professeur Lucian Gavrița pour avoir été présent à mes examens et pour tous les réponses aux questions que je lui ai adressées pendant ces années de thèse et Madame Lacramioara Rusu pour ses encouragements continus et pour avoir réussi me « tranquilliser » dans les situations les plus difficiles.*

*Je ne pourrai pas oublier Andrei Simion, mon collègue et ami, avec lequel j'ai partagé la plus grande partie de mes soucis sur les avancées des travaux de recherche de la thèse. Je lui porte une forte gratitude et une profonde reconnaissance pour ses conseils, pour sa bonne compagnie, pour son infinie patience, pour m'avoir accordé du temps quand j'ai eu besoin et pour m'avoir toujours soutenue sans réserves.*

*Finalement, j'adresse mes remerciements particuliers à mes parents et à ma sœur Marina pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Je ne saurai jamais les récompenser suffisamment pour leurs efforts et pour avoir fait toujours tout le possible pour que je puisse accomplir mes rêves dont quelques uns sont vraiment futuristes et semblent être des fois irréalisables. Je les remercie pour avoir cru en moi sans cesse et pour m'avoir accompagnée jour et nuit.*



## SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>15</b>
<b>I. LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS</b>	<b>17</b>
I. 1. LES FRUITS DANS L'ALIMENTATION HUMAINE	19
I. 2. VALORISATION DES FRUITS	20
I. 2. 1. Fruits frais	20
I. 2. 2. Transformation des fruits	21
I. 3. VALORISATION DES SOUS-PRODUITS ISSUS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DE FRUITS	22
I. 3. 1. Cadre réglementaire lié à l'utilisation de sous-produits de fruits	22
I. 3. 2. Directions de valorisation de résidus de fruits	24
I. 3. 2. 1. Valorisation dans l'alimentation animale	25
I. 3. 2. 2. Valorisation par épandage et compostage	26
I. 3. 2. 3. Valorisation sous forme de biomasse et d'agro carburants	27
I. 3. 2. 4. Valorisation dans l'industrie alimentaire	31
I. 3. 2. 5. Autres utilisations de sous-produits de l'industrie de fruits	33
I. 4. LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS ISSUS DE LA VALORISATION DE FRUITS – SOURCES DE PRINCIPES ACTIFS	35
I. 4. 1. Fibres diététiques	35
I. 4. 2. Enzymes	37
I. 4. 3. Acides organiques	39
I. 4. 4. Colorants	40
I. 4. 5. Aromatisants	40
I. 4. 6. Métabolites secondaires	41
I. 4. 6. 1. Composés phénoliques	43
I. 4. 6. 1. 1. Activités biologiques de composés phénoliques	46
I. 4. 6. 2. Composés terpéniques	49
I. 4. 6. 2. 1. Activités biologiques de composés triterpéniques	53
I. 4. 6. 3. Extraction et analyse de métabolites secondaires	54
CONCLUSIONS	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68
<b>II. MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR L'EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS</b>	<b>79</b>
II. 1. MATERIEL VEGETAL	82
II. 1. 1. Les cerises	82
II. 1. 1. 1. Description botanique des cerises	82
II. 1. 1. 2. Composition de cerises	83
II. 1. 2. Les résidus de pommes	86
II. 1. 2. 1. Description botanique des pommes	86

II. 1. 2. 2. Les résidus de pommes	86
II. 1. 2. 3. Composition de pommes et de résidus de pommes	87
II. 2. TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL	91
II. 2. 1. Congélation	91
II. 2. 2. Déshydratation	92
II. 2. 2. 1. Lyophilisation	92
II. 2. 2. 2. Zéodratation	93
II. 3. EXTRACTION DE COMPOSES BIOACTIFS	95
II. 3. 1. Macération (M)	97
II. 3. 2. Extraction par solvant pressurisé (ASE)	97
II. 3. 3. Extraction assistée par ultrasons (USAE)	98
II. 3. 4. Extraction assistée par microondes (MWAE)	100
II. 4. CARACTERISATION DES EXTRAITS	102
II. 4. 1. Analyse par chromatographie de haute performance sur couche mince (HPTLC)	102
II. 4. 2. Analyse par chromatographie liquide de haute performance (HPLC)	103
II. 4. 2. Analyse par chromatographie en phase supercritique (SFC)	109
II. 5. FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES EXTRAITS	111
II. 5. 1. Extraction liquide-liquide (ELL)	111
II. 5. 2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	112
II. 5. 3. Chromatographie semi-préparative (CSP)	113
II. 6. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS BRUTS ET DES FRACTIONS	113
II. 6. 1. Composés phénoliques totaux (Test Folin-Ciocalteu)	114
II. 6. 2. Flavonoïdes totaux	114
II. 6. 3. Activité anti radicalaire (Test DPPH)	115
II. 6. 4. Pouvoir réducteur (Test FRAP)	116
CONCLUSIONS	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118

### **III. COMPOSES BIOACTIFS OBTENUS DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS - RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**127**

III. 1. COMPOSES BIOACTIFS DE CERISES	129
III. 1. 1. Extraction sans solvant assistée par microondes des anthocyanines de cerises	130
III. 1. 1. 1. Influence des paramètres d'extraction	130
III. 1. 1. 1. 1. Influence du solvant d'extraction	130
III. 1. 1. 1. 2. Influence de la puissance microondes	132
III. 1. 1. 1. 3. Influence de la durée d'extraction	133
III. 1. 2. Application de la méthode d'extraction optimisée	134
III. 1. 3. Séchage des extraits de cerises	134
III. 1. 4. Caractérisation des extraits de cerises	135
III. 1. 5. Isolement et purification des anthocyanines de cerises	136
III. 1. 5. 1. Fractionnement des extraits de cerises par chromatographie de partage centrifuge (CPC)	136
III. 1. 5. 2. Fractionnement des extraits de cerises par HPLC semi-préparative (CSP)	139
III. 1. 6. Analyse des anthocyanines purifiés	141

---

III. 2. COMPOSES BIOACTIFS DE RESIDUS DE POMMES	143
III. 2. 1. Obtention de résidus de pommes	144
III. 2. 2. Conservation des résidus de pommes : zéodratation versus lyophilisation	144
III. 2. 2. Extraction de composés bioactifs de résidus de pommes	145
III. 2. 2. 1. Méthodologie d'extraction	146
III. 2. 2. 1. 1. Extraction par macération (M)	146
III. 2. 2. 1. 2. Extraction par solvant pressurisé (ASE)	146
III. 2. 2. 1. 3. Extraction assistée par ultrasons (USAE)	146
III. 2. 2. 1. 4. Extraction assistée par microondes (MWAE)	146
III. 2. 2. 2. Développement d'une méthode d'analyse par HPLC des extraits de résidus de pommes	147
III. 2. 2. 3. Influence de la technique d'extraction	148
III. 2. 2. 4. Influence du solvant d'extraction	150
III. 2. 2. 5. Optimisation de l'extraction des composés apolaires de résidus de pommes	151
III. 2. 2. 5. 1. Extraction par macération	151
III. 2. 2. 5. 2. Extraction assistée par microondes	152
III. 2. 3. Identification de principales familles de composés bioactifs de résidus de pommes	155
III. 2. 3. 1. Analyse des extraits de résidus de pommes par HPTLC	155
III. 2. 3. 1. 1. Appareillage et conditions opératoires	155
III. 2. 3. 1. 2. Acides aminés et sucres	155
III. 2. 3. 1. 3. Polyphénols	156
III. 2. 3. 1. 4. Lipides, triterpènes et phytostérols	157
III. 2. 3. 1. 5. Triterpènes	158
III. 2. 3. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes par Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC)	159
III. 2. 3. 2. 1. Analyse d'un mélange de composés standards	159
III. 2. 3. 2. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes	171
III. 2. 3. 3. Analyse des extraits de résidus de pommes par chromatographie en phase supercritique (SFC)	174
III. 2. 3. 3. 1. Analyse d'un mélange de composés standards	174
III. 2. 3. 3. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes	176
III. 2. 3. 4. Analyse des extraits de résidus de pommes par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (HPLC-MS) en vue d'une identification des composés présents	177
III. 2. 3. 4. 1. Analyse d'un mélange de composés standards	177
III. 2. 3. 4. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes ( <i>Colonne Pursuit XRs C18</i> )	181
III. 2. 3. 4. 3. Analyse des extraits de résidus de pommes ( <i>Colonne PGC</i> )	184
III. 2. 4. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de résidus de pommes	187
III. 2. 4. 1. Fractionnement des extraits de résidus de pommes	188
III. 2. 4. 2. Evaluation des activités antioxydantes	189
III. 2. 4. 2. 1. Composés phénoliques totaux (Test Folin – Ciocâlțeu)	190
III. 2. 4. 2. 2. Contenu en flavonoïdes totaux	192
III. 2. 4. 2. 3. Activité anti radicalaire (Test DPPH)	193
III. 2. 4. 2. 4. Pouvoir réducteur (Test FRAP)	195
CONCLUSIONS	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199

---



**IV. MANAGEMENT DE LA VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS PAR EXTRACTION DE COMPOSES BIOACTIFS 205**

IV. 1. APPARITION ET EVOLUTION DU CONCEPT DE « DEVELOPPMENT DURABLE »	207
IV. 2. ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX SPECIFIQUES AU PROCESSUS DE RECUPERATION DE PRINCIPES ACTIFS	209
IV. 2. 1. Analyse du processus technologique	209
IV. 2. 2. Facteurs polluants	212
IV. 2. 3. Identification des aspects environnementaux	213
IV. 3. EVALUATION ET QUANTIFICATION DE L'IMPACT DES ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX IDENTIFIES	215
IV. 3. 1. Evaluation de l'impact des aspects environnementaux identifiés	215
IV. 3. 2. Quantification de l'impact des aspects environnementaux	218
IV. 3. 2. 1. Description de la méthode de quantification	218
IV. 3. 2. 2. Application de la méthode au processus de récupération de principes actifs à partir de fruits ou de résidus de fruits	219
IV. 4. REMEDIATION DES ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX A IMPACT SIGNIFICATIF	220
IV. 4. 1. Traitement des résidus végétaux	221
IV. 4. 2. Traitement des résidus chromatographiques	222
IV. 4. 3. Traitement des mélanges de réactifs	223
IV. 4. 4. Traitement des eaux usées	223
CONCLUSIONS	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	226

**CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 231**

**ANNEXES 237**

ANNEXE 1. SOLVANTS ET STANDARDS UTILISES	239
ANNEXE 2. ANALYSE HPLC DES EXTRAITS BRUTS DE RESIDUS DE POMMES ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE	240
ANNEXE 3. DROITES D'ETALONNAGE COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX	243
ANNEXE 4. DROITES D'ETALONNAGE FLAVONOÏDES TOTAUX	244
ANNEXE 5. DROITES D'ETALONNAGE FRAP	245
ANNEXE 6. COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES REALISEES DURANT LA THESE	246

## ABREVIATIONS

<b>AB</b>	Acide bétulinique
<b>AC</b>	Acide chlorogénique
<b>AND</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AG</b>	Acide gallique
<b>AO</b>	Acide oléanolique
<b>AP</b>	Acide palmitique
<b>APCI</b>	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Ionisation chimique à pression atmosphérique)
<b>ASE</b>	Accelerated Solvent Extraction (Extraction par solvant pressurisé)
<b>AU</b>	Acide ursolique
<b>ATP</b>	Acide adénosine triphosphorique
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CAT</b>	Catéchine
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>COV</b>	Composés organiques volatils
<b>CPC</b>	Chromatographie de Partage Centrifuge
<b>CSP</b>	Chromatographie semi-préparative
<b>CUR</b>	Débit du gaz rideau
<b>Cy-3-Ch</b>	Cyanidine-3-Chloride
<b>Cy-3-Glu</b>	Cyanidine-3-Glucoside
<b>Cy-3-Rut</b>	Cyanidine-3-Rutinoside
<b>DAD</b>	Diode Array Detector (Détecteur à barrettes de diodes)
<b>DBO5</b>	Demande biochimique d'oxygène
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DCO</b>	Demande chimique d'oxygène
<b>EDDL</b>	Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière
<b>DP</b>	Tension de l'orifice
<b>DPPH</b>	2,2 $\alpha$ -diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>EEE</b>	Espace Economique Européen
<b>ELL</b>	Extraction liquide-liquide
<b>EN</b>	English (Anglais)
<b>EP</b>	Tension du quadripôle Q0
<b>éq.</b>	Equivalent
<b>ER</b>	Erythrodiol
<b>ESI</b>	Electrospray Ionisation (Ionisation Electrospray)
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Diéthyl éther
<b>EtOAc</b>	Acétate d'éthyle
<b>EtOH</b>	Ethanol

<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FP</b>	Tension de l'anneau
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Ability of Plasma (Pouvoir réducteur)
<b>Fru</b>	Fructose
<b>GC</b>	Gas Chromatography (Chromatographie en phase gazeuse)
<b>Glu</b>	Glucose
<b>HOAc</b>	Acide acétique
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide de haute performance)
<b>HPTLC</b>	High Performance Thin Layer Chromatography (Chromatographie sur couche mince de haute performance)
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse haute résolution)
<b>HSCCC</b>	High Speed Counter Current Chromatography (Chromatographie à contre courant grande vitesse)
<b>IPG</b>	Indice de pollution globale
<b>iPrOH</b>	Isopropanol
<b>IR</b>	Spectroscopie infrarouge
<b>IS</b>	Tension de spray
<b>ISO</b>	International Standardisation Organisation (Organisation Internationale de Normalisation)
<b>LC-MS</b>	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse)
<b>L-Ser</b>	L-serine
<b>L-Val</b>	L-valine
<b>M</b>	Macération
<b>MeCN</b>	Acétonitrile
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MPLC</b>	Medium Pressure Liquide Chromatography (Chromatographie liquide moyenne pression)
<b>MS</b>	Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
<b>MWAE</b>	Microwave Assisted Extraction (Extraction Assistée par Microondes)
<b>NaOAc</b>	Acétate de sodium
<b>NEB</b>	Gaz de nébulisation
<b>NEU</b>	Diphényl boric acid ethylamino ester
<b>ORAC</b>	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacité d'absorption des radicaux libres)
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PFP</b>	Pentafluorophényle
<b>PGC</b>	Porous Graphitic Carbon (Carbone Graphitique Poreux)

---

<b>PH</b>	Phloridzine
<b>Phe</b>	Phénylalanine
<b>ppm</b>	Parties per million
<b>QTOF</b>	2 analyseurs : Q = Quadripole ; TOF = Time of Flight (Temps de vol)
<b>QUE</b>	Quercétine
<b>Raff</b>	Raffinose
<b>RDA</b>	Retro Diels-Alder
<b>Rf</b>	Rapport frontal
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RSLC</b>	Rapid-Separation Liquid Chromatography (Séparation rapide par chromatographie liquide)
<b>RUT</b>	Rutine
<b>Sacch</b>	Saccharose
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy (Microscopie Electronique à Balayage)
<b>SFC</b>	Supercritical Fluid Chromatography (Chromatographie en phase supercritique)
<b>TEAC</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Capacité antioxydante en équivalent trolox)
<b>Tem</b>	Température de la source d'ionisation
<b>TFA</b>	Trifluoroacetic acid (Acide trifluoro acétique)
<b>TIC</b>	Total Ionic Current (Courant ionique total)
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography (Chromatographie sur couche mince)
<b>TOF</b>	Time of Flight (Temps de vol)
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tripyridyl-S-triazine
<b>tr</b>	Temps de rétention
<b>TRAP</b>	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (Capacité de piégeage des radicaux libres)
<b>UHPLC</b>	Ultra-High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide d'Ultra Haute Performance)
<b>uma</b>	Unité de masse atomique
<b>USAE</b>	Ultrasound Assisted Extraction (Extraction Assistée par Ultrasons)
<b>Uv</b>	Uvaol
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>XIC</b>	Extracted Ion Chromatogramme (Chromatogramme de courants ioniques extraits)
<b>XRD</b>	X Ray Diffraction (Diffraction aux rayons X)

---

## LISTE DES FIGURES

### I. LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS

Figure I.1. Production mondiale de fruits en 2010 (millions de tonnes)	19
Figure I.2. Les plus importants producteurs des fruits d'Europe	19
Figure I.3. Les fruits obtenus en Europe (millions de tonnes)	19
Figure I.4. Produits obtenus à partir de fruits	21
Figure I.5. Schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits (résidus)	24
Figure I.6. Diagramme d'un processus de compostage	27
Figure I.7. Production mondiale de bioéthanol	28
Figure I.8. Ethanol produit par <i>Zymomonas mobilis</i> en solutions de résidus d'agrumes hydrolysés en présence d'huile de peaux d'oranges en différentes concentrations	29
Figure I.9. Hydrogène produit à différentes concentrations du substrat de fermentation	31
Figure I.10. Rétention des ions cadmium sur différents sous-produits d'origine végétale (concentration initiale 693 ppm)	34
Figure I.11. Production de polygalacturonase par <i>Lentinus edodes</i> sur des résidus de fruits	38
Figure I.12. Obtention de la lacase par inoculation de souches de <i>Trametes hirsuta</i> sur de résidus de kiwi à différentes concentrations d'ammoniac	39
Figure I.13. Représentation simplifiée des principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires et de leurs relations avec le métabolisme primaire	42
Figure I.14. Biosynthèse de composés phénoliques (voie shikimate)	43
Figure I.15. Structure générique de flavonoïdes	44
Figure I.16. Structure de l'isoprène	49
Figure I.17. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (voie du mévalonate)	50
Figure I.18. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle et du diphosphate de diméthylallyle (voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate)	51
Figure I.19. Biosynthèse de triterpénoïdes à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP)	52

### II. MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR L'EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS

Figure II.1. Processus de récupération de principes actifs à partir d'un matériel végétal	81
Figure II.2. Fleurs, fruits et graines de cerisier	82
Figure II.3. Composition de différentes variétés de cerises	84
Figure II.4. Pommes et résidus de pommes Granny Smith	86
Figure II.5. Schéma technologique d'obtention de jus clair de pommes	87
Figure II.6. Les étapes de congélation d'un produit végétal	91
Figure II.7. Zéolithes de type X	93
Figure II.8. Etapes du processus de zéodratation	94
Figure II.9. Etapes de l'extraction solide-liquide	96
Figure II.10. Schéma d'un système d'extraction par solvant pressurisé	97
Figure II.11. Fréquences des ondes sonores et leurs applications	98
Figure II.12. Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons	99
Figure II.13. Explosion de bulles de cavitation et libération du matériel végétal	99
Figure II.14. Représentation graphique d'un champ électromagnétique	100
Figure II.15. Principes du chauffage classique et assisté par microondes	101
Figure II.16. Comportement de molécules dipolaires	101
Figure II.17. Schéma d'un magnétron	102
Figure II.18. Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection à six voies	104

Figure II.19. Le système optique d'un détecteur à barrette de diodes	106
Figure II.20. Fonctionnement d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière	106
Figure II.21. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse	107
Figure II.22. Représentation schématique d'une source d'ionisation type ESI	108
Figure II.23. Source d'ionisation APCI	109
Figure II.24. Représentation schématique d'un analyseur quadripôle	109
Figure II.25. Diagramme de phase de CO <sub>2</sub> (adapté de [106])	110
Figure II.26. Vue générale d'un appareil CPC	112
Figure II.27. Mécanisme de complexation de Al (III) par la quercétine	115
Figure II.28. Réduction du radical DPPH• en présence d'un antioxydant	116
Figure II.29. Réduction du complexe Fe(III)-TPTZ par un antioxydant	116

### **III. COMPOSES BIOACTIFS OBTENUS DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS - RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Figure III.1. Installation d'extraction microondes	129
Figure III.2. Influence de la nature du solvant sur l'extraction de composés de cerises	131
Figure III.3. Influence de la puissance microondes sur l'extraction de composés de cerises	132
Figure III.4. Influence du temps sur l'extraction de composés de cerises	133
Figure III.5. Photographies montrant l'évolution de cerises au cours de l'extraction	134
Figure III.6. Chromatogramme de l'extrait de cerises obtenu dans les conditions optimales d'extraction	135
Figure III.7. Analyse HPLC des 4 fractions CPC obtenues par fractionnement d'un extrait brut de cerises	138
Figure III.8. Représentation schématique du système « boucle fermée » développé lors du fractionnement par HPLC semi-préparative pour la réutilisation de la phase mobile	140
Figure III.9. Profil chromatographique (HPLC semi-préparative) de l'extrait de cerises	140
Figure III.10. Spectres MS (mode ESI+) et chromatogrammes (UV à 280 nm) des anthocyanines de cerises	142
Figure III.11. Variétés de pommes utilisées pour l'obtention de résidus au laboratoire	144
Figure III.12. Résidus de pommes Granny Smith séchés par lyophilisation (A) et par zéodratation (B)	144
Figure III.13. Comparaison des rendements d'extraction pour les extraits à l'éthanol obtenus à partir de résidus de pomme lyophilisées et zéodratés	145
Figure III.14. Comparaison des profils chromatographiques des extraits éthanoliques obtenus à partir de résidus de pommes Granny Smith par différentes techniques d'extraction	149
Figure III.15. Comparaison des extraits de résidus de pommes Granny Smith obtenus à l'aide de différents solvants sous l'action de microondes	150
Figure III.16. Influence de différents paramètres sur l'extraction par macération de composés apolaires ( $t_r \approx 40$ min) de résidus de pommes Pink Lady	152
Figure III.17. Influence de différents paramètres sur l'extraction assistée par microondes de composés apolaires ( $t_r \approx 40$ min) de résidus de pommes Gala	153
Figure III.18. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de sucres et des acides amines (VIS)	156
Figure III.19. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de polyphénols standards (à 254 et 366 nm)	157
Figure III.20. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de lipides et triterpènes (à 366 nm)	158
Figure III.21. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de terpènes (VIS)	159

Figure III.22. Analyse HPLC des standards de composés phénoliques et de composés triterpéniques	162
Figure III.23. Image SEM de particules de silice Kromasil	164
Figure III.24. Représentation schématique de la phase stationnaire Supelcosil ABZ+Plus	165
Figure III.25. Mécanisme de rétention des analytes sur la colonne HyPURITY Advance	165
Figure III.26. Représentation schématique de la phase stationnaire PFP	166
Figure III.27. Analyse du mélange de 5 triterpènes sur colonne Purosphere STAR RP 18e	167
Figure III.28. Structure atomique de graphite	168
Figure III.29. Alignement des molécules à la surface du graphite	169
Figure III.30. Représentation schématique des interactions dipôle-dipôle induites par une charge positive (A) ou négative (B) se trouvant à proximité de la surface du graphite	169
Figure III.31. Analyse du mélange de 5 triterpènes sur une colonne PGC	170
Figure III.32. Analyse du mélange de standards de triterpènes sur la colonne PGC en gradient d'élution	171
Figure III.33. Identification des principales familles de composés des extraits éthanoliques de résidus de pommes obtenus sous l'action des microondes	172
Figure III.34. Triterpènes de résidus de pommes	173
Figure III.35. Représentation schématique de la phase stationnaire Synergi Polar RP	174
Figure III.36. Analyse du mélange de standards de triterpènes par SFC	175
Figure III.37. Structures de certains standards analysés par SFC	175
Figure III.38. Analyse des extraits de résidus de pommes Gala et Granny Smith par SFC	176
Figure III.39. Analyse HPLC-MS ESI <sup>-</sup> XIC des standards de composés phénoliques et triterpéniques	178
Figure III.40. Fragmentation de l'acide ursolique en mode positif (adapté d'après [78, 82])	179
Figure III.41. Analyse HPLC-MS ESI <sup>-</sup> XIC de l'extrait de résidus de pommes Gala	181
Figure III.42. Analyse HPLC-MS APCI <sup>-</sup> SIM de l'extrait de résidus de pommes Gala sur colonne PGC	184
Figure III.43. Représentation schématique du fractionnement des extraits de résidus de pommes par extraction liquide-liquide	188
Figure III.44. Test Folin-Ciocalteu standards (équivalents acide gallique)	190
Figure III.45. Teneur en composés phénoliques totaux des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions d'après le test de Folin-Ciocalteu	191
Figure III.46. Test des flavonoïdes totaux standards (équivalents de rutine)	192
Figure III.47. Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions	193
Figure III.48. Activité antioxydante des standards exprimée en % d'inhibition du radical libre DPPH <sup>•</sup>	194
Figure III.49. Activité antioxydante des extraits de résidus de pommes et leurs fractions	194
Figure III.50. Pouvoir réducteur des standards (équivalents trolox)	195
Figure III.51. Inhibition du TPTZ par les extraits de résidus de pommes et leurs fractions	196

#### **IV. MANAGEMENT DE LA VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS PAR EXTRACTION DE COMPOSES BIOACTIFS**

Figure IV.1. Récupération et analyse des molécules bioactives à partir d'une source d'origine végétale	209
Figure IV.2. Calcul de l'indice de pollution globale pour 3 facteurs (A) ou 4 facteurs (B)	218
Figure IV.3. Représentation de l'impact sur les facteurs d'environnement du processus de récupération des molécules bioactives	220

# LISTE DES TABLEAUX

## I. LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS

Tableau I.1. Classification des fruits frais	21
Tableau I.2. Composition chimique moyenne des aliments pour les animaux	26
Tableau I.3. Effet de résidus de pommes sur la qualité physique des gâteaux	36
Tableau I.4. Production de CO <sub>2</sub> et composés volatils	40
Tableau I.5. Structure des acides phénoliques	44
Tableau I.6. Structures des flavonoïdes	45
Tableau I.7. Dérivés radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène	46
Tableau I.8. Exemples de structures chimiques de terpènes	49
Tableau I.9. Structure chimique de triterpènes	52
Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits	56
Tableau I.11. Extraction et analyse de composés terpéniques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits	63

## II. MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR L'EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS

Tableau II.1. Anthocyanines de cerises	83
Tableau II.2. Eléments majeurs de différentes variétés de cerises	85
Tableau II.3. Eléments essentiels et non-essentiels de différentes variétés de cerises	85
Tableau II.4. Teneurs en fructose, glucose et saccharose présents dans les résidus de différentes variétés de pommes	88
Tableau II.5. Composés phénoliques de différentes variétés de pommes	88
Tableau II.6. Composés phénoliques de la peau de différentes variétés de pommes	89
Tableau II.7. Composés phénoliques de la pulpe de différentes variétés de pommes	89
Tableau II.8. Analyse quantitative de composés triterpéniques de pommes Annurca	90
Tableau II.9. Constante diélectrique et facteur de pertes pour différents solvants	100
Tableau II.10. Valeurs cutoff en UV pour les solvants les plus utilisés	105
Tableau II.11. Propriétés de solvants qui peuvent être utilisés en SFC (d'après [105])	110
Tableau II.12. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	113

## III. COMPOSES BIOACTIFS OBTENUS DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau III.1. Absorption UV des composés majoritaires des extraits de cerises	136
Tableau III.2. Caractéristiques physico-chimiques de la colonne Pursuit XRs C18e	147
Tableau III.3. Gradient d'élution HPLC	148
Tableau III.4. Paramètres utilisés lors de l'extraction assistée par microondes de composés de résidus de pommes Royal Gala	153
Tableau III.5. Formules structurales et spectres d'absorption des standards étudiés	160
Tableau III.6. Caractéristiques des colonnes utilisées pour la séparation de standards de triterpènes	163
Tableau III.7. Paramètres des sources d'ionisation utilisées	177



Tableau III.8. Valeurs des rapports $m/z$ des différents ions observés dans le spectre de masse des 12 standards. Sources ESI et APCI en mode négatif et positif	180
Tableau III.9. Ions caractéristiques des composés phénoliques de l'extrait de résidus de pommes Gala	182
Tableau III.10. Ions caractéristiques des composés triterpéniques de l'extrait de résidus de pommes Gala	182
Tableau III.11. Ions caractéristiques des composés triterpéniques de l'extrait de résidus de pommes Gala (analyse par HPLC-MS-APCI sur une colonne PGC)	185
Tableau III.12. Propositions de formules brutes et de structures pour les pics collectés en SFC à partir de l'extrait de résidus de pommes Gala	186
Tableau III.13. Propositions de formules brutes et de structures pour les pics collectés en SFC à partir de l'extrait de résidus de pommes Granny Smith	186

#### **IV. MANAGEMENT DE LA VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS PAR EXTRACTION DE COMPOSES BIOACTIFS**

Tableau IV.1. Aspects environnementaux du processus d'obtention de principes actifs	214
Tableau IV.2. Evaluation du niveau de risque	216
Tableau IV.3. Evaluation de l'impact des aspects environnementaux	217
Tableau IV.4. Liste des aspects environnementaux significatifs	217
Tableau IV.5. Valeurs de l'indice de pollution globale	219



## **INTRODUCTION GENERALE**





## INTRODUCTION GENERALE

Les fruits sont intégrés dans l'alimentation humaine quotidienne depuis toujours. Ayant des couleurs, des goûts et des arômes très attirants, ils constituent un des éléments essentiels du régime alimentaire. Frais ou sous forme de produits transformés, les fruits constituent une source inépuisable de nutriments dont les métabolites secondaires sont parmi les plus importants.

L'isolement et la caractérisation de ces composés connus généralement sous l'appellation de « composés bioactifs » constituent un sujet de recherche très actuel. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Cet intérêt particulier est dû au fait qu'au cours des dernières années, les hommes ont commencé à se réorienter vers l'utilisation de produits naturels au détriment de ceux issus de la synthèse chimique. De plus, les résultats des études épidémiologiques mettent en évidence la capacité de ces composés bioactifs à participer au bon déroulement des fonctions vitales de l'organisme humain. Les multiples effets bénéfiques de ces composés issus de sources naturelles sont attribués à leurs diverses activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, antivirale, anti inflammatoire etc.).

Dans ce contexte, les présents travaux de recherche abordent les aspects suivants :

- la réalisation d'une étude bibliographique pouvant guider le choix des sources végétales riches en composés bioactifs et des méthodes d'extraction, purification et analyse adéquates ;
- la mise au point de processus éco-responsables de récupération des molécules d'intérêt biologique à partir de fruits et de sous-produits de l'industrie de transformation des fruits ;
- l'analyse des extraits obtenus afin d'identifier les composés bioactifs ;
- le fractionnement des extraits afin de simplifier et de séparer les différentes familles de composés ;
- l'étude des activités antioxydantes des extraits et des fractions afin d'évaluer les effets synergiques entre les différentes molécules;
- le management du processus d'extraction de principes actifs.

Le premier chapitre de ce manuscrit est dédié à l'étude bibliographique concernant l'importance du secteur des fruits et de leurs sous-produits.

Divisé en plusieurs parties, ce chapitre débute avec la présentation des différentes possibilités de valorisation des fruits. Il se poursuit avec la mise en évidence des différents domaines pouvant utiliser les sous-produits de l'industrie de transformation des fruits. La dernière partie du premier chapitre répertorie les principales méthodes d'extraction et d'analyse, des composés bioactifs présents dans les fruits et dans leurs résidus, actuellement utilisés.

D'après l'étude bibliographique, nous avons retenu deux sources végétales différentes : les cerises et les résidus de pommes. Les cerises sont parmi les fruits les plus appréciés par les consommateurs. Ils sont riches en eau, sucres, vitamines, minéraux, composés phénoliques, ces derniers étant principalement responsables de l'activité antioxydante. Les résidus des quatre variétés de pommes (Royal Gala, Golden, Granny Smith et Pink Lady) issus du processus de pressage en vue de l'obtention du jus clair, représentent

environ 30% du produit de départ, et constituent également une source importante de composés bioactifs.

Au cours du deuxième chapitre nous avons premièrement décrit les deux sources végétales choisies : les cerises et les résidus de pommes, en présentant leurs caractéristiques botaniques et leur composition chimique en mettant l'accent surtout sur le contenu en molécules bioactives.

Dans un deuxième temps, nous avons expliqué le principe des méthodes nécessaires au déroulement du processus de récupération des molécules d'intérêt biologique à partir des sources d'origine végétales ciblées. Nous avons tout d'abord présenté les traitements préliminaires des végétaux, puis décrit les techniques d'extraction utilisées. Les méthodes d'analyse et de fractionnement des extraits obtenus ont été ensuite présentées. Finalement, nous avons expliqué les principes des tests chimiques permettant d'évaluer l'activité antioxydante des extraits et de leurs fractions.

Organisé en deux parties distinctes le troisième chapitre de ce mémoire a été consacré à la présentation des résultats obtenus.

Dans la première partie nous avons discuté les effets des différents paramètres d'extraction assistée par microondes sur la récupération des composés phénoliques de cerises. Nous avons continué par l'étude comparative des possibilités de fractionnement des extraits et nous avons fini par l'analyse des fractions purifiées.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous avons comparé plusieurs techniques d'extraction dans le processus de récupération de molécules bioactives de résidus de pommes. Ainsi, différentes conditions d'extraction et différents solvants ont été testés. Plusieurs méthodes chromatographiques ont été développées afin d'analyser les extraits obtenus. Ensuite, ces extraits ont été fractionnés par extraction liquide-liquide afin de les simplifier et de pouvoir assurer une meilleure caractérisation des composés présents. Les extraits et leurs fractions ont été soumis à des tests chimiques capables de mettre en évidence une activité antioxydante.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit a comme objectif le management de la valorisation des fruits et de leurs résidus par extraction de principes actifs. Ainsi, il inclut les principaux aspects environnementaux ressortant des étapes déroulées lors de la récupération de molécules d'intérêt biologique. Il continue avec l'évaluation de ces aspects et avec la quantification de leur impact sur l'environnement. Ce dernier chapitre inclut également quelques possibilités de remédiation des aspects environnementaux significatifs.

Le présent mémoire se termine par la présentation de conclusion générales et de perspectives dégagées du déroulement des activités de recherche.



## **CHAPITRE I**

# **LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS**





## I. 1. LES FRUITS DANS L'ALIMENTATION HUMAINE

Les fruits représentent un des éléments essentiels pour une alimentation équilibrée et sont connus pour leur rôle dans l'entretien des fonctions vitales de l'organisme humain. La valeur alimentaire, diététique et thérapeutique des fruits est unanimement acceptée. Ils sont souvent considérés comme des « aliments fonctionnels » grâce au contenu riche en divers micronutriments tels que les composés phénoliques (reconnus notamment pour leur fort pouvoir antioxydant), les minéraux, les vitamines etc.

Conformément aux données statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, en 2010, plus de 600 millions de tonnes de fruits ont été obtenues au niveau mondial (Figure I.1) dont plus de 67 millions de tonnes en Europe. Comme nous pouvons constater de l'illustration présentée dans la Figure I.2 dans la région européenne les principaux producteurs des fruits sont l'Italie, l'Espagne et la France avec 70% du total. Parmi les fruits obtenus dans les plus importantes quantités (Figure I.3) les 5 premières positions sont occupées par les raisins, les pommes, les agrumes, les fruits rouges et les pêches.

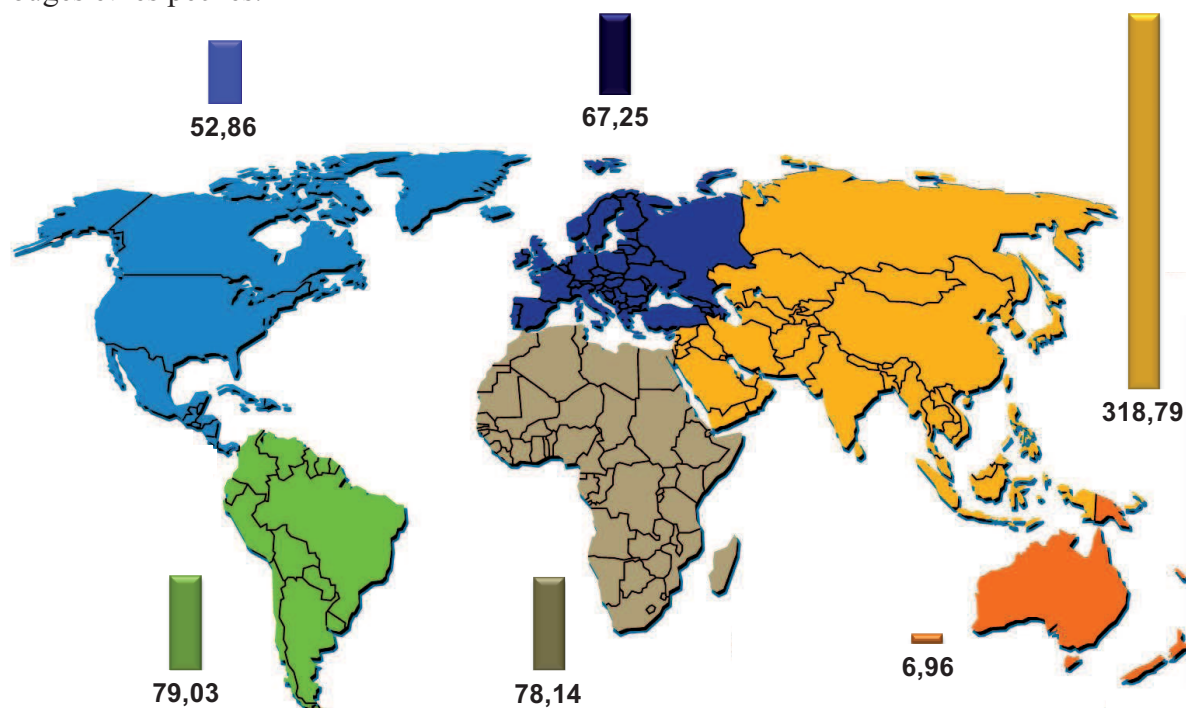


Figure I.1. Production mondiale de fruits en 2010 (millions de tonnes) [1]

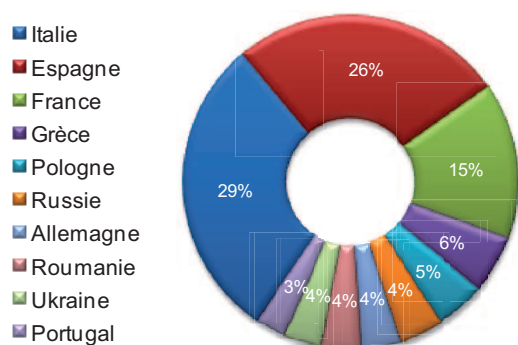


Figure I.2. Les plus importants producteurs des fruits d'Europe [1]

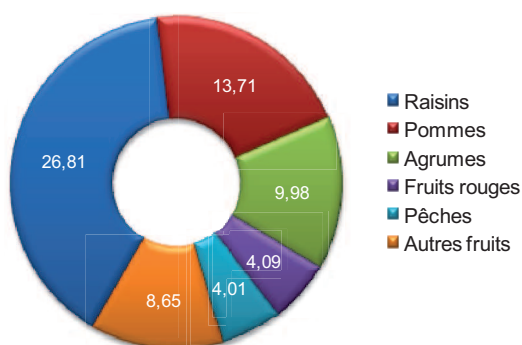


Figure I.3. Les fruits obtenus en Europe (millions de tonnes) [1]



Même si la production totale des fruits peut satisfaire les besoins de la population (surtout grâce aux multiples échanges commerciaux qui se déroulent entre les producteurs des différentes régions et pays du monde), de nos jours, le défi alimentaire n'est plus seulement d'ordre quantitatif mais aussi d'ordre qualitatif.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré un lien entre la consommation de fruits et l'évolution de diverses maladies. Elles montrent qu'une alimentation riche en fruits peut diminuer le risque d'apparition et améliorer les effets de maladies telles que celles cardio-vasculaires [2-5] et cérébraux-vasculaires [6], le diabète [7-8], l'ostéoporose [9-11], la cataracte [12], la dégénérescence maculaire [13], les différents types de cancers [14-17] etc.

Cette évolution explique pourquoi lors de ces dernières années, les chercheurs ont montré un réel intérêt pour l'étude de différents composants de fruits (bénéfiques pour la santé humaine) et notamment pour la compréhension de leur mode d'action afin de mieux connaître les avantages et les éventuels inconvénients conférés par la consommation des fruits sous différentes formes.

## I. 2. VALORISATION DES FRUITS

### I. 2. 1. Fruits frais

Les effets bénéfiques des fruits sur la santé humaine ont été depuis toujours reconnus. A partir de 1988 le programme « 5 a Day » (5 par jour) qui a débuté en Californie et s'est répandue facilement autour du monde, incite la population à consommer minimum 5 fruits quotidiennement.

L'immense diversité des fruits permet une grande variété d'options, le choix des consommateurs étant influencé notamment par les qualités organoleptiques (saveur et arôme, couleur, consistance) mais aussi par la valeur nutritionnelle représentée par la teneur en eau, sucres, acides organiques, lipides, protides, macro- et micronutriments.

Les fruits peuvent être classés dans plusieurs catégories en fonction de différents critères tels que la région géographique de provenance, les aspects botaniques ou la composition.

Ainsi, selon le premier critère mentionné antérieurement nous pouvons distinguer :

- les fruits de région tempérée : pommes, poires, cerises, prunes ;
- les fruits sous tropicaux : figues, agrumes ;
- les fruits tropicaux : ananas, bananes, litchis, mangues.

Du point de vue botanique les fruits peuvent être divisés en plusieurs classes :

- fruits à pépins : pommes, poires, coings ;
- fruits à noyau (drupes) : cerises, prunes, abricots, pêches ;
- baies simples : myrtilles, groseilles, raisins ;
- baies multiloculaires (hespérides) : agrumes ;
- baies fausses : mûres, framboises ;
- infrutescences : ananas [18].

Selon la teneur en sucres les fruits peuvent être classés comme présenté dans le Tableau I.1.

Tableau I.1. Classification des fruits frais [19]

<i>Classe de fruits</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Exemples</i>
Fruits acides	- acidité titrable forte - teneur en sucre élevée	- agrumes : oranges, citrons, pamplemousses, mandarines, clémentines - baies acides : groseilles, fraises, framboises, mûres, cassis
Fruits sucrés	- acidité titrable faible - teneur en sucre élevée	- fruits à noyau : prune, pêches, abricots, cerises - fruit à pépins : pommes, poires
Fruits fortement sucrés	- plus de 20% sucres	- raisins, figes, bananes

Vu la grande diversité des fruits et étant donné qu'il est fortement conseillé qu'ils soient consommés surtout frais, un stockage plus ou moins long est nécessaire. Ce stockage dépend des caractéristiques des fruits. Il peut-être réalisé, par exemple, sous atmosphère contrôlée [20] ou par traitement avec des radiations gamma ou ultraviolets [21] dans des conditions strictement hygiéniques. Le choix de l'espace de stockage et des méthodes de stockage appropriées est influencé par différents facteurs parmi lesquels nous pouvons citer : la température de stockage, l'humidité relative de l'air de l'espace de stockage, la composition de l'atmosphère, la ventilation, la lumière etc.

## I. 2. 2. Transformation des fruits

Même si la globalisation actuelle du marché assure la disponibilité des fruits frais tout au long de l'année, une importante partie est soumise à différents processus de transformation afin d'obtenir des nouveaux produits satisfaisant les différentes demandes actuelles des consommateurs.

Dans la Figure I.4 sont présentés schématiquement les principaux types de produits obtenus à partir de fruits.

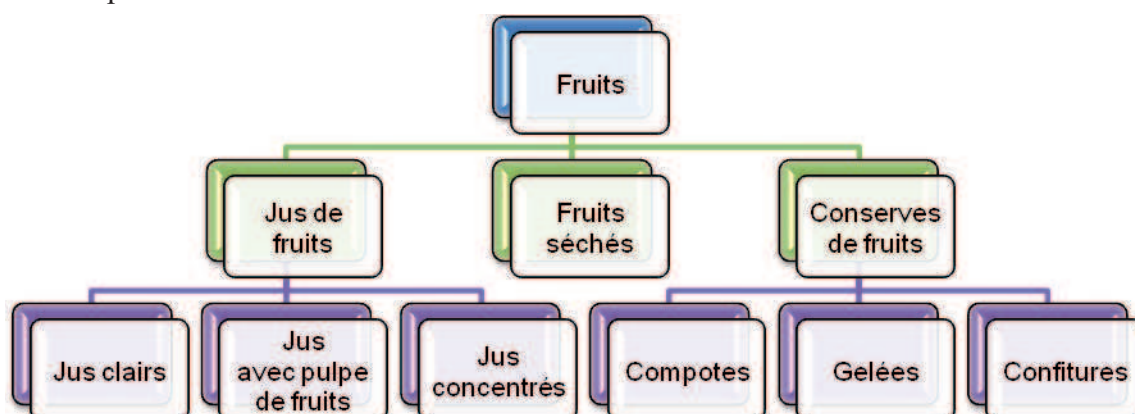


Figure I.4. Produits obtenus à partir de fruits

Nous avons vu que la consommation des fruits frais nécessite surtout un bon choix des conditions de stockage. Par contre lors de la transformation industrielle de ces fruits dans différents produits les étapes impliquées sont beaucoup plus nombreuses et entraînent l'apparition de certains résidus.

Par la suite nous allons nous intéresser aux différents domaines d'utilisation des résidus agro-alimentaires des traitements de fruits en mettant l'accent notamment sur les résidus de pommes.

## I. 3. VALORISATION DES SOUS-PRODUITS ISSUS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DE FRUITS

La valorisation des fruits sous forme de produits séchés, concentrés, congelés etc. conduit à l'apparition d'une gamme variée de sous-produits et déchets composés notamment de pulpe de fruits, de peaux, de pépins et de queues.

Ces sous-produits sont facilement dégradables. Leur stockage et leur utilisation sont conditionnés par des restrictions légales.

### I. 3. 1. Cadre réglementaire lié à l'utilisation de sous-produits de fruits

Vu la grande diversité d'appellations utilisées pour désigner les résidus obtenus après la transformation des fruits et les processus dans lesquels ils sont impliqués il est apparu important de présenter quelques définitions.

Ainsi, conformément à l'article 3 (ci-dessous reporté) de la directive 2008/98/CE du Parlement Européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relative aux déchets [22] on entend par:

- **Déchets** – toute substance ou tout objet dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire.
- **Bio-déchets** – les déchets biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine issus des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires.
- **Producteur de déchets** – toute personne dont l'activité produit des déchets (producteur de déchets initial) ou toute personne qui effectue des opérations de prétraitement, de mélange ou autre conduisant à un changement de nature ou de composition de ces déchets.
- **Détenteur de déchets** – le producteur des déchets ou la personne physique ou morale qui a les déchets en sa possession.
- **Négociant** – toute entreprise qui entreprend pour son propre compte l'acquisition et la vente ultérieure de déchets, y compris les négociants qui ne prennent pas physiquement possession des déchets.
- **Courtier** – toute entreprise qui organise la valorisation ou l'élimination de déchets pour le compte de tiers, y compris les courtiers qui ne prennent pas physiquement possession des déchets.
- **Gestion des déchets** – la collecte, le transport, la valorisation et l'élimination des déchets, y compris la surveillance de ces opérations ainsi que la surveillance des sites de décharge après leur fermeture et notamment les actions menées en tant que négociant ou courtier.
- **Collecte** – le ramassage des déchets, y compris leur tri et stockage préliminaires, en vue de leur transport vers une installation de traitement des déchets.
- **Collecte séparée** – une collecte dans le cadre de laquelle un flux de déchets est conservé séparément en fonction de son type et de sa nature afin de faciliter un traitement spécifique.

- **Prévention** – les mesures prises avant qu'une substance, une matière ou un produit ne devienne un déchet et réduisant:
  - la quantité de déchets, y compris par l'intermédiaire du réemploi ou de la prolongation de la durée de vie des produits;
  - les effets nocifs des déchets produits sur l'environnement et la santé humaine;
  - la teneur en substances nocives des matières et produits.
- **Réemploi** – toute opération par laquelle des produits ou des composants qui ne sont pas des déchets sont utilisés de nouveau pour un usage identique à celui pour lequel ils avaient été conçus.
- **Traitement** – toute opération de valorisation ou d'élimination, y compris la préparation qui précède la valorisation ou l'élimination.
- **Valorisation** – toute opération dont le résultat principal est que des déchets servent à des fins utiles en remplaçant d'autres matières qui auraient été utilisées à une fin particulière, ou que des déchets soient préparés pour être utilisés à cette fin, dans l'usine ou dans l'ensemble de l'économie.
- **Préparation en vue du réemploi** – toute opération de contrôle, de nettoyage ou de réparation en vue de la valorisation, par laquelle des produits ou des composants de produits qui sont devenus des déchets sont préparés de manière à être réutilisés sans autre opération de prétraitement.
- **Recyclage** – toute opération de valorisation par laquelle les déchets sont retraités en produits, matières ou substances aux fins de leur fonction initiale ou à d'autres fins. Cela inclut le retraitement des matières organiques, mais n'inclut pas la valorisation énergétique, la conversion pour l'utilisation comme combustible ou pour des opérations de remblayage.
- **Élimination** – toute opération qui n'est pas de la valorisation même lorsque ladite opération a comme conséquence secondaire la récupération de substances ou d'énergie. Parmi les opérations d'élimination on compte :
  - le dépôt sur ou dans le sol ;
  - le traitement en milieu terrestre ;
  - l'injection en profondeur ;
  - le lagunage ;
  - la mise en décharge spécialement aménagée ;
  - le rejet dans le milieu aquatique, sauf l'immersion ;
  - l'immersion, y compris enfouissement dans le sous-sol marin ;
  - le traitement biologique aboutissant à des composés ou à des mélanges qui sont éliminés selon un des procédés indiqués auparavant ;
  - le traitement physico-chimique aboutissant à des composés ou à des mélanges qui sont éliminés selon l'un des procédés indiqués auparavant (par exemple, évaporation, séchage, calcination) ;
  - l'incinération à terre ;
  - l'incinération en mer ;
  - le regroupement ou mélange préalablement à l'une des opérations indiquées auparavant ;
  - le reconditionnement préalablement à l'une des opérations indiquées auparavant ;
  - le stockage préalablement à l'une des opérations indiquées auparavant (à l'exclusion du stockage temporaire, avant collecte, sur le site de production des déchets).

Dans l'article 5, la même directive, définit aussi les sous-produits :

- **Sous-produit** – Une substance ou un objet issu d'un processus de production dont le but premier n'est pas la production dudit bien peut être considéré comme un sous-produit et non comme un déchet au sens de l'article 3 que si les conditions suivantes sont remplies:
  - l'utilisation ultérieure de la substance ou de l'objet est certaine;
  - la substance ou l'objet peut être utilisé directement sans traitement supplémentaire autre que les pratiques industrielles courantes;
  - la substance ou l'objet est produit en faisant partie intégrante d'un processus de production;
  - l'utilisation ultérieure est légale, c'est-à-dire que la substance ou l'objet répond à toutes les prescriptions pertinentes relatives au produit, à l'environnement et à la protection de la santé prévues pour l'utilisation spécifique et n'aura pas d'incidences globales nocives pour l'environnement ou la santé humaine [23].

Les termes correspondant aux diverses définitions sont représentés de façon schématique dans la Figure I.5.

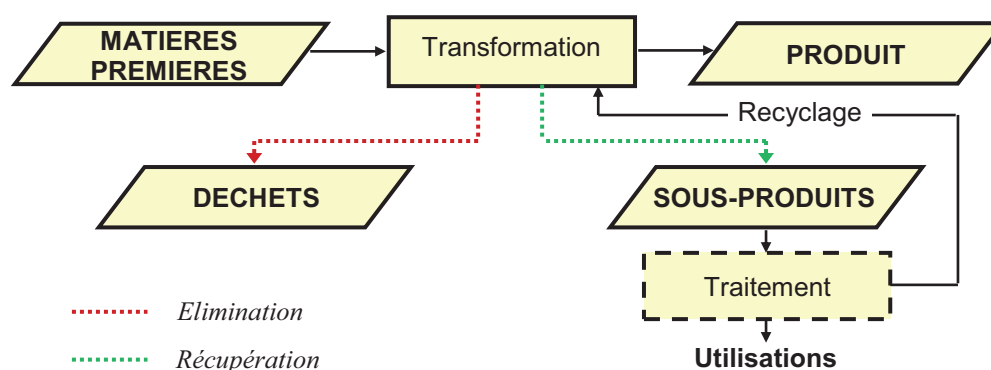


Figure I.5. Schéma illustrant la production de déchets et de sous-produits (résidus)

Par la suite nous allons définir les résidus de fruits comme des matières produites lors de procédés industriels, qui peuvent être recyclées, récupérées ou éliminées.

### I. 3. 2. Directions de valorisation de résidus de fruits

Pour répondre aux soucis environnementaux concernant la valorisation de sous-produits, l'industrie de la transformation des fruits est souvent confrontée à plusieurs solutions :

- **Alimentation animale :**
  - elle est la plus ancienne direction d'utilisation des résidus de fruits ;
  - le plus souvent elle implique des investissements dans une technologie permettant de fournir un sous-produit sain et de bonne valeur nutritionnelle ;
  - il faut toutefois remarquer qu'elle n'élimine pas totalement les rejets dans l'environnement. Elle les diminue mais les reporte sur les déjections animales.
- **Epannage, compostage ;**
- **Production d'énergie :** par incinération ou par production de biogaz (en cogénération, par exemple avec des déjections animales) ;
- **Récupération de différents constituants** incorporables dans de nouveaux produits agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Nous allons voir par la suite quelques exemples d'utilisation des sous-produits issus de la transformation de fruits dans différents domaines.

### **I. 3. 2. 1. Valorisation dans l'alimentation animale**

La composition des sous-produits de l'industrie de valorisation de fruits est extrêmement variable.

Les résidus de fruits constituent un produit éminemment instable qui doit être traité rapidement. Le traitement le plus simple est le surpressage qui a essentiellement le rôle de diminuer le volume et d'augmenter la densité de la matière par diminution de la quantité de liquide résiduel. Ceci facilite l'ensilage en amenant le taux de matière sèche à 30 – 40% ce qui entraîne aussi la réduction du coût du transport.

En général, la valeur énergétique des résidus de fruits est assez élevée, grâce aux pectines digestibles et aux sucres.

Les ruminants sont les premiers utilisateurs des résidus de fruits frais ou ensilés. Grâce aux microorganismes de leur rumen, ils peuvent utiliser les sous-produits riches en fibres ou contenant certains facteurs antinutritionnels qui ne sont pas supportés par les monogastriques. Compte tenu de l'appétence des animaux, mais aussi des teneurs en acides organiques et en alcool des résidus de fruits, plus ou moins élevées, il est indispensable d'en limiter l'apport quotidien dans une fourchette de 0,5 à 1,1 kg de matière sèche pour 100 kg de poids d'animal vivant. Si l'ensilage est riche en alcool, il peut être parfaitement toléré par les bovins, jusqu'à des doses correspondant à 200 g d'alcool par jour. Afin d'atteindre l'équilibre de la ration des ruminants il est nécessaire d'ajuster les apports complémentaires en matières azotées et minérales [24].

Différentes études ont été réalisées afin de déterminer l'influence des ajouts de résidus de fruits dans l'alimentation animale.

Chez les porcins, les résidus ensilés peuvent être utilisés jusqu'à des quantités correspondant à 15 % de la matière sèche, s'ils ne sont pas trop riches en alcool (risque de cirrhose hépatique). Le plus souvent les résidus de fruits sont incorporés, sous forme sèche, dans un aliment complet. Dans ce cas la proportion est réduite, compte tenu de son prix plus élevé et de la teneur en cellulose [24].

Joshi *et al.* [25] ont évalué l'enrichissement de résidus de pommes en différents nutriments en vue de l'utilisation dans l'alimentation des animaux. Par rapport au matériel de départ, après la fermentation à l'état solide avec différentes levures et l'élimination de l'éthanol, les résidus de pommes séchés ont été 3 fois plus riches en protéines et 2 fois plus riches en graisses et en vitamine C. L'étude a indiqué aussi un contenu plus élevé en minéraux et en fibres brutes. Le contenu en protéines solubles a augmenté légèrement pendant que le contenu en sucre a diminué.

Villas-Bôas *et al.* [26] ont montré aussi que les résidus de pommes peuvent être convertis dans un substrat ayant des caractéristiques nutritionnelles améliorées en particulier en ce qui concerne le niveau de protéines et la digestibilité.

Dans une autre étude [27], la valeur nutritive de résidus de pommes séchés pendant 2 heures à 80°C ou ensilés a été comparée avec celle de l'ensilage de maïs. 1 tonne de chaque type de résidus de pommes a été mélangée avec 100 kg de paille humide et 5 kg d'urée. Après stockage dans un tank de 30 tonnes pendant 45 jours, différents paramètres ont été suivis pour chaque mélange (Tableau I.2).

Afin de déterminer le taux de la matière organique digestible et d'estimer le contenu en énergie métabolisable une étude *in vivo* a été menée sur trois moutons. Ces deux

paramètres ont été supérieurs pour les résidus de pommes séchés par rapport aux résidus de pommes ensilés.

**Tableau I.2. Composition chimique moyenne des aliments pour les animaux [27]**

<i>Analyse</i>	<i>Résidus de pommes séchés</i>	<i>Résidus de pommes ensilés</i>	<i>Maïs ensilé</i>
Matière sèche, g/kg	749	284	429
Matière organique, g/kg MS*	929	925	936
Protéines brutes, g/kg MS	64	72	76
Fibre de détergent acides, g/kg MS	405	460	260
Fibre de détergent neutre, g/kg MS	473	567	463
Lignine, g/kg MS	10	20	44
Azote insoluble en détergent acide, g/kg MS	5,6	6,5	4,4

\*MS – matière sèche

Plusieurs facteurs affectent négativement la valeur des résidus de fruits tels que ceux de pommes en tant que nourriture pour les animaux. Premièrement, les résidus de pommes sont difficilement digestibles à cause du rapport élevé de lignine/cellulose. Deuxièmement, les résidus de pommes ont un contenu élevé en sucres libres qui, après ingestion et fermentation dans le rumen, provoque l'alcoolémie des animaux. Troisièmement, le contenu des résidus de pommes est pauvre en protéines, vitamines et minéraux ce qui contribue à la diminution du niveau nutritionnel de la pomace.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour augmenter la digestibilité de la lignocellulose. Ces méthodes se basent souvent sur la décomposition de la lignine après la destruction du complexe cellulose-lignine. Le principal problème de la dégradation biologique de la lignocellulose est la sélection des microorganismes capables de dégrader sélectivement la lignine.

### ***1. 3. 2. 2. Valorisation par épandage et compostage***

L'épandage et le compostage reposent sur le recyclage en agriculture des éléments fertilisants contenus dans les effluents ou les produits épandus.

Les plantes cultivées prélèvent des éléments minéraux du sol pour élaborer leurs tissus. Une partie de ces éléments est exportée par la récolte (ou par prélèvement par les animaux d'élevage lors du pâturage). Afin d'éviter toute baisse de fertilité, ces exportations d'éléments minéraux doivent être compensées par des apports minéraux au moins équivalents.

La minéralisation peut s'effectuer sous forme d'apports de minéraux ou à travers des apports de matière organique.

Dans ce dernier cas une étude permettant d'organiser et de prévoir l'ensemble des besoins liés au recyclage en agriculture doit être réalisée. Cette étude comprend les phases suivantes :

- connaissances des produits pour épandage;
- recensement des terres agricoles et caractérisation des sols ;
- détermination de l'aptitude des sols à l'épuration agronomique des produits ;
- calcul des doses sur les différentes cultures ;
- vérification de l'adéquation du périmètre aux besoins de l'épuration ;
- définition des équipements nécessaires ou utiles à prévoir ;
- obtention de référence sur les sols, les eaux, les produits ;
- proposition de programme de suivi et de contrôle [24].

Les résidus de fruits peuvent-être utilisés directement comme fertilisants par épandage mais il est nécessaire de remarquer que si cette pratique n'est pas suffisamment contrôlée elle peut entraîner certains risques liés à un excès d'éléments minéraux qui peut provoquer :

- des fortes perturbations de la flore présente ;
- un déséquilibre des minéraux présents dans le sol ;
- une accumulation des minéraux et des métaux lourds dans le sol ;
- des fuites de ces minéraux vers les milieux aqueux.

Par rapport à l'épandage, le compostage est un processus aérobie qui implique plusieurs étapes (Figure I.6.) au cours desquelles des microorganismes thermophiles (température optimale de développement autour de 50°C) transforment le matériel organique dans un produit stable ressemblant au sol.

Le matériel végétal utilisé pour compostage doit être soumis à une étape préliminaire de réduction du contenu d'eau (de 80-90% jusqu'à 50-60%) par pressage ou par séchage naturel. La neutralisation du pH qui est, en général, acide est également nécessaire [28]. Le compostage permet la réduction du volume de sous-produits organiques avec 40%. De plus, les températures atteintes (40-70°C) tuent la plupart des pathogènes.

Plusieurs modes de compostage plus ou moins complexes peuvent être réalisés. On distingue toutefois :

- le compostage lent – réalisé sur des aires de fermentation ou des aires de maturation ;
- le compostage accéléré – effectué dans un bioréacteur rotatif, dans un tour de fermentation ou dans une cellule horizontale de fermentation [29].

Indépendamment de la méthode de compostage le développement des microorganismes nécessite des conditions spécifiques et il est influencé par la température, la concentration en oxygène, le pH, l'humidité, le rapport carbone : azote etc.

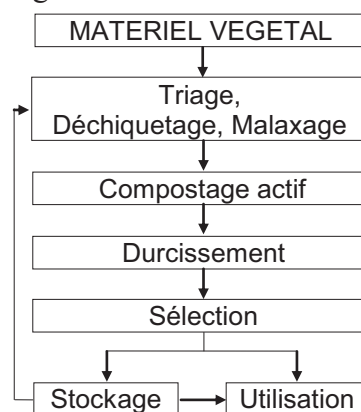


Figure I.6. Diagramme d'un processus de compostage [28]

### I. 3. 2. 3. Valorisation sous forme de biomasse et d'agro carburants

#### Obtention de la biomasse

Certains types de microorganismes, en particulier, les levures, peuvent utiliser les sucres solubles et les acides organiques pour produire de la biomasse ayant un contenu élevé en protéines. Les levures sont des microorganismes communs qui se développent facilement sur des résidus végétaux.

Par exemple, les résidus issus de la valorisation des agrumes sont souvent colonisés par des levures mésophiles (température optimale de développement située autour de 25-40°C) [30]. Srilatha *et al.* [31] ont proposé l'inoculation des levures ou des champignons pour la réduction du contenu en acides organiques de résidus d'oranges avant le traitement aérobie. Les levures *Candida utilis* ont été sélectionnées pour être cultivées dans les effluents concentrés de l'industrie de valorisation de fruits après traitements acidogènes anaérobies [32].

Une autre approche intéressante consiste dans l'augmentation de la valeur nutritionnelle de la biomasse de levure par enrichissement en sélénium, élément identifié comme un antioxydant important dans la diète humaine. Dans des conditions appropriées les levures sont capables d'accumuler d'importantes quantités de sélénium et d'incorporer des



composés riches en sélénium, notamment la sélénométhionine (considérée comme la meilleure source de sélénium pour les organismes vivants). La production de biomasse de levures utilisant des extraits de matière organique végétale facilement soluble a été proposée comme première étape dans la technologie de bioconversion des résidus végétaux en sous-produits à valeur ajoutée suivie par des traitements aérobies ou anaérobies du déchet solide. La matière organique de résidus de la transformation de fruits peut-être facilement extraite à l'eau, les extraits pouvant être utilisés pour la production de la biomasse de levure sans avoir besoin de suppléments nutritifs. Les résultats indiquent le fait qu'à partir d'une tonne de résidus frais de fruits on peut obtenir 10 kg de biomasse de levure séchée avec un contenu élevé en sélénium et en protéines [33].

### Obtention des agro carburants

La forte industrialisation au niveau mondial a conduit à l'augmentation de la demande de combustibles à base de pétrole. De nos jours 80% des combustibles utilisés sont d'origine fossile et plus de 50% ont comme destination le transport. Les combustibles fossiles sont épuisables et contribuent à l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre ce qui entraîne des effets négatifs incluant les changements climatiques, le recul des glaciers, l'élévation du niveau de la mer, la perte en biodiversité etc.

Ces facteurs conduisent à rechercher de nouvelles sources d'énergie alternative [34] dont les agro combustibles. Ceux-ci peuvent être classés selon différents critères. Une des classifications existantes les divise en primaires et secondaires. Ceux primaires sont utilisés pour chauffage, pour la production d'électricité alors que ceux secondaires (obtenus par la valorisation de la biomasse *e.g.* éthanol, biodiesel etc.) peuvent être utilisés dans différents processus industriels et selon les matières premières et la technologie d'obtention se classent en agro combustibles de première, deuxième et troisième génération.

#### Obtention du bioéthanol

Une alternative reconnue pour les combustibles pétroliers est représentée par le bioéthanol dont la production obtenue entre 2005 et 2010 et une estimation de celle pour l'année 2011 sont présentées dans la Figure I.7.

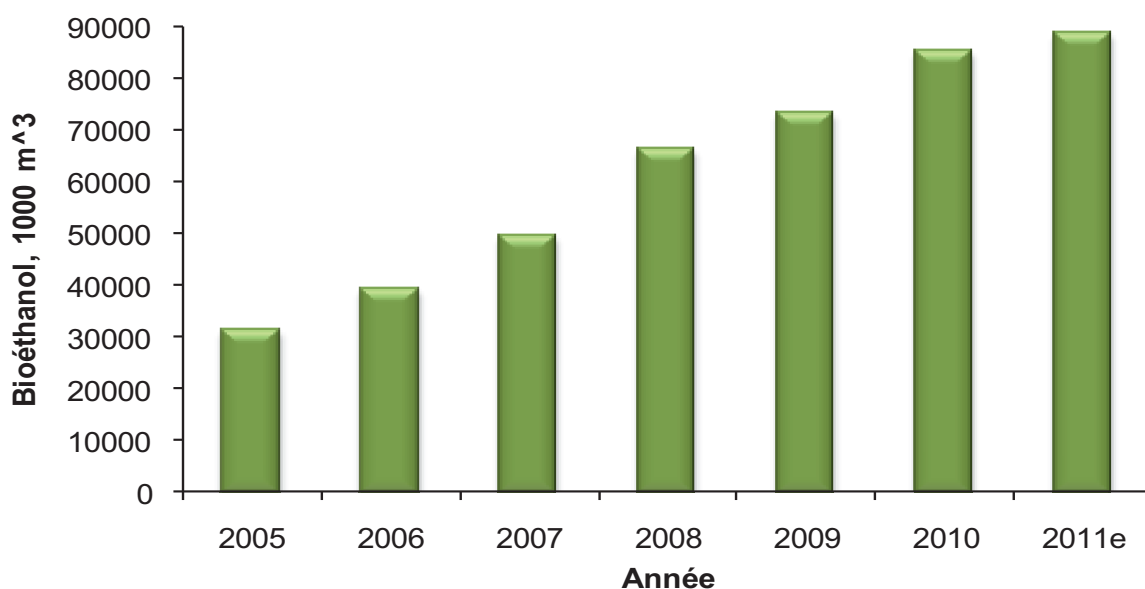


Figure I.7. Production mondiale de bioéthanol [35]  
2011e – valeur estimée

Le bioéthanol est le biocarburant le plus produit au monde avec plus de 74 milliards de litres en 2009. Ce chiffre est dû essentiellement à la production des États-Unis (54%) et du Brésil (34%). Aux États-Unis, l'Association des Combustibles Renouvelables (RFA – Renewable Fuel Association) a estimé la production de bioéthanol à plus de 40 milliards de litres en 2009 obtenus à partir de maïs. Pendant la même année, le Brésil a atteint une production de près de 25 milliards de litres (dont plus de 4 milliards destinés à l'exportation), obtenus principalement à partir de canne à sucre. Avec une production de 3,7 milliards de litres en 2009, l'Union Européenne se positionne au troisième rang mondial. Plus récemment, l'Asie (en particulier la Chine, la Thaïlande et l'Inde) s'est aussi lancée dans la production de bioéthanol à grande échelle et compte parmi les plus gros potentiels producteurs dans les années à venir. En 2009, la production de bioéthanol-carburant en Chine a dépassé 2 milliards de litres, plaçant ainsi le pays au quatrième rang mondial, derrière l'Union Européenne [36].

Généralement, le bioéthanol est produit à partir de matières premières telles que celles riches en saccharose (betterave, canne à sucre) ou féculé (blé, maïs, orge) ou à partir de la biomasse lignocellulosique qui est un matériau constitué de macromolécules oxygénées de nature glucidique (bois, pailles, bagasses). Le processus de production implique plusieurs étapes capables d'assurer la transformation des matières premières en bioéthanol dont l'hydrolyse (acide et / ou enzymatique) et la fermentation sont les plus importantes [37].

A part les matériels cités antérieurement d'autres sources végétales riches en sucres telles que les fruits et les résidus de fruits peuvent être utilisées pour l'obtention du bioéthanol.

Ainsi, Patle *et al.* [38] ont utilisé les résidus de différents fruits (pommes, oranges, mangues, ananas) en tant que substrats pour la production du bioéthanol. Les résultats obtenus indiquent le fait que les résidus de pommes contiennent la quantité la plus importante de sucres fermentescibles et permettent l'obtention du volume le plus élevé de bioéthanol.

Sharma *et al.* [39] sont arrivés à la conclusion que les résidus de tangerine Kinnow (hybride de mandarine et d'orange amère) en combinaison avec les peaux de bananes peuvent constituer un bon substrat pour la production du bioéthanol par fermentation.

Plusieurs autres recherches [40-43] ont eu comme objectif l'obtention du bioéthanol en présence de résidus d'oranges ou des produits obtenus à partir de ces résidus. Une de ces études [44] montre que la présence de l'huile des peaux d'oranges dans le milieu de fermentation inhibe la production du bioéthanol à cause du contenu élevé en limonène. Une autre étude [43] indique le fait que la fermentation induite par *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus* est inhibée par la présence de l'huile de peaux d'oranges. Les concentrations minimales d'huile de peaux d'oranges pour lesquelles le rendement en éthanol est inhibé à 30°C et à 37°C sont présentées dans la Figure I.8. Aucune inhibition de la production d'éthanol n'a été observée à une concentration en huile de peaux d'agrumes inférieure ou égale à 0,2% après 96 h.

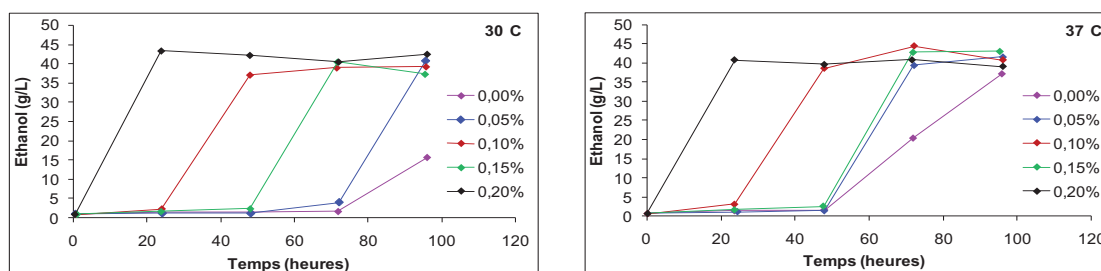


Figure I.8. Ethanol produit par *Saccharomyces cerevisiae* en solutions de résidus d'agrumes hydrolysés en présence d'huile de peaux d'oranges en différentes concentrations [43]

Les mécanismes par lesquels le limonène et autres mono terpènes similaires inhibent le fonctionnement et le développement des microorganismes ont été sujets à des nombreuses études. Il a été constaté que le cyclohexane et le  $\beta$ -pinène (mono terpène similaire au limonène) inhibent la consommation d'oxygène et l'assimilation des ions de potassium par les cellules de levures. L'assimilation de ces ions peut-être accélérée soit par glycolyse utilisant le glucose soit par phosphorylation oxydative utilisant l'éthanol [43].

### **Obtention du biogaz**

Plusieurs études ont été réalisées sur la génération du méthane utilisant la fermentation anaérobie des résidus végétaux. L'effet de la température sur la digestion de ces résidus a été exploré dans des conditions psychrophiles (20°C), mésophiles (35°C) et thermophiles (55°C) en réacteurs tubulaires conduisant à un rendement élevé en biogaz. La digestion anaérobie des résidus issus de la transformation des pommes, de l'ananas et de la betterave ont conduit à un rendement de 0,429-0,568 L biogaz / g de charge totale de solide volatil avec un contenu en méthane de 50-60%. La fermentation d'un mélange de résidus d'ananas, de mangues et d'oranges a conduit à 0,6 m<sup>3</sup> biogaz / kg charge de solide volatil après une rétention hydraulique de 20 jours. Par digestion anaérobie des résidus végétaux utilisant des réacteurs thermophiles avec liquéfaction en deux étapes et filtre anaérobie mésophile 420 L méthane / kg solide volatil ont été obtenus. Les résultats ont montré qu'à pH 6,5 tant la liquéfaction que l'acidogène thermophile et mésophile ont été maximales dans la production du méthane [45].

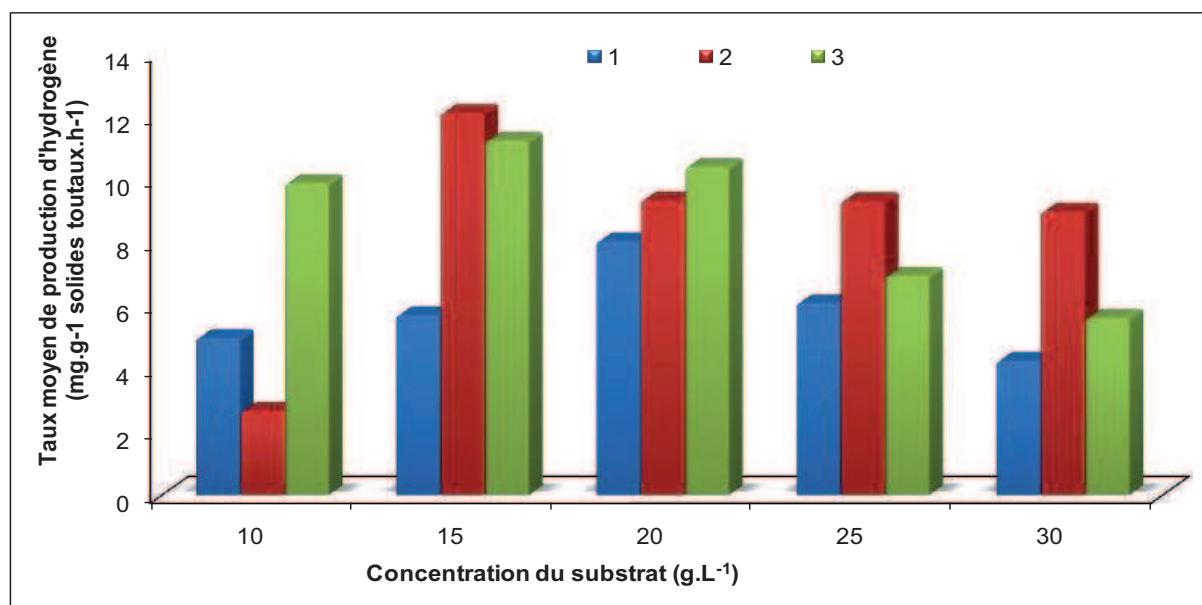
Callghan [46] a constaté une augmentation du rendement en méthane de 0,23 à 0,45 m<sup>3</sup>.kg<sup>-1</sup> solide volatil quand la proportion de résidus de fruits et légumes augmente de 20 à 50% par rapport au fumier.

Une autre étude [47] montre qu'après la fermentation d'un mélange de déchets d'abattoir et de résidus végétaux 0,8-1,0 m<sup>3</sup> gaz.kg<sup>-1</sup> solide peuvent être obtenus.

Llaneza *et al.* [48] ont réalisé un mélange d'intestins de porc, d'estomac de bovins et pulpe de pommes issue de l'industrie cidrière. L'ajout de résidus de pommes a conduit à l'augmentation du rendement en biogaz. Des effets inhibiteurs pour les bactéries méthanogènes ont été constatés pour une concentration en résidus de pommes de 10% du mélange du à l'augmentation des concentrations d'ammoniac et des acides gras volatiles.

La production d'hydrogène à partir de résidus de pommes en utilisant un mélange naturel de microorganismes a été étudié aussi par Feng et ses collaborateurs [49] dans différentes conditions expérimentales. La boue a été utilisée comme souche de microorganismes après avoir été bouillie pendant 15 minutes. Les résultats ont indiqué que le prétraitement optimal de résidus de pommes a été la macération dans une solution d'ammonium 6% pendant 24 heures à température ambiante. Ces résidus ont été fermentés à 37°C et pH 7. L'acide acétique, l'éthanol, l'acide propionique et l'acide butyrique ont été les principaux produits liquides finaux pendant la conversion de résidus de pommes en hydrogène.

Le prétraitement avec de l'acide chlorhydrique, la durée et la température d'hydrolyse enzymatique, le dosage de la cellulase, la durée de soumission aux ultrasons et la concentration en hydrogène pendant la fermentation anaérobie du substrat ont été les paramètres étudiés et optimisés par Wang *et al.* [50] en vue de l'obtention du bio-hydrogène à partir de résidus de pommes (Figure I.9).



**Figure I.9. Hydrogène produit à différentes concentrations du substrat de fermentation [50]**

1. Résidus de pommes : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% - ultrasons ; 2. Résidus de pommes : NH<sub>3</sub> 6% - 24h à 20°C ;  
3. Résidus de pommes : HCl 0,6% - chauffage 2 h à 70°C

Un rendement maximum en hydrogène de 134,04 mL.g<sup>-1</sup> solides totaux et un taux moyen de production d'hydrogène de 12 mL.g<sup>-1</sup> solides totaux.h<sup>-1</sup> ont été obtenus lors de la fermentation d'un mélange hydrolysé de résidus de pommes et d'une solution d'ammonium 6% pour une concentration du substrat de 15 g.L<sup>-1</sup>.

Doi *et al.* [51] ont étudié l'obtention de l'hydrogène par fermentation sur des résidus de pommes en utilisant une microflore dérivée du riz.

### I. 3. 2. 4. Valorisation dans l'industrie alimentaire

#### Obtention de la gelée

Une valorisation possible des résidus de fruits et notamment de ceux de pommes consiste à utiliser leurs propriétés gélifiantes.

Royer *et al.* [52] ont étudié l'optimisation de la production de la gelée à partir de résidus de pommes (Braeburn, Gala, Golden Delicious, Granny Smith en proportion égales) non traités enzymatiquement et de coings broyés. Ainsi, après l'ajout d'eau (25 mL eau pour 100 g résidus de pommes), le mélange a été cuit pendant 15 minutes. Un sirop de sucre en eau (25 mL eau pour 100 g sucre) a été ajouté ensuite. Une nouvelle période de cuisson à 100°C a été suivie par un séchage à température ambiante pendant 48 heures. La formulation a été réalisée par un plan d'expériences et les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de la combinaison résidus de pommes : coings conduit à une gelée ayant des propriétés sensorielles agréables.

#### Obtention de l'huile végétale

L'huile végétale peut-être obtenue par pressage ou par extraction par solvants à partir d'un matériel végétal huileux tel que les pépins des fruits. Ceux-ci doivent être écrasés dans des moulins et ensuite chauffés à la vapeur d'eau jusqu'à une température de 100°C. Le but du chauffage est de faciliter l'élimination ultérieure de l'huile, par la dénaturation et la coagulation partielle des substances protéiques et par la diminution de la viscosité.

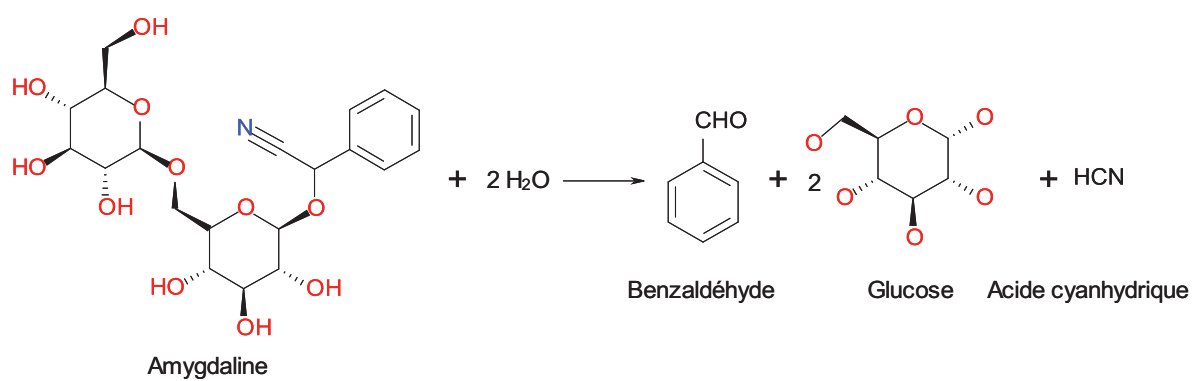
L'huile obtenue doit être raffinée. Pour ce faire, dans un premier temps, il est nécessaire de neutraliser l'acidité de l'huile avec de l'hydroxyde ou du carbonate de sodium. Le passage de l'huile sur du charbon actif suivi par un chauffage sous vide et dégazage dans un courant de dioxyde de carbone ou sous un jet de vapeur d'eau assurent la décoloration et la désodorisation.

L'huile raffinée obtenue à partir de pépins de fruits est composée principalement d'acide oléique, d'acide palmitique, d'acide stéarique etc. présente une odeur et un goût agréables et peut-être utilisée dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire.

### Obtention de l'huile d'amandes amères

Les tourteaux issus de l'extraction de l'huile végétale de pépins de fruits contiennent de l'amygdaline – composé induisant le goût amer de pépins.

Par hydrolyse enzymatique ce composé se transforme en benzaldéhyde (responsable du goût et de l'odeur caractéristiques de l'huile d'amandes), glucose et acide cyanhydrique conformément à la réaction suivante :



Après l'hydrolyse tout le mélange est soumis à la distillation. Ayant une température d'ébullition de 179°C, le benzaldéhyde est entraîné par un courant de vapeur d'eau. Les vapeurs sont ensuite condensées dans un condenseur à l'eau froide. Du condensé, l'huile d'amande est séparée par décantation.

Pour pouvoir être utilisée dans l'industrie alimentaire, l'huile d'amandes amères doit être raffinée pour l'enlèvement total de l'acide cyanhydrique. Pour cela l'huile est chauffée en présence d'hydroxyde de calcium et d'un sel ou elle est traitée avec du bisulfite de sodium et soumise à une nouvelle distillation [53].

### Obtention du vinaigre et de l'alcool alimentaire

Tous les résidus de fruits peuvent-être utilisés pour l'obtention de vinaigre et de l'alcool alimentaire par fermentation à condition d'avoir une teneur minimale de 8% sucres.

Les résidus qui ne sont pas valorisés immédiatement peuvent être conservés par séchage ou par fermentation alcoolique avec des levures sélectionnées tout en évitant le contact avec l'air par le remplissage total des bassins de fermentation.

Dans le premier cas l'élimination de l'air se fait par tassage du matériel, les levures étant ajoutées sous forme de culture liquide. La fermentation se déroule pendant 6-7 jours, la conservation étant assurée pendant 2-3 mois.

Dans le second cas, la conservation est assurée par l'alcool et par le dioxyde de carbone issu du processus de fermentation des sucres par les levures.

Le résidu obtenu par ce processus peut-être utilisé comme fourrage pour les animaux tel quel ou après séchage dans un séchoir à tambour rotatif [53].

### **Obtention de la levure de boulangerie**

Bhushan *et al.* [54] ont étudié la production de la levure de boulangerie en substituant la mélasse (un substrat traditionnel issue de l'industrie sucrière) avec un extrait de résidus de pommes. Ces résidus ont été séchés, broyés, dilués dans l'eau dans un rapport de 1 à 6 et portés à ébullition pendant 30 minutes. Après filtration, le liquide obtenu a été stérilisé et utilisé comme substrat de fermentation pour une souche de *Saccharomyces cerevisiae* v. *diastatic* le rendement expérimental atteint étant de 96%.

## **I. 3. 2. 5. Autres utilisations de sous-produits de l'industrie de fruits**

### **Substrat pour la production de champignons comestibles**

Des bûches synthétiques contenant 100% de résidus de pommes, 100% de sciure ou un mélange des deux en proportions égales ont été utilisés comme substrat pour la production de champignons comestibles : *Lentinula edodes* et *Pleurotus ostreatus*. La sciure (plus lentement dégradable) équilibre les résidus de pommes tout en étant une source supplémentaire d'énergie et de carbone [55].

### **Bio adsorbants pour le traitement des eaux résiduelles**

Les méthodes conventionnelles utilisées pour le traitement des eaux résiduelles contenant colorants, composés aromatiques, métaux lourds etc. sont principalement la coagulation, la floculation, l'osmose inverse [56], la précipitation chimique, les réactions d'oxydoréduction, le traitement électrochimique, la filtration par membranes ou par résines échangeuses d'ions. Ces méthodes sont généralement chères et parfois inefficaces surtout pour des volumes importants d'eaux résiduelles ayant des concentrations relativement réduites en composés volatils [57].

Par conséquent des méthodes d'obtention de bio adsorbants ayant une fonctionnalité améliorée sont toujours en cours de développement. Elles impliquent soit l'utilisation du contenu en composés adsorbants de diverses matières premières, soit l'augmentation de la capacité d'adsorption [58].

Le processus de bio adsorption des métaux lourds des eaux usées, par exemple, implique l'existence d'une phase solide (adsorbant) et d'une phase liquide. Dû à l'affinité élevée de l'adsorbant pour les ions métalliques ces derniers sont attirés et retenus sur la surface de l'adsorbant par des processus complexes qui sont influencés par de nombreux mécanismes tels que : la chemisorption, la complexation, l'adsorption à la surface et dans les pores, l'échange d'ions, la chélation, l'adsorption par forces physiques [59-60] etc.

La lignine, la cellulose, l'hémicellulose à côté de composés tels que les lipides, les protéines, les sucres simples, les hydrocarbures contenant différents groupement fonctionnels (acétamide, carbonyle, phénol, amide, amine, sulfhydryle, carboxyle, alcool, ester) [61] participent à la complexation des métaux. Quelques-uns des bioadsorbants sont non sélectifs et bloquent une gamme large de métaux lourds sans priorités spécifique pour certains types de métaux en fonction de la composition chimique.

La présence des groupements fonctionnels engagés dans la complexation des métaux lourds pendant le processus de bio adsorption ont été rapportées par différentes études utilisant des techniques spectroscopiques [62].

Des atomes, des molécules, des ions et des radicaux polluants de milieux gazeux ou liquides peuvent être adsorbés sur la surface d'un tel matériel. Comme l'adsorption se déroule

à l'interface du milieu solide (l'adsorbant) et du milieu liquide un des critères les plus importants pour l'efficacité de l'adsorbant est sa surface accessible. Le moulinage, la modification chimique ou biochimique, la création d'une structure spécifique sont juste quelques exemples de méthodes disponibles qui peuvent être utilisées pour augmenter la surface d'adsorption. En plus d'une importante surface, l'adsorbant optimal doit posséder aussi une distribution adéquate des pores. Les macropores sont importants pour la vitesse de diffusion et pour la cinétique d'adsorption vu qu'ils conduisent les composés vers les micropores (où se déroule l'adsorption proprement-dite) [58].

Différentes études montrent qu'outre la fibre de laine [63] ou des adsorbants microbiens [64] la peau d'oranges [65] ou les fibres alimentaires de pommes [66] peuvent être utilisées comme adsorbants des métaux lourds dans le traitement des eaux résiduelles.

La pectine – polysaccharide anionique constituant de paroi cellulaire végétale – est obtenue par extraction de la pulpe de betterave, de résidus de pomme ou de peaux d'agrumes et peut être utilisée pour la complexation des métaux lourds conformément à la suivante séquence d'affinité :  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+}$  [57].

Les études réalisées par Ajmal *et al.* [67] indiquent que les ions nickel ont une affinité plus importante pour les peaux d'oranges que les ions cuivre, plomb, zinc ou chrome.

Maranon *et al.* [68] ont observé que les métaux lourds retenus sur les résidus de pommes peuvent être élués avec HCl. Une augmentation du pH conduit à l'augmentation de l'adsorption d'ions cuivre, cobalt, nickel et zinc. Cette constatation peut être expliquée par la diminution de la compétition des protons pour le même site de complexation.

Schiewer *et al.* [57] ont utilisé des matériels bio adsorbants riches en pectine et ont constaté que les peaux de raisins présentent la capacité de rétention de métaux lourds la plus élevée suivies par les peaux d'oranges et de citrons. Un facteur important dans la sélection de résidus possiblement utilisables pour la récupération des métaux lourds des eaux résiduelles est la stabilité. La pulpe et la peau de pommes, la peau de raisins commencent se désintégrer à pH 5 après 2 h de contact avec une solution de cadmium. Les peaux d'agrumes sont plus résistantes à l'action de la solution de cadmium grâce à la résistance mécanique plus élevée (Figure I.10). La capacité de ces sous-produits à complexer les métaux est proche de celle des autres bio adsorbants tels que les algues brunes mais les résidus de fruits présentent l'avantage de ne pas nécessiter de dépenses de récolte vu qu'ils s'obtiennent suite à la valorisation de fruits [57].

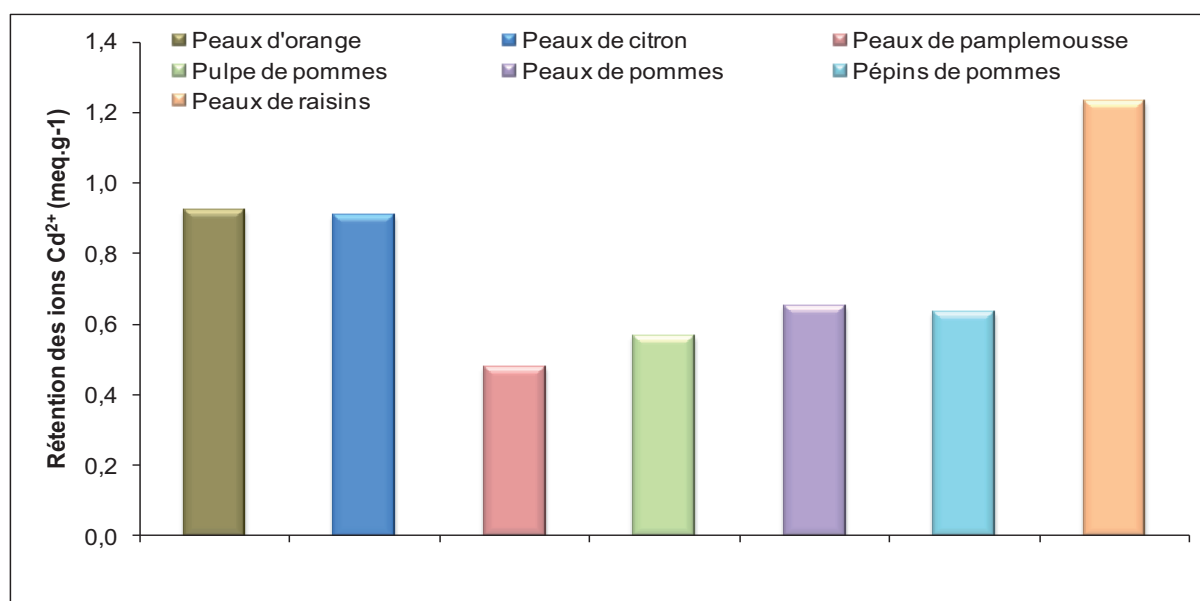


Figure I.10. Rétention des ions cadmium sur différents sous-produits d'origine végétale (concentration initiale 693 ppm) [57]

## I. 4. LES FRUITS ET LES SOUS-PRODUITS ISSUS DE LA VALORISATION DE FRUITS – SOURCES DE PRINCIPES ACTIFS

L'intérêt pour la récupération de principes actifs de matières premières d'origine végétale a augmenté considérablement par rapport à celui pour les substances synthétiques, utilisées, en général, dans les aliments, produits pharmaceutiques et cosmétiques. Cet intérêt est soutenu surtout par les possibles effets nocifs attribués aux substances de synthèse.

Nous avons vu au début de ce chapitre que la consommation des fruits est associée à la diminution du risque de développement et à l'amélioration de certaines maladies. Les effets bénéfiques sont attribués à la richesse des fruits en principes actifs tels que les fibres alimentaires, les vitamines, les métabolites secondaires etc. Une partie de ces molécules bioactives peuvent se retrouver aussi dans les résidus obtenus lors de la transformation des fruits dans différents produits.

Par la suite nous allons présenter les différents composés bioactifs qui peuvent être obtenus en utilisant comme matière première les fruits et les résidus fruits.

### I. 4. 1. Fibres diététiques

Les études épidémiologiques ont lié l'apport de fibres à une large gamme de maladies telles que l'athérosclérose, la diverticulose, le cancer de colon etc. Les fibres végétales sont souvent ajoutées aux aliments pour diminuer l'incidence de ces maladies.

Parmi les produits les plus riches en fibres nous pouvons citer le son de blé, les balles d'avoine, les drèches de brasserie.

Les résidus de pommes sont aussi une source de fibres. L'absence d'acide phytique qui ne permet pas l'absorption des minéraux tels que le zinc au niveau de l'organisme et le contenu élevé en fibres solubles (pectine) avec un effet hypocholestérolémique font que ces résidus soient une meilleure source de fibres que les sons de céréales [69].

Masoodi *et al.* [69] ont mélangé la farine de blé avec 5, 10 et 15% résidus de pommes séchés et broyés en différentes proportions dans la production de gâteaux. Ils ont observé que la viscosité de la pâte augmente avec l'augmentation du contenu en résidus de pommes et avec la diminution des dimensions de particules. La densité relative et le pH de la pâte diminue quand les teneurs en résidus de pommes augmentent. Le poids des gâteaux, leur contraction et l'index d'uniformité ont augmenté avec le contenu en résidus de pommes pendant que le volume et la symétrie ont diminué.

Une recherche concernant l'utilisation des résidus de pommes dans le processus de fabrication des gâteaux a été menée par Sudha *et al.* [70] Les résidus de pommes ont été incorporés dans la farine de blé en proportion de 5, 10 et 15% et les caractéristiques rhéologiques de la pâte ont été étudiés. Les résultats montrent que l'absorption de l'eau a augmenté de 60,1% à 70,6% avec l'augmentation du contenu en résidus de pommes de 0 à 15%. La stabilité de la pâte est diminuée et l'index de tolérance au malaxage a augmenté indiquant la faiblesse de la pâte. Les valeurs de la résistance à l'extension ont augmenté deux fois alors que celles de l'extensibilité ont diminué de 127 à 51 mm. Les études amylographiques ont indiqué une baisse de la viscosité de la pâte. L'effet de l'ajout de résidus de pommes sur les caractéristiques physiques des gâteaux est présenté dans le Tableau I.3.



Tableau I.3. Effet de résidus de pommes sur la qualité physique des gâteaux [70]

Résidus de pommes, %	Volume, cm <sup>3</sup>	Poids, g	Densité, g.cm <sup>-3</sup>	Texture, kg force
0	850 ± 11,18	419,3 ± 10,08	0,48	1,03 ± 0,18
10	830 ± 10,21	406,2 ± 9,12	0,49	1,15 ± 0,22
20	775 ± 9,80	408,7 ± 8,13	0,53	1,23 ± 0,59
30	620 ± 9,15	413 ± 7,23	0,67	1,46 ± 0,12

Le contenu en fibres des gâteaux préparés avec un ajout de 25% de résidus de pommes a été de 14,2% alors que celui des gâteaux témoins a été de juste 0,47%. Le contenu en polyphénols de la farine de blé a été de 1,19 mg.g<sup>-1</sup>, celui de résidus de pommes de 7,16 mg.g<sup>-1</sup>, celui de gâteaux sans ajout de 2,07 mg.g<sup>-1</sup> alors que l'addition de 25% résidus de pommes a conduit à l'augmentation du contenu en polyphénols jusqu'à 3,15 mg.g<sup>-1</sup> ce qui indique que la pomace de pommes peut être une bonne source de fibres diététiques et de composés phénoliques simultanément.

### La pectine

La pectine est un polysaccharide complexe extraite de la paroi cellulaire des plantes supérieures. Chimiquement elle est un polymère d'acide D- $\alpha$ (1→4) galacturonique anhydre. Sa capacité de former des gels aqueux la rend utile comme ingrédient fonctionnel dans le processus de fabrication de différents produits alimentaires (confitures, gelées, boissons de fruits concentrées, jus de fruits, produits fermentés).

Dans leur rapport, Canteri *et al.* [71], ont essayé de récupérer la pectine présente dans les résidus de pommes. Ils ont étudié l'effet de la taille de particules de résidus de différentes variétés de pommes ainsi que celui de l'acide utilisé pour l'extraction. Leurs résultats montrent que la pectine est mieux extraite à partir de la farine de résidus de pommes en utilisant de l'acide citrique ou de l'acide nitrique. Ils ont observé également que la variété de pommes n'influe pas le rendement en pectine.

Schieber et ses collaborateurs [72] ont mis au point une méthode de récupération simultanée de la pectine et des composés phénoliques présents dans les résidus de pommes. Le processus se déroule en deux étapes : l'extraction de la pectine des résidus de pommes séchés avec de l'acide chlorhydrique et adsorption des constituants phénoliques sur un polymère hydrophobe de styrène-divinylbenzène. Après l'élution au méthanol, les polyphénols ont été concentrés sous vide, stabilisés par lyophilisation et caractérisés par HPLC.

Afin d'isoler les fractions de pectine de résidus de pommes solubles dans l'eau 5 g du matériel végétal séché et broyé ont été mélangés avec de l'eau distillée et soumis une heure à l'agitation. Après filtration, le résidu a été homogénéisé 3 minutes aux ultrasons, stérilisé 10 minutes à 121°C et refroidi à température ambiante [73]. Les fractions enrichies en pectines ont été analysées de point de vue physico-chimique et utilisées soit pour améliorer les propriétés de la farine de blé, soit pour remplacer une partie de la matière grasse de la composition d'un gâteau. Les résultats obtenus suggèrent que la pectine soluble dans l'eau isolée de résidus de pommes n'est pas capable de retenir dans les gâteaux le même volume de gaz que les graisses. Par contre la texture plus tendre et la couleur plus claire des gâteaux sont des caractéristiques favorables qui encouragent le remplacement d'une partie de la matière grasse par la pectine de résidus de pommes.

Une autre étude concernant la récupération de la pectine de résidus de pommes a été réalisée par Wang *et al* [74]. 2 g de résidus de pommes séchés ont été soumis à l'extraction à

l'acide chlorhydrique sous l'action de microondes. La durée d'extraction, le pH de la solution d'acide chlorhydrique, le rapport solide : liquide et la puissance microondes ont été les paramètres suivis. Les extraits obtenus ont été filtrés et la pectine précipitée avec un volume égal d'éthanol 95% et séchée à 50°C jusqu'à une masse constante. L'application de la méthodologie de surface de réponse indique le fait que la durée d'extraction, le pH de l'acide chlorhydrique et son interaction avec le rapport solide : liquide sont les facteurs qui ont le plus d'influence sur le rendement d'extraction.

La pectine de résidus de pommes séchés a été obtenue aussi par extraction à l'acide citrique 5% à différentes températures et temps d'extraction [75].

## I. 4. 2. Enzymes

### Pectinases

Le groupe pectinases inclut les *pectin-estérases* qui hydrolysent la pectine jusqu'au méthanol et acide polygalacturonique et les *polygalacturonases* qui hydrolysent l'acide polygalacturonique jusqu'à l'acide monogalacturonique par destruction de la liaison glycosidique.

*Les pectinases* sont utilisées pour la clarification du vin et du jus de fruits, pour l'obtention de l'amidon sans pectine, dans le durcissement du café etc. Elles sont produites par plusieurs champignons tels qu'*Aspergillus*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* etc.

Une comparaison de la production de pectine-méthylesterase par *Aspergillus niger* à partir de résidus de pommes par fermentation submergée et en état solide a été réalisée par Joshi et ses collaborateurs [76]. Ils ont étudié l'influence du niveau de dilution, du pH, de la température et de la durée d'incubation ainsi que celle de la source d'azote ou des différents additifs et ils ont observé que la fermentation à l'état solide conduit à l'obtention de pectine méthylesterase ayant une activité 2,3 fois plus importante que celle issue de la fermentation submergée.

Selon leur mode d'action (endo-moléculaire ou exo-moléculaire) *les polygalacturonases* peuvent être classées comme endo-polygalacturonases et exo-polygalacturonases. La réaction enzymatique des endo-polygalacturonases consiste dans l'hydrolyse aléatoire des liaisons O-glycosidiques de homogalacturonanes. Les exo-polygalacturonases sont responsables de la dégradation par hydrolyse des liaisons glycosidiques des extrémités non-réductrices des pectines.

Les polygalacturonases ont un large palier d'applications dans les industries alimentaire et textile ou dans le traitement des effluents aqueux. Communément elles sont obtenues à l'aide de bactéries, de levures ou de champignons par fermentation submergée ou à l'état solide. Les bactéries produisent plutôt des polygalacturonases alcalines et stables de point de vue thermique pendant que les champignons sont utilisés pour l'obtention des polygalacturonases acides [77].

Afin d'obtenir des rendements élevés en pectinases, l'amélioration des souches et l'optimisation des conditions de culture doivent être envisagées. Un grand intérêt est dirigé vers la production de polygalacturonases à partir de résidus alimentaires. Dans ce but Zheng *et al.* [78] ont choisi comme substrat pour la fermentation à l'état solide les résidus de pommes, de canneberges et de framboises. Les résidus frais ont été séchés, broyés et stockés au réfrigérateur. Des souches de *Lentinus edodes* ont été inoculées sur 10 g de chaque pomace stérilisés 15 minutes à 121°C. Les mélanges ont été incubés 50 jours à 25°C (Figure I.11).

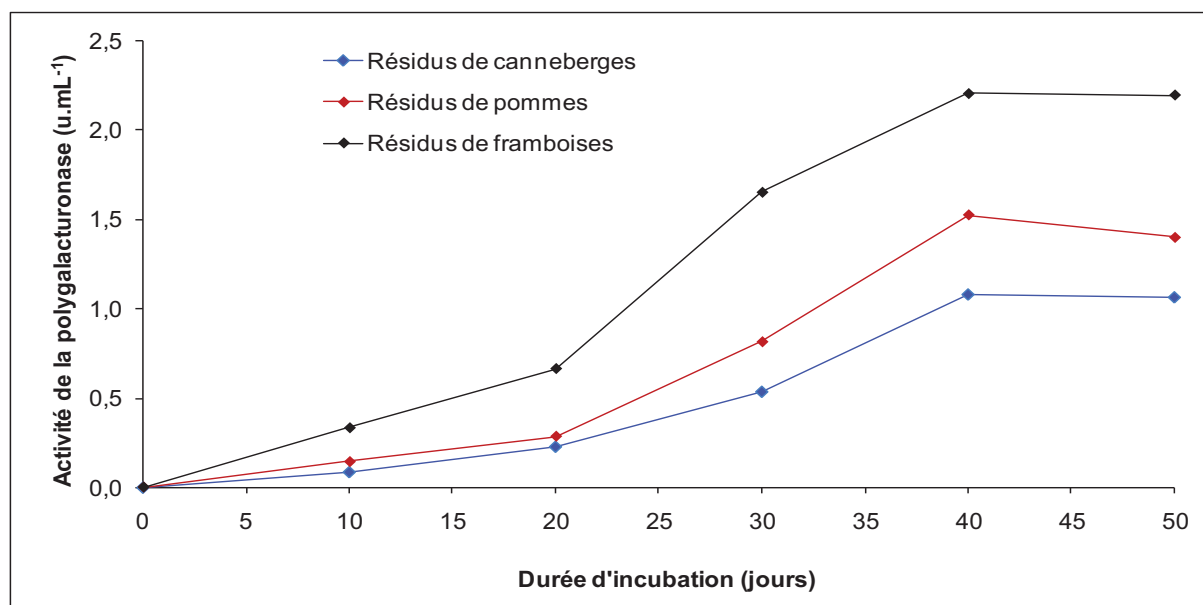


Figure I.11. Production de polygalacturonase par *Lentinus edodes* sur des résidus de fruits [78]

L'activité de la solution d'enzyme brute obtenue après plusieurs étapes est optimale à 50°C et pH réduit. Elle pourrait donc être utilisée pour la macération des tissus et pour l'extraction et clarification de différents jus de fruits ou de légumes.

### Xylanases

L'effet de quelques résidus végétaux (résidus et peaux d'oranges et de citrons, résidus de pommes, peaux de poires, de bananes, de melons, coquilles de noix) sur la production de la xylanase par *Trichoderma harzianum* 1073 D3 a été étudié par Seyis *et al.* [79]. L'activité la plus importante a été observée pour les peaux de melons suivie par celle obtenue pour les résidus de pommes et les coquilles de noix.

### $\beta$ -Fructofuranosidases

Une autre enzyme produite sur un substrat de résidus de pommes est la  $\beta$ -fructofuranosidase qui catalyse l'hydrolyse enzymatique de fructofuranoside jusqu'à l'alcool et D-fructose. Cette enzyme est utilisée au niveau commercial pour la conversion du sucrose en glucose et fructose et dans la production de bonbons de chocolat à la crème. Hang et ses collaborateurs [80] ont inoculé trois souches d'*Aspergillus* sur 50 g résidus de pommes. La souche d'*Aspergillus foetidus* NRL 337 a conduit à l'obtention de la  $\beta$ -furanosidase avec la plus forte activité enzymatique.

### *p*-diphénol : dioxygène oxydoréductases

Les *p*-diphénol : dioxygène oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation d'une grande variété de composés phénoliques et de composés inorganiques.

Leur obtention peut être réalisée par fermentation sur support solide représenté par des résidus issus de la valorisation de fruits.

Rosales *et al.* [81] ont étudié l'effet de la concentration initiale d'ammoniac sur la production de ces enzymes par inoculation des souches de *Trametes hirsuta* sur des résidus de kiwi à différentes concentration d'ammonium et sont arrivés à la conclusion (Figure I.12) que les activités les plus élevées ont été obtenues pour la concentration en sels d'ammonium la plus faible.

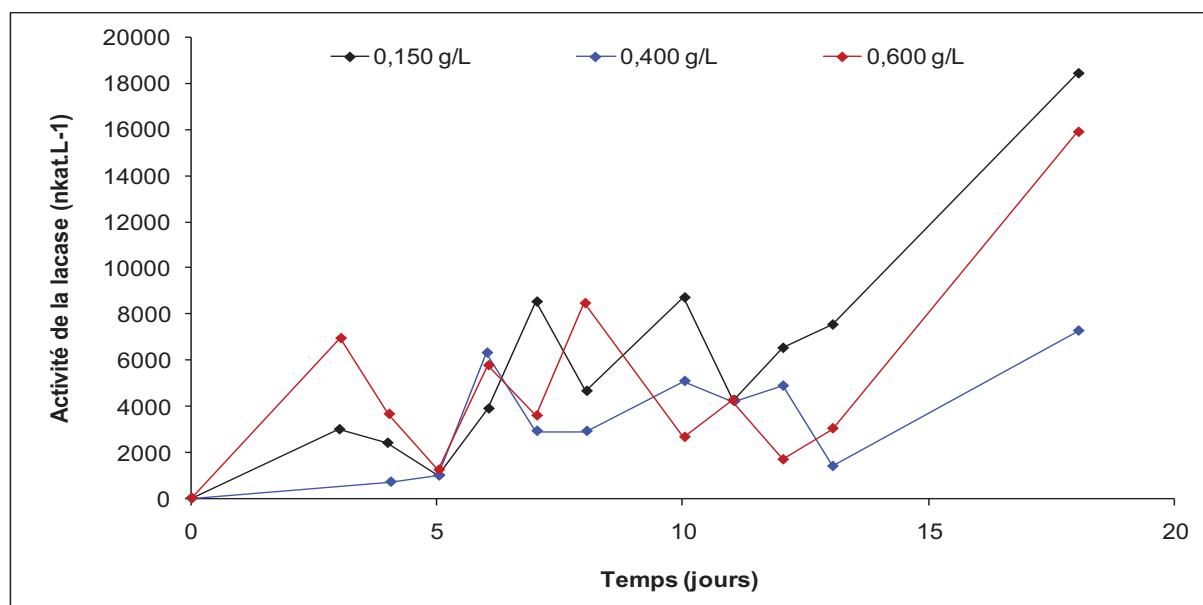


Figure I.12. Obtention de la lacase par inoculation de souches de *Trametes hirsuta* sur de résidus de kiwi à différentes concentrations d'ammoniac [82]

### I. 4. 3. Acides organiques

#### Acide lactique

L'acide lactique est utilisé dans l'industrie alimentaire en tant qu'acidulant, aromatisant, conservateur etc. mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et chimique.

Il est produit notamment par fermentation à partir de l'hydrolysat enzymatique d'amidon de céréales mais les résidus agroindustriels et forestiers (le lactosérum, mélasses, amidon de résidus, matériaux lignocellulosiques) peuvent être aussi utilisés comme matières premières.

Le contenu élevé en glucose et fructose libres, en polysaccharides (cellulose, amidon, hémicelluloses) facilement hydrolysables par les enzymes et en d'autres composés (mono-, di- et oligosaccharides, acide citrique, acide malique) qui peuvent être métabolisés par les bactéries lactiques et la présence des ions métalliques entraînant une réduction du coût de nutriments supplémentaires nécessaires pour la fermentation sont les avantages de l'utilisation des résidus de pommes comme substrat pour l'obtention de l'acide lactique [83]. Le bilan de masse réalisé par Gullon et ses collaborateurs [83] dans leur étude montre que, dans les conditions optimales, de 100 kg de résidus de pommes 36,6 kg d'acide lactique peuvent être obtenus après 10 h de fermentation et saccharification simultanées.

#### Acide linoléique

L'acide  $\gamma$ -linoléique, un précurseur d'une grande variété d'eicosanoïdes biologiquement actifs présente des effets bénéfiques contre les eczéma, le diabète, le cancer etc. Il est souvent incorporé dans différents produits pharmaceutiques ou utilisé pour fortifier les aliments en acides gras polyinsaturés.

Différents substrats tels que le glucose, l'amidon, l'acide acétique, l'éthanol ont été utilisés pour l'obtention de l'acide  $\gamma$ -linoléique. Une évaluation de la production de cet acide par fermentation en état solide sur des résidus de pommes a été réalisée par Stredansky *et al.* [84]. En utilisant une souche de *Thamnidium elegans* sur un substrat composé d'un mélange de résidus de pommes et drèche de malt et enrichie avec huile d'arachides ils ont obtenu, après 8 jours d'incubation, 3,5 g d'acide  $\gamma$ -linoléique / kg de substrat humide.

## Acide citrique

L'acide citrique est un acide tricarboxylique utilisé dans l'industrie pharmaceutique et dans l'industrie alimentaire comme acidifiant et comme exhausteur de goût. Il est obtenu notamment par fermentation submergée des milieux riches en hydrates de carbone.

Les résidus de pomme ont été utilisés comme substrat pour la production microbienne de l'acide citrique par *Aspergillus niger* dans un bioréacteur. 124 g d'acide citrique ont été obtenus à partir d'un kilo de résidus de pommes séchés avec un rendement de 80% basé sur le sucre total [85].

## I. 4. 4. Colorants

Les colorants naturels sont utilisés depuis très long temps comme additifs alimentaires. La demande croissante et le souci des consommateurs concernant les effets des produits synthétiques sur la santé ont conduit au développement des technologies microbiennes d'obtention. Plusieurs microorganismes (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Bacillus*) peuvent produire des pigments mais le milieu de culture est complexe et nécessite plusieurs nutriments.

Les résidus de pommes sont riches en sucres, fibres, minéraux et acide ascorbique. Attri *et al.* [86] ont étudié l'effet des sources de carbone et d'azote sur le rendement de production des caroténoïdes par *Micrococcus* sp. en utilisant un milieu de culture enrichie avec 20 g.L<sup>-1</sup> de résidus de pommes. Leurs résultats indiquent qu'un ajout de 0,2% de fructose a conduit à un rendement en biomasse de 4,13 g.L<sup>-1</sup> et en caroténoïdes de 9,97 mg.100 g<sup>-1</sup> mais qu'un pourcentage de nitrate de sodium supérieur à 0,2% diminue la production de biomasse et celle de caroténoïdes.

## I. 4. 5. Aromatisants

Christen *et al.* [87] ont étudié la bioconversion des résidus agro-industriels en biomasse et en métabolites volatils aromatisants (alcools, esters) par des souches de *Rhizopus*.

Afin de sélectionner les conditions optimales du processus quatre souches de *Rhizopus* (*Rhizopus oryzae* ATCC 34612, *Rhizopus oryzae* NRRL 395, *Rhizopus oryzae* MUCL 28627, *Rhizopus sp.* NRRL 25975) ont été cultivées sur huit mélanges de substrats solides parmi lesquels deux contenant différentes proportions de résidus de pommes. La fermentation en état solide a été menée à pH 6 et 30°C pendant quatre jours.

L'évaluation a été réalisée en termes de CO<sub>2</sub> et de composés volatils produits (Tableau I.4).

Tableau I.4. Production de CO<sub>2</sub> et composés volatils [87]

Milieu de culture	Composés volatils (μmol eq. EtOH / L)
Résidus de manioc : soja (8 : 2)	8,0
Résidus de manioc : soja (2 : 8)	15,5
Résidus de manioc : soja (5 : 5)	21,8
Résidus de manioc : soja : huile de soja (4,5 : 4,5 : 1)	14,4
Résidus de pommes : résidus de manioc : soja (8 : 1 : 1)	49,1
Résidus de pommes : résidus de manioc : soja (3 : 3 : 4)	31,8
Amarante	71,9
Amarante : solution de sels minéraux	209,2

Almosnino *et al.* [88] ont proposé une méthode de récupération de composés constitutifs de l'arôme tels que l'hexanal et le 2,4-decadienal par dégradation de l'acide linoléique sous l'action du système enzymatique de résidus de pommes. Plusieurs paramètres ont été suivis : l'état de résidus de pommes (frais, stockés à l'air ou congelés à -18°C), la présence dans le milieu de réaction des additifs tels que l'acide ascorbique ou le dioxyde de soufre, la micronisation de résidus etc.

Les résultats obtenus indiquent que les deux aldéhydes ne sont pas présents dans les résidus de pommes et que l'utilisation d'un mélange résidus : acide linoléique conduit à l'obtention d'importantes quantités d'aromatisants (1,6 mg hexanal / L de milieu de réaction ; 13 mg 2,4-decadienal / L de milieu de réaction). Les recherches montrent également que le rendement en aldéhydes aromatisants étudiés diminue avec environ 25-30% si les résidus de pommes sont congelés et que la micronisation des résidus accompagnée par la présence d'un mélange acide ascorbique : dioxyde de soufre dans des proportions bien précises augmente la production des aldéhydes.

## I. 4. 6. Métabolites secondaires

Les métabolites sont des composés organiques qui peuvent intervenir pendant le processus de métabolisme. Ils sont strictement nécessaires pour le développement, l'activité et la reproduction des cellules vivantes. Les métabolites peuvent provenir de l'extérieur des cellules ou peuvent être produits par celles-ci.

Généralement, les activités métaboliques des plantes conduisent à deux catégories de métabolites (Figure I.13.) :

- **les métabolites primaires :**
  - ils sont présents dans toutes les espèces ;
  - ils ont un rôle essentiel dans le métabolisme et le développement végétal ;
- **les métabolites secondaires**
  - ils sont différents selon les espèces ;
  - ils ne participent pas directement au développement des plantes ;
  - ils interviennent plutôt dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction.

Reconnus pour leurs rôles bénéfiques dans l'alimentation humaine, les métabolites secondaires incluent trois classes principales de composés :

- les alcaloïdes ;
- les composés phénoliques ;
- les composés terpéniques.

Au cours de nos futures recherches nous allons nous intéresser surtout sur les deux dernières classes.

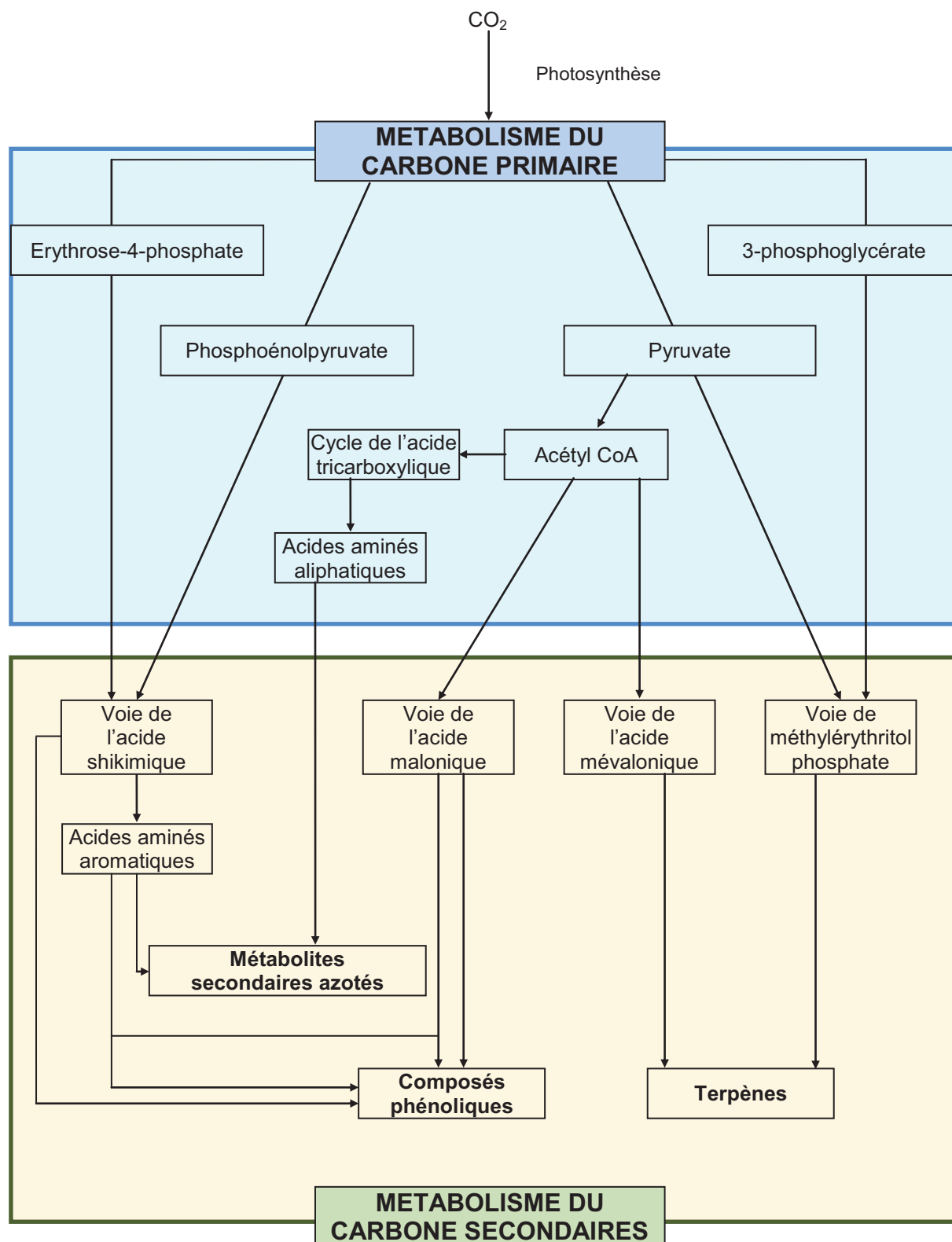


Figure I.13. Représentation simplifiée des principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires et de leurs relations avec le métabolisme primaire [89]

### I. 4. 6. 1. Composés phénoliques

Conformément à leur origine métabolique les composés phénoliques sont les substances obtenues à partir de la tyrosine et de la phénylalanine (Figure I.14). Ces acides aminés sont formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine conduit à la formation de l'acide cinnamique qui est à l'origine de la voie des phénylpropanoïdes qui permet la formation des acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces acides sont leurs esters avec le coenzyme A (CoA) à travers lesquels on peut accéder aux acides benzoïques et aux flavonoïdes [90].

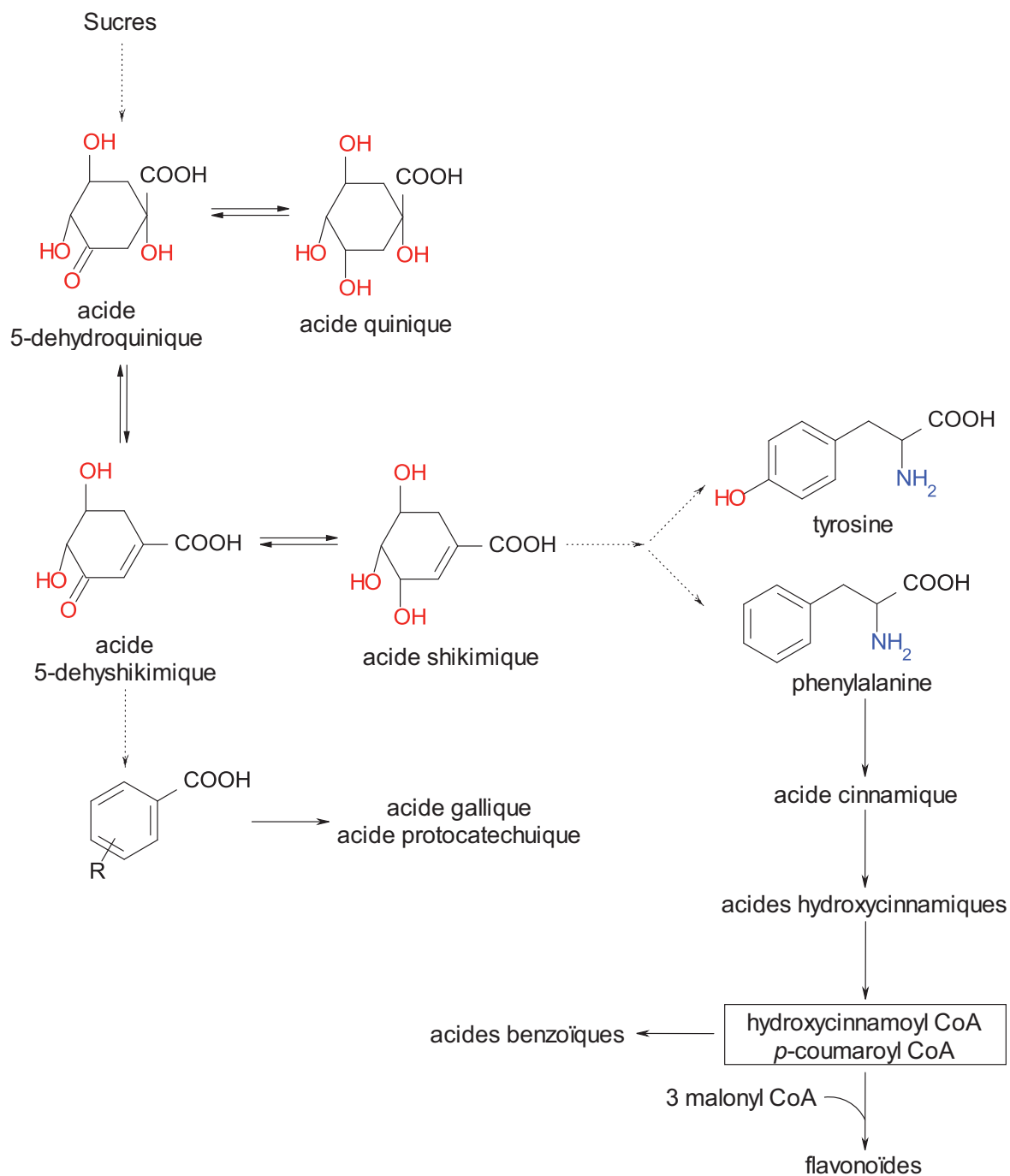


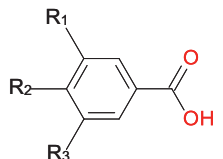
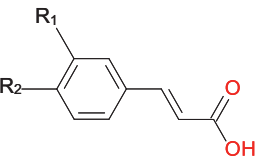
Figure I.14. Biosynthèse de composés phénoliques (voie shikimate) [91]



En fonction du nombre de noyaux phénoliques et des éléments structuraux reliés à ces noyaux ils sont classés en plusieurs familles dont celles des acides phénoliques et des flavonoïdes sont représentatives [92].

Deux types d'acides phénoliques sont plus répandus : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Tableau I.5). Les premiers rentrent dans la structure de tanins hydrolysables et se trouvent dans des quantités généralement faibles dans les végétaux à l'exception de certains fruits rouges et du thé alors que les acides hydroxycinnamiques qui se trouvent rarement sous forme libre sont couramment rencontrés dans des fruits tels que les cerises, les pommes, les prunes etc. [93].

Tableau I.5. Structure des acides phénoliques

Acides phénoliques	Structure chimique	Exemples
Acides hydroxybenzoïques		R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H ; R <sub>2</sub> = OH : Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OH : Acide gallique R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH ; R <sub>3</sub> = H : Acide protocatéchuique R <sub>1</sub> = H ; R <sub>2</sub> = OH ; R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> : Acide vanillique R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH : Acide syringique
Acides hydroxycinnamiques		R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H : Acide cinnamique R <sub>1</sub> = OH ; R <sub>2</sub> = H : Acide coumarique R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH : Acide caféique R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH : Acide férulique

Parmi les flavonoïdes (Tableau I.6), dont la structure générique est présentée dans la Figure I.15, la classe de flavonols est la plus connue.

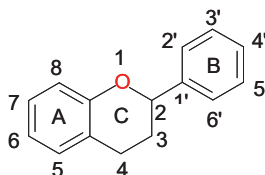


Figure I.15. Structure générique de flavonoïdes

Ces composés sont le plus souvent associés à des molécules de différents sucres (glucose, rhamnose, galactose, arabinose, xylose etc.) et s'accumulent surtout dans les parties extérieures des fruits étant donné qu'ils ont besoin de lumière pour leur processus de biosynthèse.

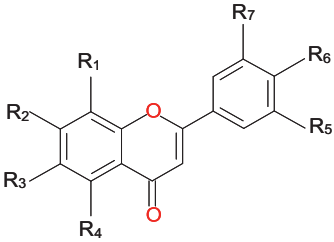
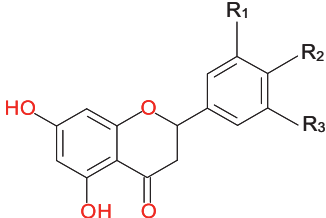
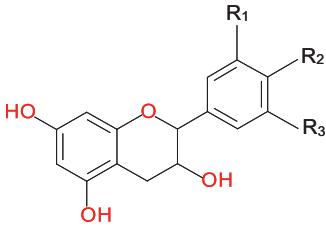
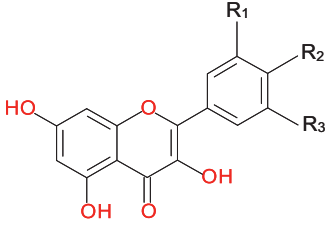
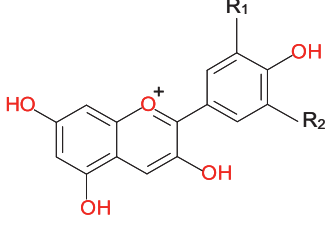
Les flavones telles que la tangéretine ou la sinensétine et les flavanones telles que la naringénine ou l'hespérétine se trouvent dans des quantités importantes dans les peaux de citriques [94].

Les flavanols existent sous forme monomère (dont les principaux représentants sont la catéchine et l'épicatéchine) ou sous forme polymère (proanthocyanidines ou tanins condensés qui peuvent former des complexes avec les protéines et sont responsables du caractère astringent des raisins, pêches, pommes, poires etc.). Contrairement aux autres types de flavonoïdes ces composés ne sont pas glycosylés [93].

Une autre catégorie de flavonoïdes est celle des anthocyanines – pigments responsables des couleurs rose, rouge, bleu ou violet de certains fruits. Avec une stabilité dépendante du pH [95] ils sont des dérivés polyhydroxy et polyméthoxy glycosylés du cation flavylum (la forme la plus stable à des valeurs de pH inférieures à 2). Ce cation contient des

doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de l'absorption de la lumière à 500 nm. La partie aglycone des anthocyanines est connue aussi sous l'appellation « anthocyanidine » et peut être penta-(3, 5, 7, 3', 4') ou hexa-substituée (3, 5, 7, 3', 4', 5'). Parmi les 22 anthocyanidines qu'on connaît aujourd'hui seulement six se trouvent le plus souvent dans les plantes et leurs distribution est la suivante : 50% cyanidine, 12% pélargonidine, 12% péonidine, 12% delphinidine, 7% petunidine, 7% malvidine. Le plus souvent les anthocyanidines se trouvent sous leur forme glycosylée (3-monosides, 3-biosides, 3,5- et 3,7-diglucosides) et ils sont connus sous le nom d'anthocyanines [96]. Ceux-ci sont plus solubles et stables dans l'eau que les anthocyanidines.

Tableau I.6. Structures des flavonoïdes

<i>Structure chimique des flavonoïdes</i>	<i>Exemples</i>
Flavones 	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = OCH_3$ ; $R_5 = R_7 = H$ : Tangéretine $R_1 = R_7 = H$ ; $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = OCH_3$ : Sinensetine $R_1 = H$ ; $R_2 = OH$ : Apigénine $R_1 = R_2 = OH$ : Lutéoline
Flavanones 	$R_1 = H$ ; $R_2 = OH$ : Naringénine $R_1 = OH$ ; $R_2 = OCH_3$ : Hespérétine
Flavanols 	$R_1 = R_2 = OH$ ; $R_3 = H$ : Catéchine $R_1 = H$ ; $R_2 = R_3 = OH$ : Epicatéchine
Flavonols 	$R_1 = R_3 = H$ ; $R_2 = OH$ : Kaempférol $R_1 = R_2 = OH$ ; $R_3 = H$ : Quercétine
Anthocyanidines 	$R_1 = OH$ ; $R_2 = H$ : Cyanidine $R_1 = R_2 = H$ : Pélargonidine $R_1 = OCH_3$ ; $R_2 = H$ : Péonidine $R_1 = R_2 = OH$ : Delphinidine $R_1 = OCH_3$ ; $R_2 = OH$ : Pétunidine $R_1 = R_2 = OCH_3$ : Malvidine

### I. 4. 6. 1. 1. Activités biologiques de composés phénoliques

La propriété la plus importante de la plupart des composés phénoliques est représentée par leur activité antioxydante.

Du point de vue alimentaire, conformément au règlement 1333/CE du 16.12.2008, les « antioxydants sont des substances qui ont la propriété de prolonger la durée de vie des produits alimentaires en les protégeant de la détérioration causée par l'oxydation » [97].

Une définition plus ample considère comme antioxydant « toute substance qui, présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde significativement ou inhibe l'oxydation de ce substrat » [98].

L'oxydation est un processus spontané qui constitue le principal facteur de détérioration des aliments, des produits cosmétiques et pharmaceutiques et qui conduit à l'altération de la valeur nutritive et / ou cosmétique de ces produits. Cette réaction est causée par l'oxygène atmosphérique, par les peroxydes, par les oxydes métalliques etc.

La dégradation des graisses, des huiles comestibles et des produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sous l'influence de l'oxygène est connue sous l'appellation d'auto-oxydation ou dégradation oxydative. Parmi les conséquences de cette dégradation nous pouvons citer :

- la modification des propriétés sensorielles (goût, odeur) ;
- la modification de la valeur nutritive par la dégradation des acides gras polyinsaturés indispensables à l'organisme humain et des vitamines sensibles à l'oxydation (A, E, C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) ;
- la formation des substances toxiques pour l'organisme humain qui peuvent produire des lésions de la muqueuse gastrique conduisant à une baisse du coefficient d'utilisation digestive des aliments.

Dans les fluides biologiques, les réactions d'oxydation sont impliquées dans les différentes voies du métabolisme normal mais les divers déséquilibres apparus peuvent créer des conditions propices pour le stress oxydatif [99-100].

Généralement, les substances favorisant la dégradation oxydative ou les pro-oxydants sont des espèces d'oxygène ou d'azote réactif, les premières étant les plus importantes. Les espèces d'oxygène réactif se partagent en deux groupes principaux : radicalaires et non-radicalaires (Tableau I.7).

Tableau I.7. Dérivés radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène [101]

<i>Appellation</i>	<i>Symbole</i>	<i>Appellation</i>	<i>Symbole</i>
<i>Radicaux de l'oxygène</i>		<i>Dérivés de l'oxygène (non-radicaux)</i>	
Ion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$	Eau oxygénée	$H_2O_2$
Hydroxyle	$OH^{\bullet}$	Peroxyde organique	$ROOH$
Peroxyle	$ROO^{\bullet}$	Acide hypochloreux	$HOCl$
Alcoxyle	$RO^{\bullet}$	Aldéhyde	$HCOR$
Oxyde nitrique	$NO^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOOH$

Les dérivés radicalaires détiennent au moins un électron libre autour du noyau atomique ayant une réactivité élevée. Le groupe des composés non-radicalaires inclut une variété de substances neutres sans électrons libres et très réactives.

L'organisme humain doit contrôler, en continu, la présence des pro-oxydants et des oxydants. L'équilibre entre ceux-ci est important pour maintenir les fonctions biochimiques et cellulaires vitales [102]. Cet équilibre, souvent connu comme équilibre d'oxydoréduction, est spécifique pour chaque organe de l'organisme humain et toute interférence peut être néfaste.

Le changement de l'équilibre vers l'augmentation de la concentration du pro-oxydant au détriment de celle de l'oxydant est définie comme stress oxydatif et peut provoquer des dommages oxydatifs.

Les composés antioxydants peuvent être séparés en deux classes :

- antioxydants primaires (antioxydants long-terme) : phénols, arylamines secondaires qui peuvent céder des électrons ou bloquer les réactions d'oxydation ;
- antioxydants secondaires : organophosphites, thioesters qui peuvent décomposer les peroxydes [103].

Les composés phénoliques présentent la capacité d'inhiber les radicaux libres due à leur aptitude à céder des atomes d'hydrogène ou à complexer les cations métalliques. Cette capacité est strictement dépendante de leur structure.

L'activité antioxydante des acides hydroxybenzoïques est reliée aux nombres de groupements hydroxyles et à leur positionnement par rapport à la fonction carboxyle et est généralement inférieure à celle des acides hydroxycinnamiques [104].

Les flavonoïdes sont encore plus efficaces dans le processus d'inhibition des molécules oxydantes. Conformément aux explications de Balasundram et de ses collaborateurs [105] :

- le degré d'hydroxylation et la position des groupements hydroxyles reliés au noyau B conduit à une meilleure activité antioxydante due à l'augmentation de la stabilité du radical aroxyde par la délocalisation électronique ou due au fait que ce noyau complexe les métaux ;
- les anthocyanidines ayant des groupements hydroxyles dans les positions 3', 4' et 5' ont une activité antioxydante plus importante ;
- une double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 conjuguée avec le groupement 4-oxo du noyau C ou en combinaison d'un hydroxyle dans la position 3 du même noyau entraînent une augmentation de l'activité anti radicalaire ;
- la substitution des groupements hydroxyles de noyau B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox de flavonoïdes ce qui affecte négativement leur activité antioxydante.

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont considérées responsables des effets bénéfiques contre une large panoplie de maladies affectant l'organisme humain telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les cataractes etc.

### **Les composés phénoliques et le cancer**

Un facteur critique dans la mutagenèse est la division cellulaire. Lorsque la cellule se divise, une lésion de l'ADN peut donner lieu à une mutation. Divers agents comme une infection chronique, des taux élevés de certaines hormones ou des produits chimiques aux doses qui provoquent la mort cellulaire entraînent une augmentation de la division cellulaire et donc un risque accru de cancer.

Les antioxydants peuvent diminuer la mutagenèse, et donc la cancérogenèse en réduisant les dommages par oxydation de l'ADN et par une diminution de la division cellulaire.

Les études épidémiologiques qui se sont intéressées à la relation entre les niveaux d'antioxydants et le cancer du poumon induit par la cigarette ont montré une augmentation statistiquement significative de l'effet protecteur des antioxydants [106].

Une recherche [107] *in vitro* démontre que les composés phénoliques extraits de pommes interviennent favorablement et sans effets cytotoxiques dans la modulation de trois bio marqueurs du cancer du colon. Ainsi les dommages sur l'ADN (associés à l'étape

d'initiation de la tumeur) ont diminué, la fonction de barrière du colon a été améliorée et le potentiel invasif a été réduit.

D'autres études illustrent le rôle protectif de composés phénoliques contre le cancer gastrique [108], le cancer de la prostate [109], du sein [110-111] ou contre le cancer du foie [112].

### **Les composés phénoliques et les maladies cardiovasculaires**

Une évolution majeure dans la recherche sur les maladies cardiovasculaires est la constatation que les réactions d'oxydation jouent un rôle central dans l'athérogenèse et que dans les études épidémiologiques les maladies cardiovasculaires sont associées aux faibles concentrations plasmatiques d'antioxydants.

Hollman *et al.* [113] ont présenté dans leur review que l'apport de flavonoïdes dans l'alimentation humaine peut influencer l'évolution des affections cardiovasculaires telles que la maladie coronarienne ou la cardiopathie ischémique. Par contre, ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par Sesso *et al.* [114]. Ceux-ci ont réalisé une étude sur plus de 35000 femmes dont l'alimentation a été enrichie en flavonoïdes purs (quercétine, kaempférol, apigénine) ou provenant de différents fruits et légumes tels que les pommes ou les brocolis. Ils ont trouvé que l'influence de ces molécules est plutôt réduite voire non significative contre les plus connues des maladies cardiovasculaires.

### **Les composés phénoliques et le système immunitaire**

La prolifération des cellules B et T (cellules tueuses naturelles) qui est nécessaire pour une défense efficace contre les agents pathogènes et contre les cellules tumorales semble être inhibée nettement avec l'âge et lors de l'exposition aux oxydants [115]. Ces effets peuvent, en partie, être neutralisés par la supplémentation en antioxydants alimentaires.

Les recherches de Zhao *et al.* [116] ont révélé que l'epicatéchine, la proanthocyanidine B2, la proanthocyanidine B4 de litchis ainsi que les molécules extraites à l'aide de l'acétate d'éthyle possèdent des effets immunomodulatoires.

Une autre étude très récente, réalisée par Liu *et al.* [117], montre que les extraits de composés phénoliques à partir de *Phyllanthus emblica* L. présentent des propriétés immunomodulatoires qui peuvent être considérées responsables, entre autres, pour les effets bénéfiques contre la prolifération des splénocytes (cellules sanguines se trouvant dans le tissu splénique) et contre les cellules MCF-7 (entraînant le cancer du sein).

### **Les composés phénoliques et les cataractes**

La littérature montre que la cataracte a une étiologie oxydative et que les antioxydants alimentaires peuvent empêcher son apparition [12]. Cette hypothèse est soutenue par les recherches réalisées par Gayathri Devi *et al.* [118] qui ont étudié l'effet de l'isorhamnétine-3-glucoside sur l'évolution de la cataracte. Ils sont arrivés à la conclusion que ce composé phénolique grâce à ses propriétés antioxydantes peut prévenir le stress oxydatif, l'accumulation du calcium et maintenir l'activité de l'enzyme  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase protégeant ainsi les protéines du cristallin. D'autres chercheurs [119-122] sont arrivés aussi à la conclusion que certains composés phénoliques peuvent réduire l'évolution des cataractes.

### **Les composés phénoliques et le dysfonctionnement de cerveau**

Des études biochimiques suggèrent que l'oxydation peut être importante dans un certain nombre de pathologies du cerveau. Quelques études épidémiologiques prouvent l'effet des antioxydants présents dans les fruits dans un certain nombre de pathologies neurologiques, y compris l'ischémie cérébrale [123], la maladie d'Alzheimer [124], la maladie de Parkinson [125], la maladie de Huntington [126] etc.

### I. 4. 6. 2. Composés terpéniques

Avec plus de 30000 composés, les terpènes (Tableau I.8) forment la famille la plus large et variée du point de vue structural des produits naturels d'origine végétale [127] tels que les feuilles, les fruits ou les graines. Ces composés sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées, ramifiées, dérivées du 2-méthylebutadiène, appelées unités isopréniques ( $C_5$ )<sub>n</sub> (Figure I.16).

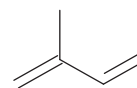


Figure I.16. Structure de l'isoprène

Plus ou moins lipophiles ou hydrophiles, volatils ou non-volatils, cycliques ou acycliques les terpènes peuvent être classés en fonction du nombre d'éléments isopréniques (a) et du nombre d'atomes de carbone (b) et sont identifiés par la notation a : b [128].

Tableau I.8. Exemples de structures chimiques de terpènes

Classe de terpènes	Exemple	Structure
Monoterpènes (2 : 10)	Géraniol	
Sesquiterpènes (3 : 15)	Farnésol	
Diterpènes (4 : 20)	Rétinol	
Sesterpènes (5 : 25)	Haslène	
Triterpènes (6 : 30)	Squalène	
Tetraterpènes (8 : 40)	$\alpha$ -Carotène	
Polyterpènes (> 100 : > 500)	Caoutchouc	

Une catégorie importante des terpènes est représentée par les triterpènes.

Les appellations « triterpènes » et « triterpénoïdes » sont souvent utilisées pour décrire les terpènes avec 30 atomes de carbone. Néanmoins une différenciation doit être réalisée. Le premier terme est utilisé pour les composés naturels alors que le deuxième désigne les composés issus d'une dégradation naturelle et les dérivés naturels ou synthétiques tel que les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides, les esters, les époxydes ou les produits d'hydrogénation [129].

Tous les composés triterpéniques se forment à partir de 6 unités d'isoprène qui s'assemblent d'abord, par deux ou plus en une chaîne hydrocarbonée insaturée ; cette dernière est ensuite modifiée secondairement par oxydation, par réduction ou par élimination de carbone, ce qui explique la multiplicité des composés isoprénoides.

La synthèse de cette unité de base peut se faire par deux voies : celle du mévalonate (Figure I.17) et celle du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (Figure I.18) qui conduisent à la formation du diphosphate d'isopentényle. La condensation du celui-ci (Figure I.19) mène au diphosphate de géranyl (précurseur des monoterpènes). Une condensation supplémentaire de type tête-à-queue conduit au diphosphate de farnésyle (précurseur des sesquiterpènes). Une condensation "tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle aboutit au squalène (précurseur des triterpènes). Ces voies de synthèse peuvent se dérouler dans le cytosol (voie du mévalonate) ou dans le chloroplaste (voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate) [130].

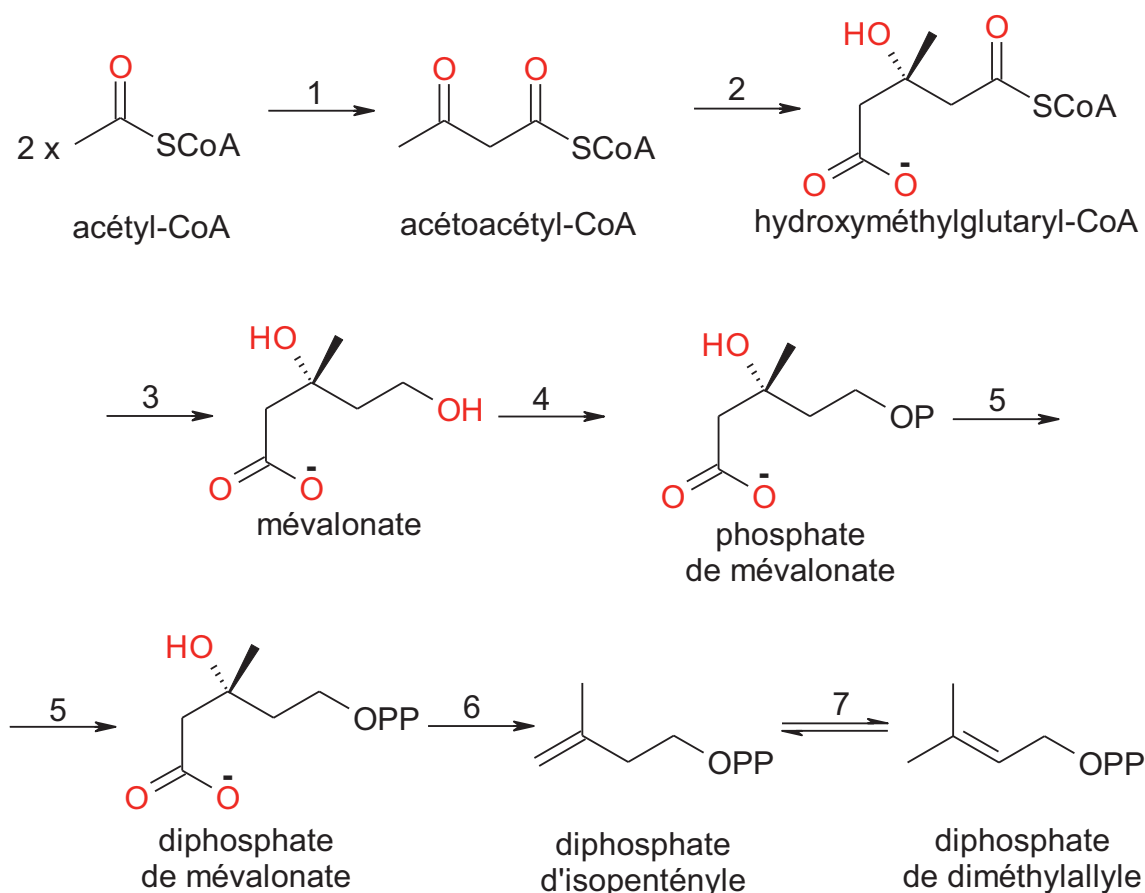


Figure I.17. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (voie du mévalonate) [89]

1. acétoacétyl-CoA ; 2. hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase ; 3. hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase ; 4. mévalonate kinase ; 5. mévalonate 5-phosphate kinase ; 6. mévalonate 5-diphosphate décarboxylase ; 7. diphosphate d'isopentényle isomérase

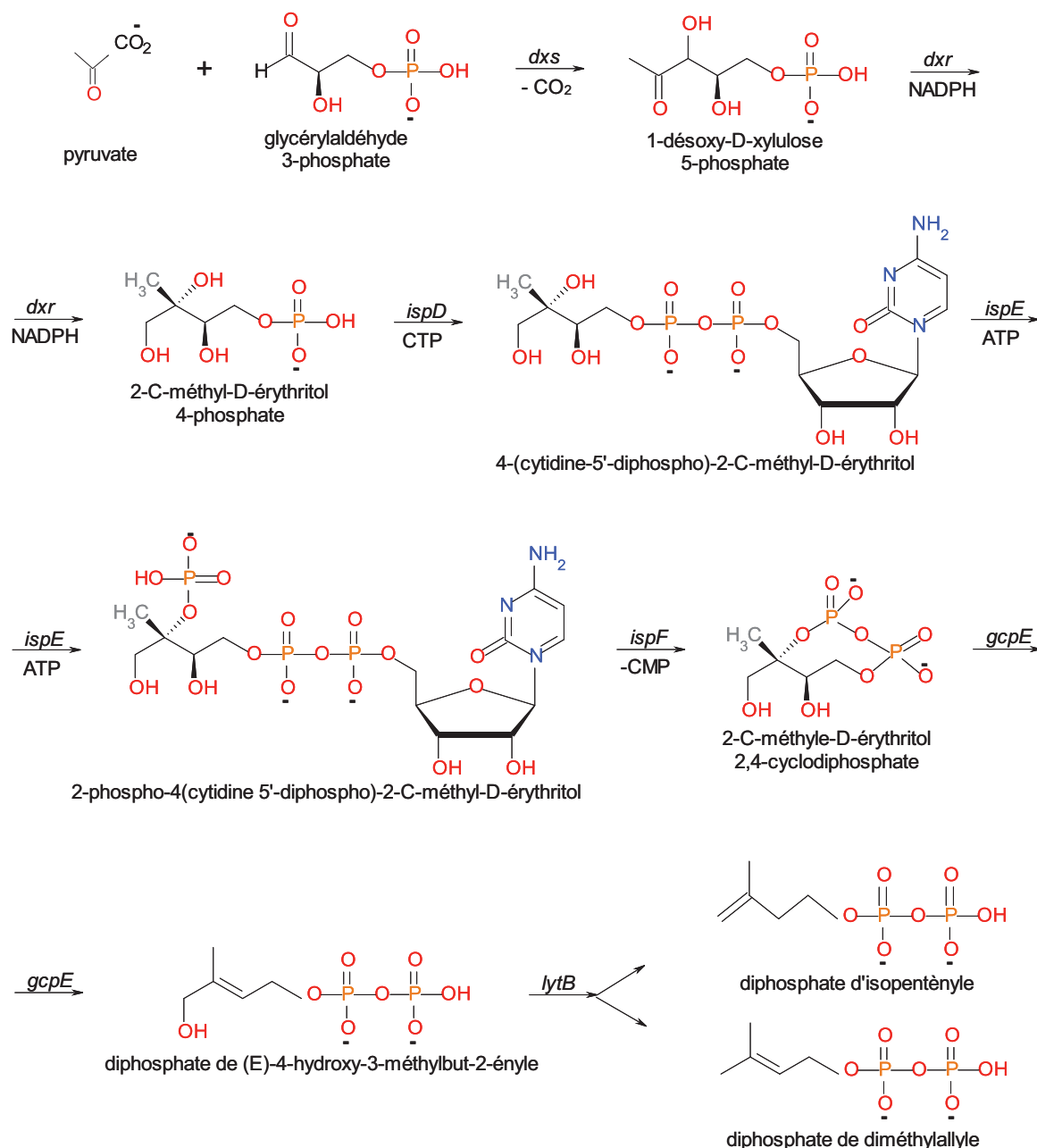


Figure I.18. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle et du diphosphate de diméthylallyle (voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate) [89]

*dxs* : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; *dxr* : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase ;  
*ispD* : 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase ;  
*ispE* : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase ;  
*ispF* : 2-C-méthyl-D-érythritol cyclodiphosphate synthase ;  
*gcpE*, *lytB* : gènes de la voie de biosynthèse ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ;  
 CTP : cytidine triphosphate ; ATP : adenosine triphosphate



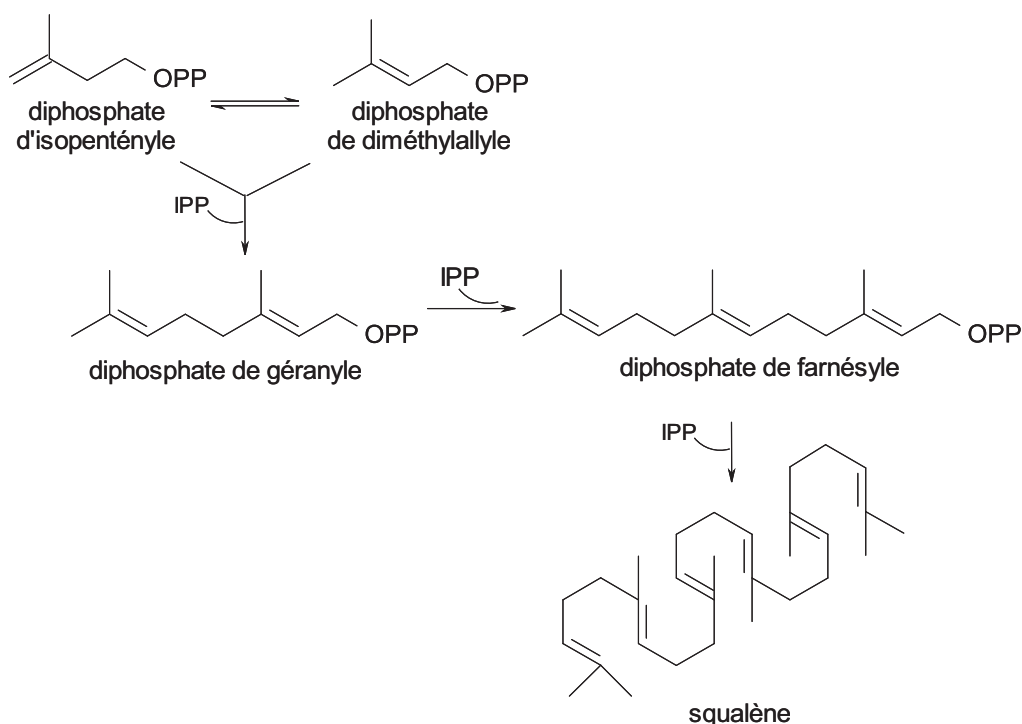


Figure I.19. Biosynthèse de triterpénoïdes à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) [89]

Du point de vue biologique les structures triterpénoïdiques les plus importantes sont celles d'ursane, oléanane et lupane (Tableau I.9). Ces structures peuvent se trouver en état libre ou sous forme de glycosides.

Tableau I.9. Structure chimique de triterpènes

Classe de triterpènes	Structure chimique	Exemples
Ursane		R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> : α-amyrine R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> OH : Uvaol R <sub>1</sub> = COOH : Acide ursolique
Oléanane		R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = H : β-amyrine R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> OH ; R <sub>2</sub> = H : Erythrodiol R <sub>1</sub> = COOH ; R <sub>2</sub> = H : Acide oléanolique R <sub>1</sub> = COOH ; R <sub>2</sub> = OH : Acide maslinique
Lupane		R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> : Lupéol R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> OH : Bétuline R <sub>1</sub> = COOH : Acide bétulinique

#### I. 4. 6. 2. 1. Activités biologiques de composés triterpéniques

Les activités biologiques des triterpènes sont diverses, ces composés étant reconnus comme antimicrobiens, antimycotiques, virostatiques, toniques, hémolytiques, cytostatiques immunomodulateurs, hépato protecteurs ce qui peut les rendre favorables à l'usage pharmacologique [129] mais la plus importante des activités biologiques des triterpènes est celle d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens.

Parmi les composés triterpéniques la papyriogénine A (triterpène type oléanane isolée des fleurs, feuilles et fruits de *Tetrapanax papyriferus*) présente des activités anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et anti-HIV [131].

L'uvaol, l'érythrodiol, l'acide oléanolique et l'acide maslinique ont des propriétés antioxydantes, hypolipidémiques, vasorelaxantes, anti hypertensives, anti-inflammatoires qui peuvent contribuer aux effets cardiovasculaires bénéfiques [132]. L'acide maslinique présente aussi des activités bénéfiques contre le cancer de colon [133].

Certaines études telles que celles réalisées par Vasconcelos *et al.* [134] indiquent le fait que le lupéol présente des activités antiallergiques et anti-inflammatoires et qu'il peut être utilisé dans le traitement de l'asthme. Le mécanisme d'action de ce composé est différent de celui des autres médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens classiques puisqu'il ne présente pas d'effets anti nociceptives, antipyrétiques ou ulcérogéniques. Le lupéol protège contre la cardiotoxicité et la cardiomyopathie mitochondriale induites par la cyclophosphamide chez les rats. De plus, il améliore les anomalies lipidémiques-oxydatives dans les étapes du début de l'athérosclérose hypercholestérolémique. Considéré comme agent hépato protecteur, il a aussi des effets contre le cancer du pancréas, de la prostate ou de la peau etc. [135-137]. Sans être toxique [136], le lupéol présente aussi l'habileté de protéger les macromolécules cellulaires et celle d'inhiber l'activité de l'ornithine decarboxylase qui joue un rôle important dans l'avancement des tumeurs [138].

Les analogues de l'acide ursolique peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales responsables du cancer pulmonaire, gastrique, du sein ou du colon [139]. Ces composés ont également des activités anti-inflammatoires et antioxydantes.

L'acide oléanolique et l'acide ursolique induisent l'apoptose des cellules responsables du cancer de foie via l'augmentation de la fragmentation de l'ADN, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de l'activité de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP-ase et de l'augmentation de l'activité de caspase-3 et caspase-8 [140]. Une autre étude récente [141] indique le fait que l'acide oléanolique peut améliorer l'adiposité viscérale et la tolérance au glucose des rats ayant un potentiel anti obésité par la modulation du métabolisme des hydrates de carbone et des lipides.

Nous avons vu jusque maintenant que la récupération de principes actifs constitue une des multiples possibilités disponibles pour la valorisation des fruits et des résidus issus de la transformation des fruits.

### **I. 4. 6. 3. Extraction et analyse de métabolites secondaires**

Afin d'avoir une vision globale sur les différentes modalités utilisables pour l'obtention des molécules bioactives, nous avons recensé dans les tableaux I.10 et I.11 les différentes méthodes d'extraction et d'analyse de composés d'intérêt existant dans les fruits et les sous-produits issus de la valorisation des fruits.

En regardant les données de ces tableaux nous pouvons remarquer que premièrement le matériel végétal est souvent conservé par :

- congélation (à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ ) ;
- séchage (entre  $40$  et  $100^{\circ}\text{C}$  jusqu'à masse constante) ;
- lyophilisation.

Ce traitement préliminaire permet la diminution des différents types de dégradation et assure une disponibilité à longue durée.

Le matériel végétal est soumis ensuite à l'extraction par différentes méthodes telles que :

- la macération ;
- l'extraction au Soxhlet ;
- l'extraction par solvant pressurisé ;
- l'extraction assistée par ultrasons ;
- l'extraction assistée par microondes ;
- l'extraction par fluides supercritiques.

Les solvants utilisés lors de l'extraction peuvent être :

- polaires : eau, MeOH, EtOH purs ou en mélange ;
- non polaires : acétone, di éthyle éther, acétate d'éthyle, éther de pétrole, heptane.

L'extrait obtenu peut être concentré par évaporation, repris dans un certain volume de solvant et ensuite analysé ou il peut être analysé directement.

Dans ce but, la chromatographie liquide de haute performance est la plus utilisée. La chromatographie sur couche mince ou la chromatographie en phase gazeuse peuvent aussi être employées pour l'obtention d'une empreinte compositionnelle des extraits végétaux.

Pour la séparation des composés extraits, les conditions HPLC incluent l'utilisation presque exclusive du mode phase inverse, étant donné le grand nombre de phases stationnaires disponibles avec des caractéristiques différentes.

La détection des composés des extraits est assurée à l'aide de détecteurs type UV, DAD, DEDL ou par spectrométrie de masse. Afin d'obtenir plus d'information sur les groupes de molécules analysées, plusieurs détecteurs compatibles peuvent être couplés.

Pour l'élution, des systèmes binaires ou ternaires de solvant composés d'eau et d'un ou plusieurs solvants organiques polaires sont utilisés. D'habitude, des acides ou des sels sont rajoutés dans la phase mobile afin de fixer le pH et la forme sous laquelle se retrouvent les composés d'intérêt. Le processus de séparation dure, en général, une heure, pour un débit de la phase mobile de  $1 - 1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

L'identification des composés extraits peut être réalisée par comparaison de leurs temps de rétention et spectres d'absorbance avec les temps de rétention et les spectres d'absorbance de molécules standards disponibles.

Dans les cas où cette comparaison n'est pas possible (absence de composés standards) ou elle est insuffisante pour conduire à l'attribution d'une structure précise, le couplage de plusieurs techniques telles que la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge, la spectrométrie de masse peut être envisagé.

Néanmoins, du à la grande diversité des extraits obtenus à partir des végétaux et à la grande similarité des structures, il existe aussi la possibilité d'avoir des molécules non-identifiées.

Diverses analyses complémentaires sont réalisées également afin de caractériser les extraits et / ou les composés obtenus. Parmi ces analyses nous pouvons citer :

- détermination du contenu en composés phénoliques ;
- détermination du contenu en flavonols ;
- détermination du contenu en anthocyanines ;
- détermination de l'activité antioxydante ;
- détermination de l'activité anti-inflammatoire ;
- détermination de l'activité antimicrobienne ;
- détermination de l'activité antifongique ;
- détermination de l'activité anti tumorale etc.

Les recherches bibliographiques réalisées sur les possibilités d'extraction et de caractérisation des principes actifs présents dans les fruits et dans les sous-produits issus de la valorisation de fruits nous ont permis de constater que la classe des composés phénoliques est la plus étudiée, l'intérêt porté sur les composés triterpéniques étant beaucoup plus faible. Par conséquent, les techniques et les méthodes développées sont dirigées vers la récupération facile des molécules phénoliques.

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits

<i>Matériel végétal</i>	<i>Extraction de composés bioactifs</i>	<i>Analyse d'extrait</i>	<i>Composés identifiés</i>	<i>Ref.</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Cerises	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> stockage à <math>-20^{\circ}\text{C}</math></p> <p><b>Technique d'extraction :</b> Soxhlet à <math>35^{\circ}\text{C}</math>, 2 heures</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> <math>\text{H}_2\text{O}</math> / MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Omnisphere C18 (<math>\text{Lx}\Phi = 250 \times 4,6 \text{ mm}</math> ; <math>5 \mu\text{m}</math>)</p> <p><i>Précolonne :</i> ChromSep C18 (<math>\text{Lx}\Phi = 10 \times 3,0 \text{ mm}</math>)</p> <p><i>Température :</i> <math>20^{\circ}\text{C}</math></p> <p><i>Phase mobile :</i> A : <math>\text{H}_3\text{PO}_4</math> 0,1% en <math>\text{H}_2\text{O}</math> ; B : MeOH</p> <p><i>Débit phase mobile :</i> <math>0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}</math></p> <p><i>Gradient d'élution :</i> de 5 à 80% B de 0 à 30 min, isocratique à 80% B de 30 à 33 min, de 80 à 5% B de 33 à 35 min</p> <p><i>Volume échantillon injecté :</i> <math>20 \mu\text{L}</math></p> <p><i>Détection :</i> UV : 260 ; 320 ; 360 nm</p>	<p>acide néochlorogénique ; acide chlorogénique ; acide <i>p</i>-hydroxybenzoïque ; acide <i>p</i>-coumarique ; acide férulique ; acide élagique ; quercétine-3-rutinoside ; quercétine ; kaempférol</p>	[142]
Framboises	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> congélation à <math>-40^{\circ}\text{C}</math> ; stockage à <math>-20^{\circ}\text{C}</math></p> <p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par ultrasons (puissance : 650 W ; fréquence : 22 kHz ; température : <math>40^{\circ}\text{C}</math>) ; macération (température : <math>71^{\circ}\text{C}</math> ; durée : 12, 20 ; 30 ; 60 min)</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> HCl 1,5 M / EtOH 95% (15 / 85)</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration sur papier Whatman No. 1 sous vide</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Kromasil C18 (<math>\text{Lx}\Phi = 250 \times 4,6 \text{ mm}</math> ; <math>5 \mu\text{m}</math>)</p> <p><i>Précolonne :</i> Kromasil C18 (<math>\text{Lx}\Phi = 20 \times 4,6 \text{ mm}</math>)</p> <p><i>Phase mobile :</i> A : <math>\text{HCOOH}</math> / <math>\text{H}_2\text{O}</math> (3 / 97, v/v) ; B : Acide formique / <math>\text{H}_2\text{O}</math> / MeOH (3 / 47 / 50, v/v/v)</p> <p><i>Débit phase mobile :</i> <math>0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}</math></p> <p><i>Gradient d'élution :</i> isocratique 60% A / 40% B de 0 à 2 min, de 40 à 100% B de 2 à 42 min</p> <p><i>Détection :</i> 520 nm</p> <p><b>MS</b></p> <p><i>Mode :</i> positif</p> <p><i>m/z scan :</i> 200 – 1000</p> <p><i>Tension du détecteur :</i> 3,5 kV</p> <p><i>Tension du capillaire :</i> 3500 V ;</p> <p><i>Température du capillaire :</i> <math>350^{\circ}\text{C}</math></p>	<p>cyanidine-3-sophoroside ; cyanidine-3-(2-glucosylrutinoside) ; cyanidine-3-sambubioside ; cyanidine-3-glucoside ; cyanidine-3-xylosylrutinoside ; cyanidine-3-(2-glucosylrutinoside) ; cyanidine-3-rutinoside ; pélargonidine-3-rutinoside</p>	[143]

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Ponkan ; Tonkan ; Murcott ; Zendun ; Peiyou ; Kumquat ; Citron	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> broyage ; homogénéisation à 5°C ; lyophilisation ; stockage à - 30°C</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous agitation pendant 2 h à température ambiante</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH 80% avec 1% HCl</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> centrifugation (10000 rpm pendant 15 min à 4°C)</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> LiChrospher 100RP18e (LxΦ = 250x4,0 mm; 5µm) <i>Température :</i> ambiante <i>Phase mobile :</i> A : HOAc 2% en H<sub>2</sub>O ; B : HOAc 0,5% en H<sub>2</sub>O / MeCN (50/50, v/v) <i>Débit phase mobile :</i> 1 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'élution :</i> de 5 à 10% B de 0 à 10 min, de 10 à 40% B de 10 à 40 min, de 40 à 55% B de 40 à 55 min, de 55 à 80% B de 55 à 60 min, de 80 à 100% B de 60 à 65min <i>Détection :</i> UV : 280 ; 340 nm</p>	naringine ; hespéridine ; néohespéridine ; dismine ; lutéoline ; sinensétine ; acide caféique ; acide férulique ; acide chlorogénique ; acide sinapique ; rutine ; quercétine ; acide <i>p</i> -coumarique ; kaempférol	[144]
Fruits de <i>Meliococcus bijucatus</i>	<p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous agitation pendant 1 heure et sans agitation pendant une nuit</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH 80% ; acétone 70%</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration sur filtres seringue (17 mm ; 0,45 µm) ; évaporation à sec à 40°C sous vide ; stockage à 4°C</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> LiChrospher RP-18 (LxΦ = 250x4,6 mm ; 5 µm) <i>Phase mobile :</i> A: HCOOH 0,4% en H<sub>2</sub>O ; B: MeOH <i>Débit phase mobile :</i> 1 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'élution :</i> de 0 à 5% B de 0 à 2 min, de 5 à 30% B de 2 à 5 min, de 30 à 34% B de 5 à 8 min, de 34 à 55% B de 8 à 11 min, isocratique à 0% B pendant 3 min <i>Volume échantillon injecté :</i> 10 µL <i>Détection :</i> UV-vis 320 ; 370 ; 520 nm</p> <p><b>CCM : Plaques :</b> silice <i>Système d'élution :</i> EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O (77 : 15 : 8) <i>Révélateurs :</i> vaniline – acide sulfurique</p> <p><b>LC – MS / MS</b> <i>Colonne :</i> Vydac C18 (LxΦ = 150x10 mm ; 5 µm) <i>Précolonne :</i> Brownlee C18 <i>Phase mobile :</i> A: HCOOH 0,2% en H<sub>2</sub>O ; B : HCOOH 0,2% en MeOH <i>Gradient d'élution :</i> de 15 à 20% A de 0 à 4 min, de 20 à 45% A de 4 à 7 min, de 45 à 50% A de 7 à 10 min, de 50 à 80% A de 10 à 13 min, de 80 à 15% A de 13 à 19 min, isocratique à 15% A de 19 à 45 min UV 280 nm ; MS : ESI mode positif et négatif</p>	acide gallique ; acide <i>p</i> -coumarique ; phloridzine ; <i>p</i> -hydroxybenzoylhexose ; <i>p</i> -coumaroylhexose ; dérivés d'acide caféique ; dérivés d'acide férulique ; dérivés de resvératrol	[145]

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Peau de pamplemousse ; Peau d'oranges	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> lyophilisation</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> Soxhlet pendant 8 h</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> hexane, EtOAc, acétone, MeOH, mélange MeOH / H<sub>2</sub>O</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration ; lyophilisation</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Zorbax SB-C18 (LxΦ = 250x4,6 mm)</p> <p><i>Température :</i> 27°C</p> <p><i>Phase mobile :</i> A : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3mM en H<sub>2</sub>O ; B : MeCN</p> <p><i>Débit phase mobile :</i> 0,8 mL.min<sup>-1</sup></p> <p><i>Gradient d'éluion :</i> de 0 à 50% B de 0 à 26 min, de 50% à 90% B de 26 à 30 min, de 90 à 100% B de 30 à 35 min</p> <p><i>Détection :</i> UV : 280 nm</p>	narirutine ; naringine ; naringénine ; didymine	[146]
Résidus de groseille ; Résidus de cassis ; Résidus de raisins	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> congélation à - 70°C</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous agitation à température ambiante pendant 1 h, 12 h, 24 h</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> EtOH 70% ; MeOH 70% ; H<sub>2</sub>O</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> centrifugation (10 minutes, 8000 rpm)</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Superspher 100 RP (LxΦ = 250x4,6 mm ; 18,5 μm)</p> <p><i>Température :</i> 30°C</p> <p><i>Phase mobile :</i> A: HCOOH 10% ; B : MeOH : H<sub>2</sub>O : HCOOH (45 : 45 : 10, v/v/v)</p> <p><i>Débit phase mobile :</i> 0,8 mL.min<sup>-1</sup></p> <p><i>Gradient d'éluion :</i> de 35 à 95% B de 0 à 20 min, de 95 à 100% B de 20 à 25 min, isocratique 100% B de 25 à 30 min</p> <p><i>Volume échantillon injecté :</i> 10 μL</p> <p><i>Détection :</i> 530 nm</p>	delphinidine ; cyanidine	[147]
Résidus de pommes ; Résidus de kiwi ; Résidus de pamplemousse	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> congélation à 20°C pendant 24 h ; lyophilisation pendant 5 jours ; broyage</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération par vortex et centrifugation</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> centrifugation (2000 rpm, 10 min) ; filtration du surnageant ; stockage à - 20°C</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Zorbax SB-C18 (LxΦ = 150x4,6 mm; 5μm)</p> <p><i>Température :</i> 37°C</p> <p><i>Phase mobile :</i> A : HOAc dans NaOAc 2 mM ; B : MeCN</p> <p><i>Débit phase mobile :</i> 1 mL.min<sup>-1</sup></p> <p><i>Gradient d'éluion :</i> de 0 à 15% B de 0 à 45 min, de 15 à 30% B de 45 à 60 min, de 30 à 50% B de 60 à 65 min, de 50 à 100% B de 65 à 70 min</p> <p><i>Volume échantillon injecté :</i> 10 μL</p> <p><i>Détection :</i> UV-vis : 280 ; 320 ; 360 ; 520 nm</p>	rutine ; acide chlorogénique ; phloridzine ; épicatchine ; cyanidine ; naringine ; vitexine	[148]

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Résidus de pommes ; Résidus de poires	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> séchage par convection à 110°C ; lyophilisation</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous agitation (1 h à température ambiante)</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> acétone 70% ; EtOAc</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec sous vide</p>	<p><b>HPLC</b>  <i>Colonne :</i> Aqua C18 (LxΦ = 250x4,6 mm ; 5 μm)  <i>Précolonne :</i> C18 ODS (LxΦ = 4x3,0 mm)  <i>Température :</i> 25°C  <i>Phase mobile :</i> A : HOAc 2% en H<sub>2</sub>O ; B : HOAc 0,5% en H<sub>2</sub>O : MeCN (50 : 50)  <i>Débit phase mobile :</i> 1 mL.min<sup>-1</sup>  <i>Gradient d'élution :</i> de 10 à 55% B de 0 à 50 min, de 55 à 100% B de 50 à 55 min, de 100 à 10% B de 55 à 60 min  <i>Volume échantillon injecté :</i> 10 μL  <i>Détection :</i> UV : 280 ; 320 ; 370 nm</p> <p><b>MS</b>  <i>Mode :</i> ESI négative  <i>Température de la source :</i> 120°C  <i>Tension de cône :</i> 10 – 50 V  <i>Potentiel de lentilles :</i> 0,5 kV  <i>m/z scan :</i> 100 – 800  <i>Fréquence de scan :</i> 0,4 scan.s<sup>-1</sup>  <i>Tension de multiplication :</i> 650 V</p>	<p>procyanidine B1 ;  catéchine ; <i>p</i>-coumaroyl  glucose ; acide  chlorogénique ;  acide <i>p</i>-  coumaroylquinique ;  procyanidine B2 ;  acide caféique ;  quercétine ; épicatechine ;  acide <i>p</i>-coumarique ;  quercétine-3-galactoside ;  quercétine-3-glucoside ;  quercétine-3-xyloside ;  quercétine-3-rhamnoside ;  phloridzine ; phlorétine ;  quercétine-3-rutinoside ;  isorhamnétine-3-  galactoside ;  isorhamnétine-3-  glucoside ; isorhamnétine-  3-rhamnoglactoside ;  isorhamnétine-3-</p>	[149]
Résidus de pommes	<p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par ultrasons à température ambiante</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH 80%</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec sous vide</p>	<p><b>HPLC</b>  <i>Colonne :</i> Zorbax SB-C18 (LxΦ = 250x3,0 mm; 5μm)  <i>Précolonne :</i> Zorbax SB-C18 (LxΦ = 12,5x4,6 mm)  <i>Température :</i> 23°C  <i>Phase mobile :</i> A : HOAc 0,1% H<sub>2</sub>O ; B : HOAc 0,1% dans MeCN  <i>Débit phase mobile :</i> 0,4 mL.min<sup>-1</sup>  <i>Gradient d'élution :</i> de 10 à 20% B de 0 à 10 min, de 20 à 50% B de 10 à 40 min, de 50 à 10% B de 40 à 55 min  <i>Volume échantillon injecté :</i> 10 μL  <i>Détection :</i> DAD : 210 – 400 nm</p>	<p>acide chlorogénique ;  acide caféique ;  catéchine ;  épicatechine ;  rutine ;  quercétine-glycosides ;  phloridzine</p>	[150]



Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Résidus de pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> séchage par convection à 60°C ; broyage ; stockage à - 20°C</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par microondes (puissance : 500, 600, 700 W ; durée: 40, 50, 60 s ; rapport solide – solvant = 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1) ; Soxhlet (6 heures) ; extraction assistée par ultrasons (1 h à température ambiante)</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> EtOH différentes concentrations</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration ; stockage à - 4°C</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> Sunfire C8 (LxΦ = 250x4,6 mm ; 5 μm) <i>Température :</i> 25°C <i>Phase mobile :</i> A : HOAc 0,1% H<sub>2</sub>O ; B : MeCN <i>Débit phase mobile :</i> 1,2 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'éluion :</i> isocratique : 90% A / 10% B <i>Volume échantillon injecté:</i> 10 μL <i>Détection :</i> UV : 280 nm</p>	<p>acide chlorogénique ; syringine ; procyanidine B2 ; acide caféique ; épicatéchine ; acide cinnamique ; acide coumarique ; phloridzine ; quercétine</p>	[151]
Résidus de pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> séchage par convection à 60°C ; broyage ; stockage sous vide</p> <p><b>Technique d'extraction:</b> Macération à l'abri de lumière ; agitation ; 20°C</p> <p><b>Solvant d'extraction:</b> acétone; MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration par entonnoir Buchner sous vide sur papier Whatman 1 ; évaporation à sec à 30°C, sous vide.</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> Nucleosil 120 C<sub>18</sub> (LxΦ = 250x4,6 mm ; 3μm) <i>Température :</i> 25°C <i>Phase mobile :</i> A : HOAc 2% en H<sub>2</sub>O ; B: MeOH <i>Débit phase mobile:</i> 0,8 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'éluion :</i> de 0 à 45% B en 55 min, isocratique à 45% B pendant 20 min <i>Détection :</i> UV : 280 ; 313 ; 355 nm</p>	<p>acide protocatéchuique ; acide chlorogénique ; acide caféique ; rutine ; épicatéchine ; hypérine ; phloretin-2'-xyloglucoside ; phloridzine ; avicularine ; quercitrine</p>	[152]
Résidus de pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> Congélation, broyage</p> <p><b>Technique d'extraction:</b> Macération successive à température ambiante</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> acétone 70% ; hexane</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec à 40°C sous vide</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne:</i> LiChroCART 100 RP-18 (5 μm) <i>Température:</i> 30°C <i>Phase mobile :</i> A: HOAc / H<sub>2</sub>O = 2 / 98, B: HOAc / MeCN / H<sub>2</sub>O = 2 / 20 / 78 <i>Débit de la phase mobile:</i> 0,5 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'éluion :</i> de 0 à 20%B, de 0 à 20 min ; de 20 à 100% B, de 20 à 60 min <i>Volume d'échantillon injecté:</i> 50 μL ; <i>Détection :</i> 280 nm</p>	<p>épicatéchine ; phloretin-2'-xyloglucoside ; phloridzine ; acide caféique ; 3-hydroxphloridzine ; quercétin-3-glucoside ; oligomère d'épicatéchine ; polymères d'épicatéchine</p>	[153]

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Résidus de pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> lyophilisation</p> <p><b>Technique d'extraction:</b> extraction assistée par ultrasons</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH (10 à 90%) pendant différentes temps</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> centrifugation à 3600 rpm pendant 20 minutes ; évaporation à sec du surnageant à 35°C sous vide</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne:</i> Nova-Pak C18 (LxΦ = 300x3,9 mm ; 4 μm)</p> <p><i>Précolonne:</i> Nova-Pak C18 (LxΦ = 10x3,9 mm ; 4 μm)</p> <p><i>Température:</i> 25°C ;</p> <p><i>Phase mobile :</i> A: HOAc / H<sub>2</sub>O = 10 / 90; B: MeOH</p> <p><i>Débit phase mobile:</i> 0,8 ml.min<sup>-1</sup></p> <p><i>Gradient d'élution :</i> 0% B de 0 à 10 min, de 0 à 15% B de 10 à 40 min, 15% B de 40 à 60 min</p> <p><i>Volume échantillon injecté:</i> 50 μL</p> <p><i>Détection :</i> UV 280 ; 320 ; 370 ; 530 nm</p>	<p>avicularine ;</p> <p>isoquercitrine ;</p> <p>(-)-épicatéchine;</p> <p>hypéroside;</p> <p>procyanidine B2 ;</p> <p>hydroxyphloretine diglicoside ;</p> <p>hydroxyphloretine monoglicoside ;</p> <p>phloridzine ; quercitrine ;</p>	[154]
Résidus de pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> séchage à 60°C pendant 48 h</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par ultrasons à 20°C</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> acétone / eau = 70 / 30</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> centrifugation pendant 10 minutes à 10°C ; évaporation à sec à 30°C</p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne:</i> Nucleosil 120 C18 (LxΦ = 250x4,6 mm ; 3 μm)</p> <p><i>Phase mobile :</i> A: HOAc 2% en H<sub>2</sub>O ; B: MeOH</p> <p><i>Débit phase mobile:</i> 0,8 mL.min<sup>-1</sup></p> <p><i>Gradient d'élution :</i> de 0 à 45% B en 55 min, isocratique à 45% B pendant 15 min, de 45 à 55% B en 10 min</p> <p><i>Volume échantillon injecté:</i> 10 μL</p> <p><i>Détection :</i> UV 280 ; 297,7 ; 313 ; 326,3 ; 350 nm</p>	<p>acide protocatéchuique ;</p> <p>rutine ; acide cinnamique ;</p> <p>procyanidine B2 ; acide caféique ; phloridzine;</p> <p>acide chlorogénique ;</p> <p>hyperine ; isoquercitrine ;</p> <p>(-)-épicatéchine ;</p> <p>quercitrine ; avicularine</p>	[155]
Résidus de pommes	<p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par ultrasons à température ambiante pendant 3 minutes</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> EtOAc ; DCM</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> séchage à 40°C, fractionnement sur une colonne Sephadex LH-20 par élution avec MeOH à un débit de 5 mL.min<sup>-1</sup></p>	<p><b>HPLC</b></p> <p><i>Colonne :</i> Phenomenex Luna C18 (LxΦ = 50x2,1 mm ; 3,5 μm)</p> <p><i>Précolonne :</i> Phenomenex Luna C18 (LxΦ = 4 x 3 mm)</p> <p><i>Phase mobile :</i> A: HCOOH 0,1%, B: HCOOH 0,1% en MeCN</p> <p><i>Gradient d'élution :</i> de 6 à 16,5% B de 0 à 5 min, de 16,5 à 17,5% B de 5 à 7 min, de 17,5 à 18,5% B de 7 à 12,5 min, de 18,5 à 100% B de 12,5 à 21 min, de 100 à 6% de 21 à 23 min</p> <p><b>LC/MS/MS</b></p> <p><i>ESI (mode négatif) ; Température de la source:</i> 400°C,</p> <p><i>Tension capillaire:</i> -3500 V ; <i>Energie de collision:</i> -30 V</p> <p><i>Scan:</i> 0,1 scans/s; <i>Gamme m/z:</i> 100-800</p>	<p>acide protocatéchuique ;</p> <p>acide salicylique ; acide <i>p</i>-coumarique-<i>O</i>-glucoside ;</p> <p>acide <i>p</i>-coumaroylquinique ;</p> <p>acide dicaféoylquinique ;</p> <p>acide caféique-<i>O</i>-glucoside ; acide chlorogénique ;</p> <p>acide caféoylquinique ;</p> <p>cyanidine-3-<i>O</i>-glucoside</p>	[156]

Tableau I.10. Extraction et analyse de composés phénoliques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Pomace de raisins rouges	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> stockage à 4° C</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous azote pendant une nuit à 18 – 20°C ; Soxhlet (30°C, 60°C, 75°C) ; extraction aux fluides supercritiques (pression : 150 bars, 250 bars ; température : 45°C ; co-solvant : MeOH)</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> KOH 3% en H<sub>2</sub>O ; MeOH ; EtOAc</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec à 50°C sous vide</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> Lichrospher RP-18 (LxΦ = 100x4 mm ; 5µm) <i>Température :</i> 40°C <i>Phase mobile :</i> A : MeOH ; B : HClO<sub>4</sub> 0,6% en H<sub>2</sub>O <i>Débit phase mobile:</i> 1 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'élution :</i> isocratique à 5% A pendant 10 min, de 5 à 80% A de 10 à 55 min, isocratique à 80% A pendant 15 min <i>Détection :</i> UV : 265 ; 280 ; 320 ; 365 nm</p>	<p>acide gallique ; acide vanilique ; acide syringique ; acide caféique ; acide férulique ; myricétine ; quercétine ; kaempférol</p>	[157]
Pomace de raisins	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> lyophilisation ; broyage ; stockage sous azote à – 20°C</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération sous agitation à 34°C</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> n-hexane ; EtOH avec 1% HCl 1 N</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec sous vide</p>	<p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> Phenomenex Luna C18 (LxΦ = 250x4,6 mm ; 5µm) <i>Température :</i> 20°C <i>Phase mobile :</i> A : H<sub>2</sub>O / HCOOH (9 / 1, v / v) ; B : MeCN / HCOOH (9 / 1, v / v) <i>Débit phase mobile:</i> 1 mL.min<sup>-1</sup> <i>Gradient d'élution :</i> de 5 à 15% B de 0 à 20 min, de 15% à 30% B de 20 à 40 min, de 30 à 100% B de 40 à 55 min, isocratique à 100% B pendant 10 min <i>Détection :</i> DAD : 200 – 700 nm</p>	<p>delphinidine 3-O-glucoside ; cyanidine 3-O-glucoside ; pétunidine 3-O-glucoside ; malvidine 3-O-glucoside ; malvidine 3-O-(6''-O-p-coumaroyl)-glucoside ; myricétine 3-O-glucoside ; quercétine 3-O-glucoside ; quercétine 3-O-glucuronide ; isorhamnétine 3-O-glucuronide ; quercétine</p>	[158]
Pomace de raisins	<p><b>Technique d'extraction :</b> distillation à la vapeur pendant 3 h</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> hexane</p>	<p><b>GC</b> <i>Colonne :</i> DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) <i>Gaz porteur :</i> hélium <i>Température :</i> injecteur : 250°C ; détecteur : 280°C ; four : 60°C pendant 6 min, de 60 à 300°C avec 2°C/min <i>Injection :</i> mode split (1 : 50) <i>Volume échantillon injecté:</i> 1 µL ; <i>Vitesse linéaire:</i> 19cm.s<sup>-1</sup></p>	<p>limonène ; terpinolène ; aromadendrène ; γ-muuroène ; γ-amorphène ; γ-cadinène</p>	[159]

Tableau I.11. Extraction et analyse de composés terpéniques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits

<i>Matériel végétal</i>	<i>Extraction de composés bioactifs</i>	<i>Analyse d'extrait</i>	<i>Composés identifiés</i>	<i>Ref.</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Framboises	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> lyophilisation ; broyage</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération successive</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> <i>n</i>-hexane ; EtOAc ; MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration ; concentration sous vide ; fractionnement par chromatographie liquide moyenne pression</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C</b> <i>Solvant :</i> CD<sub>3</sub>OD</p> <p><b>MLPC</b> <i>Silice :</i> 60 (35 – 70µm)</p> <p><b>CCM PREPARATIVE</b> <i>Plaques :</i> 20x20, 500 µm et 250 µm</p>	acide euscaphique ; acide 1-β-hydroxyeuscaphique ; acide hypstatique ; acide 19α-hydroxyasiatique ; 4-épinigaichigoside ; nigaichigoside ; trachlosperoside	[139]
Fruits de <i>Licania tomentosa</i>	<p><b>Technique d'extraction :</b> macération successive à température ambiante</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> hexane ; MeOH</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C</b> <i>Solvant :</i> CDCl<sub>3</sub></p> <p><b>IR ; GC – MS</b></p>	licanolide ; acide bétulinique ; acide palmitoléique	[160]
Fruits de <i>Tetrapanax papyriferus</i>	<p><b>Technique d'extraction :</b> Soxhlet 6 – 8 h</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> concentration par évaporation ; fractionnement par extraction liquide-liquide en EtOAc / H<sub>2</sub>O</p>	<p><b>MPLC</b> <i>Colonne :</i> C18 <i>Phase mobile :</i> 40% H<sub>2</sub>O / MeOH → MeOH</p> <p><b>HPLC</b> <i>Colonne :</i> C18 <i>Phase mobile :</i> 40% H<sub>2</sub>O / MeOH → MeOH</p> <p><b>EI – MS ; IR ; UV ; RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C</b> <b>CCM</b> <i>Plaques :</i> Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> (0,25 mm) <i>Révélateurs :</i> acide sulfurique 10%</p>	acide 3α,21β,22α-trihydroxy-11,13(18)-oleanadien-28-oic ; 3-épi-papyriogenin C ; acide 21- <i>O</i> -acetyl-21-hydroxy-3-oxo-11,13(18)-oleanadien-28-oic ; acide méthyle ester 3β-hydroxy-21-oxo-11,13(18)-oleanadien-28-oic	[131]
Fruits de <i>Ziziphus jujuba</i>	<p><b>Technique d'extraction :</b> Soxhlet</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> EtOH 80%</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation à sec sous vide ; fractionnement par extraction liquide-liquide</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) ; RMN <sup>13</sup>C (125 MHz)</b> <b>HR ESI-MS</b></p>	acide zizyberanal ; zizyberanone ; acide zizyberanalique ; acide ursolique	[161]

Tableau I.11. Extraction et analyse de composés terpéniques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Fruits de <i>Momordica Charantia</i>	<p><b>Technique d'extraction</b> : macération répétée à température ambiante</p> <p><b>Solvant d'extraction</b> : MeOH</p> <p><b>Traitement de l'extrait</b> : évaporation ; fractionnement extraction liquide-liquide</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz)</b></p> <p><i>Solvant</i> : CDCl<sub>3</sub></p> <p><b>EI – MS</b> : 70 eV</p> <p><b>CCM</b> : plaques de silice</p>	<p>13-hydroxy-28-methoxy-urs-11-en-3-one ; 13β,28-epoxy-urs-11-en-3-one ; 24-(1'-hydroxy, 1'-methyl-2'-pentenyloxy)-ursan-3 one ; 1-hydroxy-1,2-dimethyl-2-(8',10'-dihydroxy-4',7'-dimethyl-11'-hydroxy methyl-trideca)-3-ethyl-cyclohex-5-en-4-one</p>	[162]
Fruits de <i>Cicuta virosa</i> L. var <i>latisecta</i> Celak	<p><b>Technique d'extraction</b> : Soxhlet</p> <p><b>Solvant d'extraction</b> : EtOH 80%</p> <p><b>Traitement de l'extrait</b> : évaporation à sec sous vide ; fractionnement par extraction liquide-liquide</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C ; ESI-MS ; HR-TOF-MS</b></p>	<p>20-taraxastene-3β,12β,16β-triol ; 3β-feruloyloxy-20-taraxastene-16β,28-diol</p>	[163]
Pommes Annurca	<p><b>Traitement du matériel végétal</b> : stockage en cellule climatisée à 0°C et 98% humidité ; congélation en azote liquide ; broyage</p> <p><b>Technique d'extraction</b> : macération successive de 7 jours</p> <p><b>Solvant d'extraction</b> : EtOH ; Et<sub>2</sub>O</p> <p><b>Traitement de l'extrait</b> : évaporation à sec, sous vide ; fractionnement : extraction liquide-liquide et sur colonne de silice</p>	<p><b>HPLC Préparative</b></p> <p><i>Colonne</i> : Phenomenex Luna C8 (LxΦ = 250x10 mm ; 10μm)</p> <p><b>CCM</b></p> <p><i>Plaques</i> : silice 60 F<sub>254</sub> de 0,2 mm</p> <p><i>Révélateurs</i> : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : AcOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 20 : 4</p> <p><b>Chromatographie sur colonne</b></p> <p><i>Remplissage</i> : silice (70 – 240 mesh)</p> <p><b>RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz)</b></p> <p><i>Solvant</i> : CDCl<sub>3</sub> à 25°C</p>	<p>aldéhyde ursolique ; acide ursolique ; acide pomolique ; uvaol ; acide annurcoïque</p>	[164]

Tableau I.11. Extraction et analyse de composés terpéniques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)

1	2	3	4	5
Pommes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> immersion en <i>n</i>-hexane pendant 2 minutes</p> <p><b>Technique d'extraction :</b> macération (15 h à température ambiante)</p> <p><b>Solvant d'extraction :</b> EtOH 96%</p> <p><b>Traitement de l'extrait :</b> filtration ; évaporation à sec ; fractionnement par extraction liquide-liquide</p>	<p><b>HSCCC</b> <i>Rotation :</i> 960 rpm <i>Débit :</i> 2 – 4 mL.min<sup>-1</sup> <i>Système de solvants :</i> <i>n</i>-hexane : EtOAc : MeOH : H<sub>2</sub>O = 10 : 5 : 2,5 : 1 <i>Volume de la colonne :</i> 80 mL <i>Volume d'échantillon injecté :</i> 3 mL <i>Volume de fractions collectées :</i> 5 mL</p> <p><b>CCM</b> <i>Plaques :</i> silice GF 60 <i>Système d'élution :</i> CH<sub>3</sub>Cl : MeOH : Et<sub>2</sub>O = 90 : 5 : 5 <i>Révélateurs :</i> <i>p</i>-anisaldéhyde ; vaniline en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p> <p><b>GC</b> <i>Colonne :</i> HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) <i>Détecteur à flamme :</i> température 290°C <i>Température :</i> four : de 150 à 290°C à 4°C/min ; 290°C 30 min <i>Volume échantillon injecté :</i> 1 μL</p> <p><b>GC – MS</b> <i>Colonne :</i> HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) <i>Gaz porteur :</i> hélium <i>Débit du gaz porteur :</i> 1 mL.min<sup>-1</sup> <i>Température :</i> injecteur : 290°C <i>Injection :</i> mode split (1 : 20) <i>Volume échantillon injecté :</i> 1 μL <i>Tension d'ionisation :</i> ESI 70 eV <i>Température de la source d'ions :</i> 250°C</p> <p><b>IR :</b> Disques : KBr <b>RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C</b></p>	acide ursolique ; ursolate de méthyle	[165]

**Tableau I.11. Extraction et analyse de composés terpéniques de fruits et de résidus issus de la valorisation de fruits (suite)**

1	2	3	4	5
Peaux de pommes	<p><b>Technique d'extraction :</b> extraction assistée par ultrasons  <b>Solvant d'extraction :</b> EtOAc  <b>Traitement de l'extrait :</b> évaporation sous vide ; traitement avec éther de pétrole sous ultrasons ; fractionnement sur colonne de silice</p>	<p><b>RMN <sup>1</sup>H ; RMN <sup>13</sup>C ; MS – APCI et ESI</b>  <b>Chromatographie sur colonne de silice</b></p>	<p>acide ursolique ;            acide 2<math>\alpha</math>-hydroxyursolique ; acide euscaphique ; uvanol ;            acide 2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>-dihydroxyurs-12-en-28-oic ;            acide 2<math>\alpha</math>,3<math>\alpha</math>-dihydroxyolean-12-en-28-oic ;            dérivés d'acide ursolique</p>	[166]
Peau de bananes	<p><b>Traitement du matériel végétal :</b> séchage à l'air  <b>Technique d'extraction :</b> macération à température ambiante pendant 3 jours  <b>Solvant d'extraction :</b> MeOH</p>	<p><b>HPLC</b>  <i>Colonne :</i> Superiorex ODS-S C18e (Lx<math>\Phi</math> = 250x10 mm; 5<math>\mu</math>m)  <i>Température :</i> 25°C  <i>Phase mobile :</i> MeOH  <b>GC</b>  <i>Colonne :</i> DB – 17 (30 m x 0,3 mm)  <i>Température :</i> 275°C  <b>IR :</b> <i>Disques :</i> KBr  <b>MS :</b> <i>Tension :</i> 70 eV  <b>RMN <sup>1</sup>H (400 MHz); RMN <sup>13</sup>C (100,6 MHz)</b></p>	<p>3-épicycloeucalenol ;            3-épicyclomusalenol ;            24-méthylenepollinastanone,            28-norcyclomusalenone,            24-oxo-29-nocycloartanone</p>	[167]

## CONCLUSIONS

Ce premier chapitre a été dédié à l'étude bibliographique.

Les fruits sont un des éléments principaux pour une alimentation équilibrée. Ils sont consommés le plus souvent sous forme de produits frais. Même si, de nos jours, la globalisation peut assurer les quantités nécessaires tout au long de l'année, les fruits sont aussi soumis aux processus de transformation pour l'obtention d'autres produits tels que le jus, la confiture, la compote etc. Les importantes quantités de résidus issus de ces processus sont facilement dégradables et peuvent contribuer à l'augmentation de taux de pollution de l'air ; l'appauvrissement du sol en matière organique (si déposés sur le sol) ; la destruction de la microfaune du sol ; l'évaporation de l'eau de la couche supérieure du sol (si incinération) etc.

Nous avons vu que les sous-produits de fruits sont souvent valorisés sous forme de fertilisants ou de fourrage pour les animaux mais qu'ils peuvent être aussi matière de départ dans la production des agro combustibles par exemple.

Nous avons également remarqué que les fruits et leurs sous-produits ont une composition chimique riche en sucre, fibres alimentaires, protéines, antioxydants etc. ce qui nous permet de conclure qu'ils peuvent être utilisés aussi dans différentes filières industrielles dont une des plus prometteuses est représentée par la récupération des composés bioactifs afin de développer des ingrédients incorporables dans différentes formulations alimentaires, cosmétiques et / ou pharmaceutiques. Cette conclusion s'appuie sur le grand nombre de recherches ayant comme but l'étude de composés bioactifs de fruits et de leurs sous-produits.

Parmi les composés bioactifs les plus étudiés nous avons pu citer les métabolites secondaires dont les plus importants sont les composés phénoliques et les composés terpéniques. Ces deux classes de composés sont reconnues respectivement pour leur forte activité antioxydante et pour leur effet anti inflammatoire. Les différentes méthodes utilisées pour l'extraction et l'analyse de ces analytes ont été décrites. Conformément à la littérature, l'étude de composés bioactifs s'avère difficile nécessitant, selon le cas, une optimisation des diverses conditions d'identification, de séparation et de purification. Nous avons pu constater que le plus souvent la macération et l'extraction Soxhlet sont les techniques envisagées pour la récupération de composés bioactifs en utilisant des solvants ayant une polarité compatible. Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie liquide en mode phase inverse couplée à différents types de détecteurs et diverses études sont réalisées afin de déterminer les activités biologiques des principes actifs récupérés.

Suite à l'étude bibliographique nous avons considéré approprié d'aborder le développement des méthodes d'extraction et d'analyse de composés bioactifs en utilisant comme matériel végétal d'une part les fruits de cerisier et les résidus de pommes d'autre part vu qu'ils sont produits dans des quantités importantes dans la Région Centre de France mais aussi dans la région de Moldavie de Roumanie.

Nos recherches sont axées sur :

- la mise au point d'une méthode d'extraction de principes actifs tout en utilisant des techniques d'extraction non-énergivores et des faibles volumes de solvants ;
- l'analyse des extraits obtenus afin d'identifier les composés bioactifs extraits et de confirmer leurs structure ;
- le fractionnement des extraits afin de simplifier et de séparer les différentes familles de composés ;
- l'étude des activités antioxydantes des extraits et des fractions afin de déterminer (le cas échéant) des effets synergiques ;
- le management du processus d'extraction de principes actifs.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FAOSTAT - Division Statistique de l'Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture.  
<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=fr#ancor>.  
(consulté le 05.05.2012).
2. Mirmiran, P., Noori, N., Zavareh, M.B., Azizi, F. *Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease*. *Metabolism*. **2009**, 58, (4), 460-468.
3. Hoekstra, T., Beulens, J.W.J., van der Schouw, Y.T. *Cardiovascular disease prevention in women: Impact of dietary interventions*. *Maturitas*. **2009**, 63, (1), 20-27.
4. Zhu, Y., Zhang, Y., Ling, W., Feng, D., Wei, X., Yang, C., Ma, J. *Fruit consumption is associated with lower carotid intima-media thickness and C-reactive protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Journal of the American Dietetic Association*. **2011**, 111, (10), 1536-1542.
5. Soerjomataram, I., Oomen, D., Lemmens, V., Oenema, A., Benetou, V., Trichopoulou, A., Coebergh, J.W., Barendregt, J., de Vries, E. *Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected european countries*. *European Journal of Cancer*. **2010**, 46, (14), 2563-2580.
6. Castaldo, J.E., Reed Iii, J.F. *The lowering of vascular atherosclerotic risk (LOVAR) program: An approach to modifying cerebral, cardiac, and peripheral vascular disease*. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. **2008**, 17, (1), 9-15.
7. Aruoma, O.I., Landes, B., Ramful-Baboolall, D., Bourdon, E., Neergheen-Bhujun, V., Wagner, K.-H., Bahorun, T. *Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes*. *Preventive Medicine*. **2012**, 54, (Supplément), S12-S16.
8. Ford, E.S., Mokdad, A.H. *Fruit and Vegetable Consumption and Diabetes Mellitus Incidence among U.S. Adults*. *Preventive Medicine*. **2001**, 32, (1), 33-39.
9. Keen, R. *Osteoporosis: strategies for prevention and management*. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. **2007**, 21, (1), 109-122.
10. Cech, D. *Prevention of osteoporosis: From infancy through older adulthood*. *Hong Kong Physiotherapy Journal*. **2012**, 30, (1), 6-12.
11. Lanham-New, S.A. *Fruit and vegetables: the unexpected natural answer to the question of osteoporosis prevention?* *American Journal of Clinical Nutrition*. **2006**, 83, (6), 1254-1255.
12. Vinson, J.A. *Oxidative stress in cataracts*. *Pathophysiology*. **2006**, 13, (3), 151-162.
13. Ferrari, C.K.B. *Functional foods and physical activities in health promotion of aging people*. *Maturitas*. **2007**, 58, (4), 327-339.
14. Skuladottir, H., Tjoenneland, A., Overvad, K., Stripp, C., Olsen, J.H. *Does high intake of fruit and vegetables improve lung cancer survival?* *Lung Cancer*. **2006**, 51, (3), 267-273.
15. Martin-Moreno, J.M., Soerjomataram, I., Magnusson, G. *Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in 2008*. *European Journal of Cancer*. **2008**, 44, (10), 1390-1403.
16. Collins, A.R. *Antioxidant intervention as a route to cancer prevention*. *European Journal of Cancer*. **2005**, 41, (13), 1923-1930.
17. Steinmetz, K.A., Potter, J.D. *Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review*. *Journal of the American Dietetic Association*. **1996**, 96, (10), 1027-1039.
18. Lozano, J.E. *Fruit manufacturing. Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. **2006**, Springer Science and Business Media, LLC, New York, Etats Unis d'Amérique.

19. Vierling, E. *Aliments et boissons. Filières et produits*. **2008**, Vélizy : Doin Bordeaux : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France.
20. Thompson, A.K. *Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. Second edition*. **2010**, CAB International, Oxford, Angleterre.
21. Lacroix, M., Marcotte, M., Ramaswamy, H.S., *Irradiation of Fruits, Vegetables, Nuts, and Spices*, in *Handbook of postharvest technology. Cereals, fruits, vegetables, tea, and spices*, Chakraverty, A., Mujumdar, A.S., Vijaya Raghavan, G.S., Ramaswamy, H.S. **2003**, Marcel Dekker, Inc., New York, Etats Unis d'Amérique.
22. Parlement Européen. *Directive 2008/98/CE du Parlement Européen et du Conseil du 19 novembre 2008 relative aux déchets et abrogeant certaines directives (Texte présentant d'intérêt pour l'EEE)*. Journal Officiel de l'Union européenne. **2008**, L, (312), 3-30.
23. Link, A., Balaguer, F., Goel, A. *Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics*. *Biochemical Pharmacology*. **2010**, 80, (12), 1771-1792.
24. Moletta, R. *Le traitement des déchets*. **2009**, Lavoisier, Paris.
25. Joshi, V.K., Sandhu, D.K. *Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace*. *Bioresource Technology*. **1996**, 56, (2-3), 251-255.
26. Villas-Bôas, S.G., Esposito, E., de Mendonça, M.M. *Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2003**, 19, (5), 461-467.
27. Pirmohammadi, R., Rouzbehan, Y., Rezayazdi, K., Zahedifar, M. *Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage*. *Small Ruminant Research*. **2006**, 66, (1-3), 150-155.
28. Schaub, S.M., Leonard, J.J. *Composting: An alternative waste management option for food processing industries*. *Trends in Food Science & Technology*. **1996**, 7, (8), 263-268.
29. Koller, E. *Traitement des pollutions industrielles*. **2009**, Dunod, Paris.
30. van Heerden, I., Cronje, C., Swart, S.H., Kotze, J.M. *Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting*. *Bioresource Technology*. **2002**, 81, 71-76.
31. Srilatha, H.R., Nand, K., Babu, K.S., Madhukara, K. *Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane*. *Process Biochemistry*. **1995**, 30, 327-331.
32. Elmaleh, S., Defrance, M.B., Ghommidh, C. *Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment*. *Process Biochemistry*. **1999**, 35, 441-449.
33. Stabnikova, O., Wang, J.-Y., Bo Ding, H., Joo, H. *Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium*. *Bioresource Technology*. **2005**, 96, (6), 747-751.
34. Nigam, P.S., Singh, A. *Production of liquid biofuels from renewable resources*. *Progress in Energy and Combustion Science*. **2011**, 37, (1), 52-68.
35. Crop Energies. *F.O. Licht's World Ethanol and Biofuels Report*. **2011**.
36. Plateforme Biocarburants. *La situation des bioacrburants dans l'Union Européenne. La production de bioéthanol*. <http://www.biofuels-platform.ch/infos/eu-bioethanol.php>. (consulté le **01.11.2011**).
37. Balat, M., Balat, H., Öz, C. *Progress in bioethanol processing*. *Progress in Energy and Combustion Science*. **2008**, 34, (5), 551-573.
38. Patle, S., Lal, B. *Ethanol production from hydrolysed agricultural wastes using mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida tropicalis**. *Biotechnology Letters*. **2007**, 29, (12), 1839-1843.

39. Sharma, N., Kalra, K., Oberoi, H., Bansal, S. *Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation*. Indian Journal of Microbiology. **2007**, 47, (4), 310-316.
40. Grohmann, K., Baldwin, E., Buslig, B. *Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. Applied Biochemistry and Biotechnology. **1994**, 45-46, (1), 315-327.
41. Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., Ingram, L.O.N. *Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli**. Biotechnology Letters. **1994**, 16, (3), 281-286.
42. Wilkins, M.R. *Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis**. Biomass and Bioenergy. **2009**, 33, (3), 538-541.
43. Wilkins, M., Suryawati, L., Maness, N., Chrz, D. *Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **2007**, 23, (8), 1161-1168.
44. Grohmann, K., Baldwin, E., Buslig, B. *Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. Applied Biochemistry and Biotechnology. **1994**, 45-46, (1), 315-327.
45. Vijayaraghavan, K., Ahmad, D., Soning, C. *Bio-hydrogen generation from mixed fruit peel waste using anaerobic contact filter*. International Journal of Hydrogen Energy. **2007**, 32, (18), 4754-4760.
46. Callaghan, F.J., Wase, D.A.J., Thayanythy, K., Forster, C.F. *Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure*. Biomass and Bioenergy. **2002**, 22, (1), 71-77.
47. Murto, M., Björnsson, L., Mattiasson, B. *Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure*. Journal of Environmental Management. **2004**, 70, (2), 101-107.
48. Llanaza Coalla, H., Blanco Fernández, J.M., Morís Morán, M.A., López Bobo, M.R. *Biogas generation apple pulp*. Bioresource Technology. **2009**, 100, (17), 3843-3847.
49. Feng, X., Wang, H., Wang, Y., Wang, X., Huang, J. *Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge*. International Journal of Hydrogen Energy. **2010**, 35, (7), 3058-3064.
50. Wang, H., Wang, J., Fang, Z., Wang, X., Bu, H. *Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis*. International Journal of Hydrogen Energy. **2010**, 35, (15), 8303-8309.
51. Doi, T., Matsumoto, H., Abe, J., Morita, S. *Application of rice rhizosphere microflora for hydrogen production from apple pomace*. International Journal of Hydrogen Energy. **2010**, 35, (14), 7369-7376.
52. Royer, G., Madieta, E., Symoneaux, R., Jourjon, F. *Preliminary study of the production of apple pomace and quince jelly*. LWT - Food Science and Technology. **2006**, 39, (9), 1022-1025.
53. Cojocar, C., Oprea, S., Costin, G., Oțel, I., Marinescu, I., Spătaru, N. *Valorificarea deșeurilor din industria alimentară*. **1965**, Editura Tehnică, București.
54. Bhushan, S., Joshi, V.K. *Baker's yeast production under fed batch culture from apple pomace*. Journal of Scientific and Industrial Research. **2006**, 65, 72-76.
55. Worrall, J.J., Yang, C.S. *Shiitake and Oyster mushroom production on apple pomace and sawdust*. HortScience. **1992**, 27, (10), 1131-1133.
56. Paul, D., Ohlrogge, K. *Membrane separation processes for clean production*. Environmental Progress. **1998**, 17, (3), 137-141.

57. Schiewer, S., Patil, S.B. *Pectin-rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: Equilibrium and kinetics*. Bioresource Technology. **2008**, 99, (6), 1896-1903.
58. Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. *Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations*. Bioresource Technology. **2003**, 87, (2), 167-198.
59. Basso, M.C., Cerrella, E.G., Cukierman, A.L. *Lignocellulosic materials as potential biosorbents of trace toxic metals from wastewater*. Chemical Resources. **2002**, 41, 3580-3585.
60. Qaiser, S., Saleemi, A.R., Ahmad, M.M. *Heavy metal uptake by agro based waste materials*. Environmental Biotechnology. **2007**, 10, 409-416.
61. Gupta, V.K., Ali, I. *Utilisation of bagasse fly ash (a sugar industry waste) for the removal of copper and zinc from wastewater*. Separation and Purification Technology. **2000**, 18, (2), 131-140.
62. Sud, D., Mahajan, G., Kaur, M.P. *Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions - A review*. Bioresource Technology. **2008**, 99, (14), 6017-6027.
63. Balkeose, D., Baltacioglu, H. *Adsorption of heavy metal cations from aqueous solutions by wool fibers*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. **1992**, 54, 393-397.
64. Xie, J.Z., Chang, H.-L., Kilbane, J.J. *Removal and recovery of metal ions from wastewater using biosorbents and chemically modified biosorbents*. Bioresource Technology. **1996**, 57, (2), 127-136.
65. Namasivayam, C., Kadirvelu, K. *Uptake of mercury (II) from wastewater by activated carbon from an unwanted agricultural solid by-product: coirpith*. Carbon. **1999**, 37, (1), 79-84.
66. Borycka, B., Zuchowski, J. *Metal sorption capacity of fibre preparations from fruit pomace*. Polish-Journal-of-Food-and-Nutrition-Sciences. **1998**, 7, (48), 67-76.
67. Ajmal, M., Rao, R.A.K., Ahmad, R., Ahmad, J. *Adsorption studies on Citrus reticulata (fruit peel of orange): removal and recovery of Ni(II) from electroplating wastewater*. Journal of Hazardous Materials. **2000**, 79, (1-2), 117-131.
68. Maranon, E., Sastre, H. *Ion-exchange equilibria of heavy metals onto chemically modified apple residues*. Solvent Extraction and Ion Exchange. **1992**, 9, (3), 516-523.
69. Masoodi, F.A., Sharma, B., Chauhan, G.S. *Use of apple pomace as a source of dietary fiber in cakes*. Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum). **2002**, 57, (2), 121-128.
70. Sudha, M.L., Baskaran, V., Leelavathi, K. *Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making*. Food Chemistry. **2007**, 104, (2), 686-692.
71. Canteri-Schemin, M.H., Fertoni, H.C.R., Waszczyński, N., Wosiacki, G. *Extraction of Pectin From Apple Pomace*. Brazilian Archives of Biology and Technology. **2005**, 48, 259-266.
72. Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.-U., Rentschler, C., Carle, R. *A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2003**, 4, (1), 99-107.
73. Min, B., Bae, I.Y., Lee, H.G., Yoo, S.-H., Lee, S. *Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system*. Bioresource Technology. **2010**, 101, (14), 5414-5418.
74. Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. *Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology*. Journal of Food Engineering. **2007**, 78, (2), 693-700.

75. Marcon, V.M., Vriesmann, L.C., Wosiacki, G., Beleski-Carneiro, E. *Pectins from apple pomace*. Polimeros: Ciencia e Tecnologia. **2005**, 15, (2), 127-129.
76. Joshi, V.K., Parmar, M., Rana, N.S. *Pectin Esterase Production from Apple Pomace in Solid-State and Submerged Fermentations*. Food Technology and Biotechnology. **2006**, 44, (2), 253-256.
77. Favela-Tores, E., Volke-Sepulveda, T., Viniegra-Gonzalves, G. *Production of hydrolitic depolymerising pectinases*. Food Technology and Biotechnology. **2006**, 44, (2), 221-227.
78. Zheng, Z., Shetty, K. *Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes*. Process Biochemistry. **2000**, 35, (8), 825-830.
79. Seyis, I., Aksoz, N. *Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources*. Food Technology and Biotechnology. **2005**, 43, (1), 37-40.
80. Hang, Y.D., Woodams, E.E.  *$\beta$ -Fructofuranosidase production by *Aspergillus* species from apple pomace*. LWT - Food Science and Technology. **1995**, 28, (3), 340-342.
81. Rosales, E., Rodríguez Couto, S., Ángeles Sanromán, M. *Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta**. Journal of Food Engineering. **2005**, 66, (4), 419-423.
82. Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. *Microbial pectinolytic enzymes: A review*. Process Biochemistry. **2005**, 40, (9), 2931-2944.
83. Gullón, B., Garrote, G., Alonso, J.L., Parajó, J.C. *Production of l-lactic Acid and Oligomeric Compounds from Apple Pomace by Simultaneous Saccharification and Fermentation: A Response Surface Methodology Assessment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2007**, 55, (14), 5580-5587.
84. Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S., Zanetti, F. *[gamma]-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace*. Bioresource Technology. **2000**, 73, (1), 41-45.
85. Shojaosadati, S.A., Babaeipour, V. *Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor*. Process Biochemistry. **2002**, 37, (8), 909-914.
86. Attri, D., Joshi, V.K. *Optimization of apple pomace based medium and fermentation conditions for pigment production by *Micrococcus* species*. Journal of Scientific and Industrial Research. **2005**, 64, 598-601.
87. Christen, P., Bramorski, A., Revah, S., Soccol, C.R. *Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes*. Bioresource Technology. **2000**, 71, (3), 211-215.
88. Almosnino, A.M., Belin, J.M. *Apple pomace: An enzyme system for producing aroma compounds from polyunsaturated fatty acids*. Biotechnology Letters. **1991**, 13, (12), 893-898.
89. Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. **2010**, Sinauer Associates, Inc., SUA.
90. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. *Les composés phénoliques des végétaux - Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. **2005**, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
91. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. *Fruit phenolics*. **2000**, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
92. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry. **1999**, 66, (4), 401-436.
93. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition. **2004**, 79, (5), 727-747.

94. Naczki, M., Shahidi, F. *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **2006**, 41, (5), 1523-1542.
95. Renault, J.-H., Thépenier, P., Zéches-Hanrot, M., Le Men-Olivier, L., Durand, A., Foucault, A., Margraff, R. *Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography*. Journal of Chromatography A. **1997**, 763, (1-2), 345-352.
96. Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.d.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry. **2009**, 113, (4), 859-871.
97. Parlement Européen. *Règlement 2008/1333/CE du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires. (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)*. Journal Officiel de l'Union européenne. **2011**, L, (354), 16-33.
98. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. *Methods for testing antioxidant activity*. The Analyst Journal. **2002**, 127, 183-198.
99. Mello, L.D., Kubota, L.T. *Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation*. Talanta. **2007**, 72, (2), 335-348.
100. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review*. Annals of Botany. **2003**, 91, 179-194.
101. Cao, G., Prior, R.L. *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum*. Clinical Chemistry. **1998**, 44, (6), 1309-1315.
102. Halliwell, B. *Antioxidant characterization : Methodology and mechanism*. Biochemical Pharmacology. **1995**, 49, (10), 1341-1348.
103. André, C., Castanheira, I., Cruz, J.M., Paseiro, P., Sanches-Silva, A. *Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review*. Trends in Food Science & Technology. **2010**, 21, (5), 229-246.
104. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science. **1997**, 2, (4), 152-159.
105. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. *Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry. **2006**, 99, (1), 191-203.
106. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1993**, 90, (17), 7915-7922.
107. McCann, M.J., Gill, C.I.R., O' Brien, G., Rao, J.R., McRoberts, W.C., Hughes, P., McEntee, R., Rowland, I.R. *Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro*. Food and Chemical Toxicology. **2007**, 45, (7), 1224-1230.
108. Ho, H.-H., Chang, C.-S., Ho, W.-C., Liao, S.-Y., Wu, C.-H., Wang, C.-J. *Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals*. Food and Chemical Toxicology. **2010**, 48, (8-9), 2508-2516.
109. Lansky, E., Harrison, G., Froom, P., Jiang, W. *Pomegranate (&i>Punica granatum&i>) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™*. Investigational New Drugs. **2005**, 23, (2), 121-122.
110. Yu, L., Zhao, M., Wang, J.s., Cui, C., Yang, B., Jiang, Y., Zhao, Q. *Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (Pinus massoniana Lamb) bark*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2008**, 9, (1), 122-128.

111. Lee, H.S., Seo, E.Y., Kang, N.E., Kim, W.K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **2008**, 19, (5), 313-319.
112. Weng, C.-J., Yen, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*. **2012**, 38, (1), 76-87.
113. Hollman, P.C.H., Katan, M.B. *Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability*. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**, 37, (9-10), 937-942.
114. Sesso, H.D., Gaziano, J.M., Liu, S., Buring, J.E. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **2003**, 77, (6), 1400-1408.
115. Ielpo, M.T.L., Basile, A., Miranda, R., Moscatiello, V., Nappo, C., Sorbo, S., Laghi, E., Ricciardi, M.M., Ricciardi, L., Vuotto, M.L. Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **2000**, 71, Supplement 1, (0), S101-S109.
116. Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Liu, Y., Yu, L., Jiang, Y. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. *International Immunopharmacology*. **2007**, 7, (2), 162-166.
117. Liu, X., Zhao, M., Wu, K., Chai, X., Yu, H., Tao, Z., Wang, J. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). *Food Chemistry*. **2012**, 131, (2), 685-690.
118. Gayathri Devi, V., Rooban, B.N., Sasikala, V., Sahasranamam, V., Abraham, A. Isorhamnetin-3-glucoside alleviates oxidative stress and opacification in selenite cataract in vitro. *Toxicology in Vitro*. **2010**, 24, (6), 1662-1669.
119. Cornish, K.M., Williamson, G., Sanderson, J. Quercetin metabolism in the lens: role in inhibition of hydrogen peroxide induced cataract. *Free Radical Biology and Medicine*. **2002**, 33, (1), 63-70.
120. Doganay, S., Turkoz, Y., Evereklioglu, C., Er, H., Bozaran, M., Ozerol, E. Use of caffeic acid phenethyl ester to prevent sodium-selenite-induced cataract in rat eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. **2002**, 28, (8), 1457-1462.
121. Sanderson, J., McLauchlan, W.R., Williamson, G. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**, 26, (5-6), 639-645.
122. Sakthivel, M., Elanchezian, R., Ramesh, E., Isai, M., Jesudasan, C.N., Thomas, P.A., Geraldine, P. Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats by the polyphenol, ellagic acid. *Experimental Eye Research*. **2008**, 86, (2), 251-259.
123. Aruna Devi, R., Lata, S., Bhadoria, B.K., Ramteke, V.D., Kumar, S., Sankar, P., Kumar, D., Tandan, S.K. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2"-O-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. *European Journal of Pharmacology*. **2010**, 626, (2-3), 205-212.
124. Behl, C., Moosmann, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical Biology and Medicine*. **2002**, 33, (2), 182-191.
125. Guan, S., Jiang, B., Bao, Y.M., An, L.J. Protocatechuic acid suppresses MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2006**, 44, (10), 1659-1666.
126. Wang, J., Pflieger, C., Friedman, L., Vittorino, R., Zhao, W., Qian, X., Conley, L., Ho, L., Pasinetti, G. Potential application of grape derived polyphenols in Huntington's disease. *Translational Neuroscience*. **2010**, 1, (2), 95-100.

127. Degenhardt, J., Köllner, T.G., Gershenzon, J. *Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants*. *Phytochemistry*. **2009**, 70, (15-16), 1621-1637.
128. Reddy, L.H., Couvreur, P. *Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2009**, 61, (15), 1412-1426.
129. Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.-C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H.E., Mirata, M.A., Schrader, J., Ulber, R. *Biotransformation of triterpenes*. *Process Biochemistry* (Amsterdam, Netherlands). **2011**, 46, (1), 1-15.
130. Rhourri, B., *Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse (Thèse de doctorat)*. 2009, Université d'Orléans: Orléans, France. p. 290.
131. Ho, J.-C., Chen, C.-M., Row, L.-C. *Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of Tetrapanax papyriferus*. *Phytochemistry*. **2007**, 68, (5), 631-635.
132. Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J.J., Uceda, M., Mesa, M.D. *Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids*. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48, (10), 2885-2890.
133. Reyes-Zurita, F.J., Rufino-Palomares, E.E., Lupiáñez, J.A., Cascante, M. *Maslinic acid, a natural triterpene from Olea europaea L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway*. *Cancer Letters*. **2009**, 273, (1), 44-54.
134. Vasconcelos, J.F., Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Lúcio, A.S.S.C., Almeida, J.R.G.S., de Queiroz, L.P., Ribeiro-dos-Santos, R., Soares, M.B.P. *The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model*. *International Immunopharmacology*. **2008**, 8, (9), 1216-1221.
135. Chaturvedi, P.K., Bhui, K., Shukla, Y. *Lupeol: Connotations for chemoprevention*. *Cancer Letters*. **2008**, 263, (1), 1-13.
136. Saleem, M. *Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene*. *Cancer Letters*. **2009**, 285, (2), 109-115.
137. Saleem, M., Murtaza, I., Witkowsky, O., Kohl, A.M., Maddodi, N. *Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: Disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2009**, 388, (3), 576-582.
138. Saleem, M., Alam, A., Arifin, S., Shah, M.S., Ahmed, B., Sultana, S. *Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin*. *Pharmacological Research*. **2001**, 43, (2), 127-134.
139. Bowen-Forbes, C.S., Mulabagal, V., Liu, Y., Nair, M.G. *Ursolic acid analogues: non-phenolic functional food components in Jamaican raspberry fruits*. *Food Chemistry*. **2009**, 116, (3), 633-637.
140. Yan, S.-l., Huang, C.-y., Wu, S.-t., Yin, M.-c. *Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines*. *Toxicology in Vitro*. **2010**, 24, (3), 842-848.
141. de Melo, C.L., Queiroz, M.G.R., Fonseca, S.G.C., Bizerra, A.M.C., Lemos, T.L.G., Melo, T.S., Santos, F.A., Rao, V.S. *Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet*. *Chemico-Biological Interactions*. **2010**, 185, (1), 59-65.
142. Jakobek, L., Seruga, M., Voca, S., Sindrak, Z., Dobricevic, N. *Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks*. *Scientia Horticulturae*. **2009**, 123, (1), 23-28.



143. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. *Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Ultrasonics Sonochemistry. **2007**, 14, (6), 767-778.
144. Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., Ku, Y.-H. *Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan*. Food Chemistry. **2007**, 102, (4), 1163-1171.
145. Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodriguez, E., Obendorf, R.L. *Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. 'Montgomery' fruits*. Food Chemistry. **2008**, 111, (4), 1017-1024.
146. Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B., Patil, B.S. *Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems*. Bioresource Technology. **2008**, 99, (10), 4484-4494.
147. Lapornik, B., Prosek, M., Golc Wondra, A. *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time*. Journal of Food Engineering. **2005**, 71, (2), 214-222.
148. Wijngaard, H.H., Roble, C., Brunton, N. *A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants*. Food Chemistry. **2009**, 116, (1), 202-207.
149. Schieber, A., Keller, P., Carle, R. *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. **2001**, 910, (2), 265-273.
150. Cetkovic, G., Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Savatovic, S., Mandic, A., Tumbas, V. *Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace*. Food Chemistry. **2008**, 109, (2), 340-347.
151. Bai, X.-L., Yue, T.-L., Yuan, Y.-H., Zhang, H.-W. *Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis*. Journal of Separation Science. **2010**, 33, (23-24), 3751-3758.
152. Suárez, B., Álvarez, Á.L., García, Y.D., Barrio, G.d., Lobo, A.P., Parra, F. *Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace*. Food Chemistry. **2010**, 120, (1), 339-342.
153. Yeap Foo, L., Lu, Y. *Isolation and identification of procyanidins in apple pomace*. Food Chemistry. **1999**, 64, (4), 511-518.
154. Alonso-Salces, R.M., Barranco, A., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. *A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues: Comparison with pressurised liquid extraction*. Talanta. **2005**, 65, (3), 654-662.
155. Diñeiro García, Y., Valles, B.S., Picinelli Lobo, A. *Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace*. Food Chemistry. **2009**, 117, (4), 731-738.
156. Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. *Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. **2004**, 18, (5), 553-563.
157. Louli, V., Ragoussis, N., Magoulas, K. *Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products*. Bioresource Technology. **2004**, 92, (2), 201-208.
158. Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., Tringali, C. *Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity*. Bioresource Technology. **2008**, 99, (13), 5960-5966.

159. Ruberto, G., Renda, A., Amico, V., Tringali, C. *Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian Vitis vinifera L.* Bioresource Technology. **2008**, 99, (2), 260-268.
160. Castilho, R.O., de Oliveira, R.R., Kaplan, M.A.C. *Licanolide, a new triterpene lactone from Licania tomentosa.* Fitoterapia. **2005**, 76, (6), 562-566.
161. Guo, S., Tang, Y.P., Duan, J.A., Su, S.L., Ding, A.W. *Two new terpenoids from fruits of Ziziphus jujuba.* Chinese Chemical Letters. **2009**, 20, (2), 197-200.
162. Begum, S., Ahmed, M., Siddiqui, B.S., Khan, A., Saify, Z.S., Arif, M. *Triterpenes, A sterol and A monocyclic alcohol from Momordica charantia.* Phytochemistry. **1997**, 44, (7), 1313-1320.
163. Li, Z.L., Qian, S.H., Pu, S.B. *Two new taraxastane-type triterpenoids from the fruit of Cicuta virosa L. var latisecta Celak.* Chinese Chemical Letters. **2010**, 21, (3), 317-321.
164. D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Pacifico, S. *Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple.* Food Chemistry. **2006**, 98, (2), 285-290.
165. Frighetto, R.T.S., Welendorf, R.M., Nigro, E.N., Frighetto, N., Siani, A.C. *Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography.* Food Chemistry. **2008**, 106, (2), 767-771.
166. Ma, C.-M., Cai, S.-Q., Cui, J.-R., Wang, R.-Q., Tu, P.-F., Hattori, M., Daneshtalab, M. *The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives.* European Journal of Medicinal Chemistry. **2005**, 40, (6), 582-589.
167. Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T. *Cycloartane triterpenes from the fruit peel of Musa sapientum.* Phytochemistry. **1998**, 47, (6), 1107-1110.





## **CHAPITRE II**

### **MATERIELS ET METHODES UTILISES POUR L'EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS**





Nous avons vu au cours du premier chapitre de ce manuscrit que les fruits et les résidus obtenus pendant le processus de transformation des fruits peuvent être valorisés aussi par la récupération des principes actifs utilisables dans des domaines différents tels que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

Nos recherches ont eu comme objectif l'étude de deux types de sources végétales : les cerises et les résidus de pommes qui sont obtenus en quantités assez importantes.

Le chemin qui peut être suivi pour la récupération de différentes molécules bioactives à partir des sources végétales ciblées comporte plusieurs étapes qui sont schématisées dans la Figure II.1.

Le principe de ces étapes ainsi que la caractérisation des matériels végétaux utilisés au cours de cette étude seront présentés à la suite.

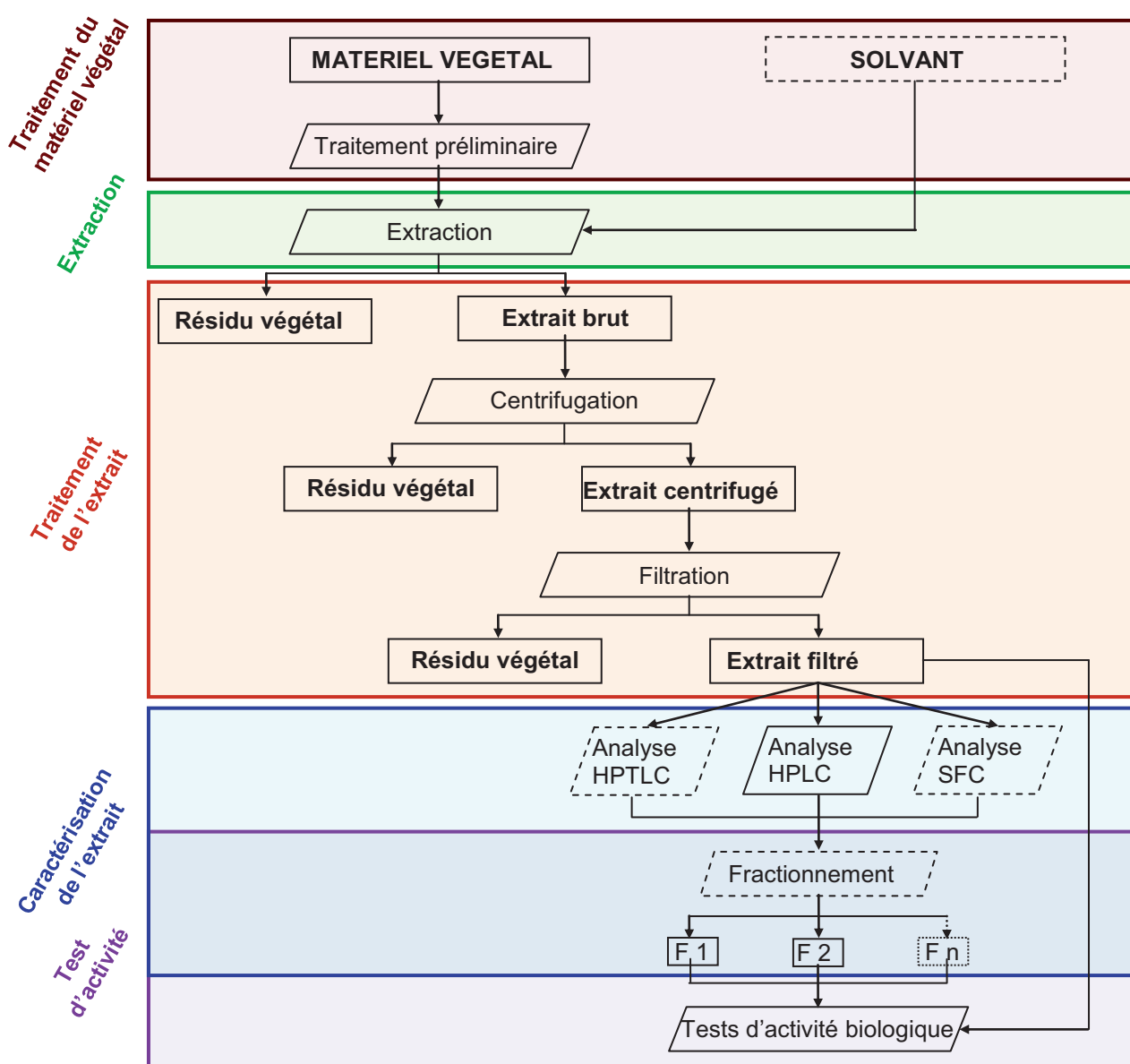


Figure II.1. Processus de récupération de principes actifs à partir d'un matériel végétal  
 ----- Optionnel      F : fraction

## II. 1. MATERIEL VEGETAL

### II. 1. 1. Les cerises

#### II. 1. 1. 1. Description botanique des cerises



Figure II.2. Fleurs, fruits et graines de cerisier

Les cerises sont les fruits comestibles du cerisier. Elles font partie (à côté des fraises) des fruits rouges les plus communs. Les cerises ont une forme sphérique et une couleur généralement rouge avec différentes nuances. Elles se caractérisent par une peau fine, une région médiane charnue et un noyau contenant les graines.

Du point de vue botanique, les cerises peuvent être classées comme suit :

**Règne** : Plante

**Embranchement** : Spermatophytes (plantes à graine)

**Sous embranchement** : Angiospermes (plantes à fleurs)

**Classe** : Dicotylédones

**Sous classe** : Rosidae

**Ordre** : Rosales

**Famille** : Rosaceae

**Genre** : *Prunus*

**Espèce** : *Prunus avium* L. [1].

Deux espèces sont cultivées aux Etats Unis d'Amérique et en Europe (Russie, Allemagne, France, Roumanie, Pologne):

- les cerises douces (*Prunus avium*) étroitement liées à des formes sauvages réparties au nord de la Turquie, dans le Caucase et dans la Transcaucasie ;
- les griottes (*Prunus cerasus*) : probablement évoluées comme un hybride entre *P. avium* et *P. fruticosa* (un arbuste sauvage se trouvant en Europe centrale et orientale) et plus résistantes aux dommages mécaniques que les cerises douces [2].

## II. 1. 1. 2. Composition des cerises

Les cerises sont des fruits non seulement réellement fonctionnels dans le processus de nutrition mais qui procurent des effets bénéfiques pour l'un ou l'autre des systèmes du corps.

Ces fruits contiennent des nutriments susceptibles d'aider à éviter les dysfonctions vitales tels que: l'artériosclérose, le cancer, les accidents vasculaires cérébraux, la goutte et les rhumatismes, les calculs urinaires et biliaires [3-5]. Les cerises procurent aussi un effet de détente pour le système nerveux, en permettant également une meilleure concentration. Rafraîchissantes et toniques, elles sont considérées aussi comme régulateur du foie et de l'estomac [6].

Afin qu'elles soient acceptées par les consommateurs, les cerises doivent avoir une certaine qualité définie par des caractéristiques spécifiques telles que la couleur, le goût, la fermeté, le degré de douceur, l'acidité etc. [7]. Ces paramètres dépendent de l'état de maturation de fruits et sont fortement influencés par leur composition chimique.

Les cerises contiennent des ingrédients biologiquement actifs, des composés organiques et inorganiques. Elles sont riches en sucres, protéines, éléments tels que : Ca, P, K, Fe, Mg, Se, vitamines (A, C, B), fibres diététiques, composés phénoliques [8]. Elles sont donc considérées comme un aliment reconstituant et minéralisant.

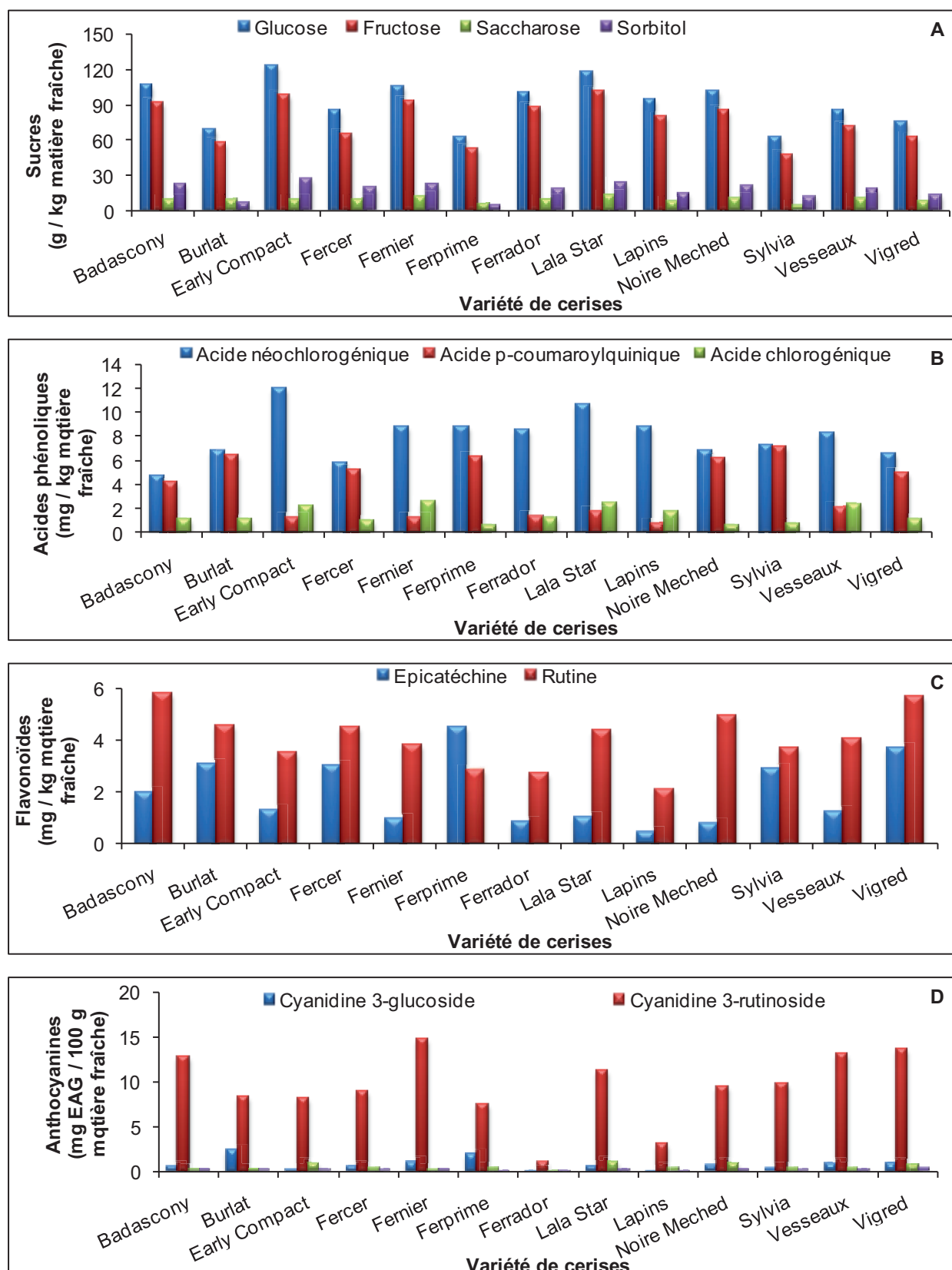
Différentes études ont été réalisées en vue de quantifier les divers constituants de cerises.

Ainsi Usenik *et al.* [9] ont déterminé le contenu en **sucres, acides organiques et composés phénoliques** de 13 variétés de cerises (Figure II.3). Parmi les sucres, les quantités les plus importantes ont été retrouvées pour le glucose et le fructose et ont été détectées pour les variétés Lala Star et Early van Compact. Les mêmes composés phénoliques ont été trouvés dans des proportions variables dans toutes les variétés de cerises étudiées. L'acide néochlorogénique a été trouvé comme majoritaire suivi par l'acide *p*-coumaroylquinique et l'acide chlorogénique. La présence de ces acides ainsi que celle de l'acide caféoyltartarique et de l'acide coumaroyltartarique a été mentionnée également dans d'autres études [10-15]. L'épicatéchine et la rutine ont été les flavonoïdes déterminés et les résultats obtenus ont indiqué des niveaux relativement élevés pour des variétés telles que Badacsony, Burlat, Noire de Meched et Vigred. En ce qui concerne les anthocyanines quatre composés différents ont été identifiés : la cyanidine-3-rutinoside, la cyanidine-3-glucoside, la pélargonidine-3-rutinoside et la péonidine-3-rutinoside la variété Lambert Compact présentent les concentrations les plus élevées [9]. Ce type de molécules a fait l'objet de nombreuses études. Le tableau II.1. présente une synthèse des anthocyanines le plus souvent trouvés dans les cerises.

**Tableau II.1. Anthocyanines de cerises**

<i>Exemples</i>	<i>Références</i>
cyanidine, cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-rutinoside, cyanidine-3-glucosylrutinoside, cyanidine-3-sophoroside, 5-carboxypyranocyanidine-3-(2-glucosylrutinoside), cyanidine-3-(2-xylosylrutinoside), pyranocyanidine-3-rutinoside, cyanidine-3-glucosyl-rutinoside, cyanidine-3-arabinosyl-rutinoside,	[10-22]
péonidine, péonidine-3-glucoside, péonidine-3-rutinoside, 5-carboxypyranopéonidine-3-rutinoside, péonidine-3-galactoside	[10, 12-14, 16, 18-20, 22]
pélargonidine, pélargonidine-3-rutinoside	[12-14, 19, 22]
pétunidine	[18]
delphinidine	[18]
malvidine	[18]





**Figure II.3. Composition de différentes variétés de cerises [9]**  
 A. Sucres ; B. Acides phénoliques ; C. Flavonoïdes ; D. Anthocyanines

La consommation journalière de cerises contribue à l'apport de **minéraux** tels que : K, Ca, Mg, Cr, Co, Fe, F, I, Cu, Mn, Ni, Se et Zn qui sont considérés comme essentiels pour l'organisme humain. Le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse jouent un rôle important dans le système biologique. Le cuivre intervient dans les processus d'oxydoréduction. Le chrome est impliqué dans le métabolisme du glucose et de divers lipides, mais dans des quantités excessives et selon son état d'oxydation (le Cr (VI) est beaucoup plus nocif que le Cr (III)) il peut contribuer au développement de certaines maladies telles que le cancer de poumon ou le cancer gastro-intestinal. L'existence de métaux tels le nickel, le plomb et le cadmium reflète une influence exogène due à la pollution de l'environnement. Ces métaux sont considérés comme toxiques même à l'état de traces. Leur accumulation peut endommager le cerveau, conduire à l'hypertension, l'anémie ou provoquer des maladies rénales [8].

Les résultats d'une analyse des éléments majeurs essentiels et non-essentiels de différentes variétés de cerises réalisée par Mitić *et al.* par spectroscopie d'émission atomique sont présentés dans les Tableaux II.2 et II.3.

**Tableau II.2. Eléments majeurs de différentes variétés de cerises [8]**

<i>Eléments</i>	<i>Variété de cerises</i>	<i>Concentration moyenne (mg / 100 g matière fraîche)</i>
Na	Oblacinska	11,31 ± 0,26
	Cigancica	12,45 ± 0,35
K	Oblacinska	156,96 ± 3,07
	Cigancica	98,53 ± 1,48
Ca	Oblacinska	9,14 ± 0,66
	Cigancica	9,16 ± 0,26
Mg	Oblacinska	7,62 ± 0,12
	Cigancica	7,93 ± 0,27

**Tableau II.3. Eléments essentiels et non-essentiels de différentes variétés de cerises [8]**

<i>Eléments</i>	<i>Variété de cerises</i>	<i>Concentration moyenne (µg / 100 g matière fraîche)</i>
Fe	Oblacinska	807,99 ± 3,52
	Cigancica	630,66 ± 4,28
Cu	Oblacinska	99,29 ± 1,23
	Cigancica	55,56 ± 4,20
Zn	Oblacinska	71,69 ± 1,20
	Cigancica	65,09 ± 2,63
Mn	Oblacinska	55,86 ± 1,82
	Cigancica	46,19 ± 1,28
Cr	Oblacinska	10,59 ± 0,32
	Cigancica	6,09 ± 0,09
Cd	Oblacinska	0,09 ± 0,01
	Cigancica	0,39 ± 0,02
Co	Oblacinska	1,43 ± 0,03
	Cigancica	6,96 ± 0,05
Pb	Oblacinska	3,46 ± 0,28
	Cigancica	7,19 ± 0,42
Ni	Oblacinska	6,06 ± 0,33
	Cigancica	6,06 ± 0,41

## II. 1. 2. Les résidus de pommes

### II. 1. 2. 1. Description botanique des pommes

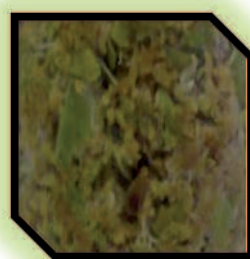


Figure II.4. Pommes et résidus de pommes Granny Smith

Ayant une origine inconnue, les pommes de consommation ont été décrites pour la première fois en 1803 par Borkhausen comme un hybride complexe dérivé de *Malus sylvestris* Mill, de *Malus pumila* et de *Malus praecox* Borkh. Elles sont cultivées sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique [23].

Du point de vue botanique les pommes peuvent être classées comme suit :

**Règne** : Plante

**Embranchement** : Spermatophytes (plantes à graine)

**Sous embranchement** : Angiospermes (plantes à fleurs)

**Classe** : Dicotylédones

**Sous classe** : Maloideae

**Ordre** : Rosales

**Famille** : Rosaceae

**Genre** : *Malus*

**Espèce** : *Malus x domestica* Borkh [1].

8 à 78 espèces de pommes (dérivées naturellement ou artificiellement) sont connues aujourd'hui et sont groupées selon différents critères tels que les caractéristiques morphologiques, les similarités de flavonoïdes, les inflorescences, les feuilles etc. [23].

### II. 1. 2. 2. Les résidus de pommes

Une des principales sources d'obtention de résidus de pommes est liée au processus de récupération du jus à partir des fruits frais. Le schéma de ce processus est présenté dans la Figure II.5. Brièvement, après un premier contrôle qualité, les pommes sont stockées dans une chambre froide jusqu'au moment de l'utilisation. Elles sont ensuite lavées à l'eau et brossées afin d'enlever les impuretés (feuilles, particules de terre, traces de pesticides) et soumises à l'opération de pressage. Cette opération est influencée par le contenu en eau des pommes, leur taille, l'épaisseur de la couche de pommes pressées, la variation de la pression au cours du temps etc. Le jus brut de pommes obtenu présente une viscosité élevée et contient une importante quantité de particules en suspension qui sont laissées à sédimenter lentement. Le sédiment est séparé et le jus clair est pasteurisé afin de détruire les formes végétatives de

microorganismes pathogènes et d'assurer la stabilité biologique du produit. Le jus de pommes pasteurisé est emballé dans des récipients en verre et laissé refroidir.

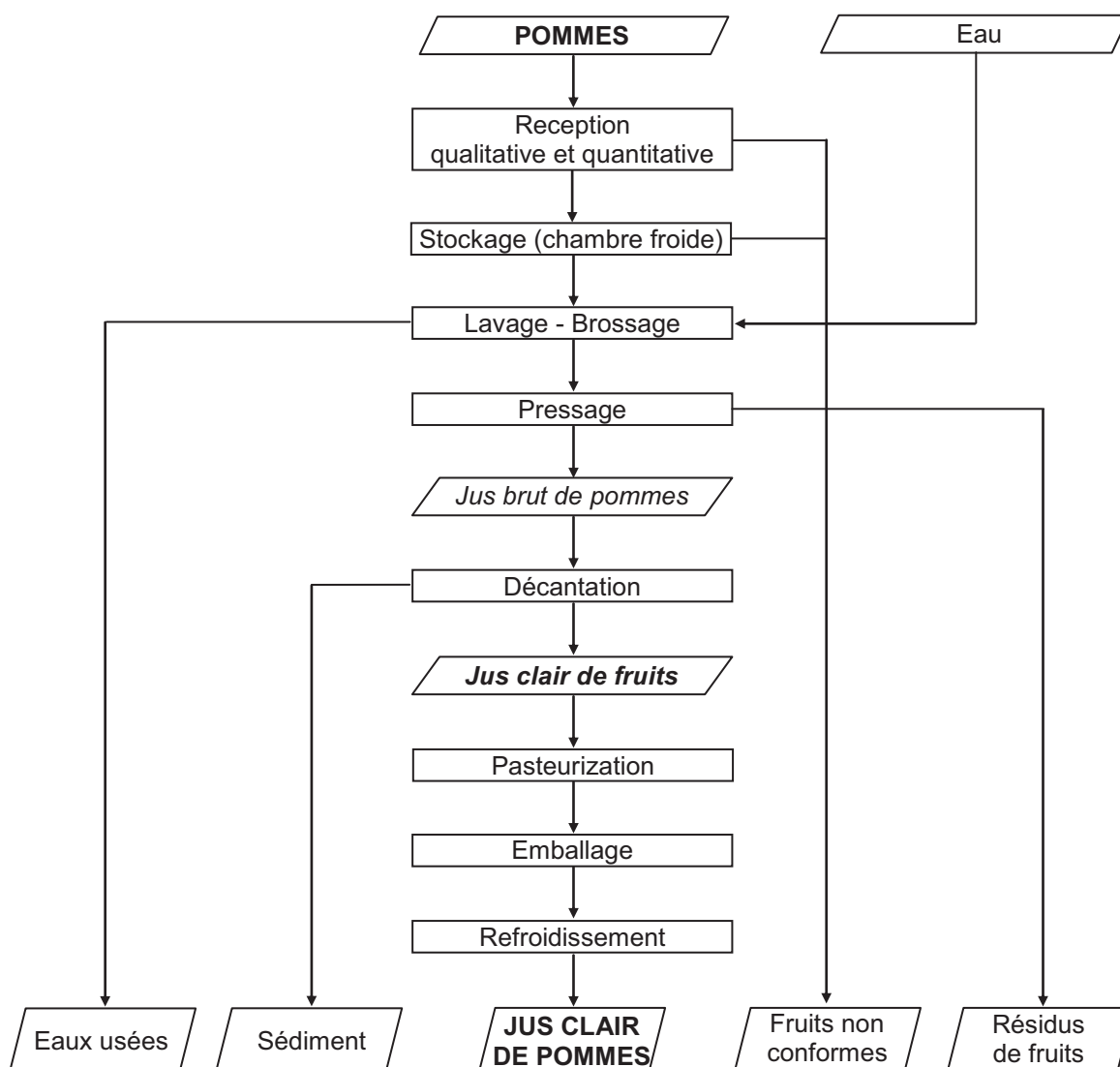


Figure II.5. Schéma technologique d'obtention de jus clair de pommes

Le processus de pressage des pommes en vue de l'obtention de jus clair conduit à des quantités importantes de résidus (environ 30% du fruit de départ) constitués de peaux, de pulpe, de queux et de graines.

### II. 1. 2. 3. Composition des pommes et des résidus de pommes

La composition chimique de pommes est affectée par différents facteurs tels que la variété, la maturité, la saison de la récolte, la région géographique etc.

Les pommes et leurs résidus sont riches en **fibres diététiques** [24] **protéines**, **vitamines** (C, B1, B2, B3, B6, B9) et **minéraux** (Ca, Mg, Na, K, P, S, Fe, Zn) [25-26]. Elles contiennent également des quantités importantes des **sucres**.

Queji et ses collaborateurs [27] ont étudié le contenu en sucres de résidus de 26 types de pommes commerciales et expérimentales. Les valeurs obtenues pour une partie de ces variétés sont présentées dans le Tableau II.4.

**Tableau II.4. Teneurs en fructose, glucose et saccharose présents dans les résidus de différentes variétés de pommes [27]**

<i>Variété de pommes</i>	<i>Fructose</i> (% masse / masse)	<i>Glucose</i> (% masse / masse)	<i>Saccharose</i> (% masse / masse)
Caricia	19,1 ± 1,1	2,50 ± 0,20	21,0 ± 0,8
Daiane	22,1 ± 0,9	5,80 ± 0,20	23,0 ± 1,6
Granny Smith	21,0 ± 0,6	10,3 ± 0,20	5,50 ± 0,4
Condessa	27,2 ± 2,6	3,90 ± 0,06	22,2 ± 0,8
Imperatriz	24,5 ± 0,3	4,80 ± 0,10	17,9 ± 0,9
Joaquina	25,1 ± 0,9	8,60 ± 0,03	14,0 ± 0,7
Eva	20,8 ± 0,2	3,20 ± 0,09	13,0 ± 0,3
Fuji	31,0 ± 0,4	12,4 ± 0,20	5,40 ± 0,5
Gala	28,6 ± 0,4	9,70 ± 0,20	11,7 ± 1,0
Golden	28,3 ± 0,4	9,00 ± 0,06	5,30 ± 0,1
Star Red	22,6 ± 0,6	10,0 ± 0,20	3,40 ± 0,4
Catarina	19,7 ± 0,8	5,40 ± 0,30	20,3 ± 0,6

Un autre type de composés se trouvant dans les pommes est représenté par les composés phénoliques. Une grande partie de ces composés est localisée dans le parenchyme (Tableau II.5) et passe dans les résidus au cours du processus de pressage de pommes.

Parmi les composés phénoliques de pommes et de leurs résidus nous pouvons citer :

- **les acides phénoliques** : acide chlorogénique, acide *p*-coumaroylquinique, acide *p*-coumarique, acide férulique, acide caféique ;
- **les flavonoïdes** : rutine, hypéroside, isoquercitrine, avicularine, quercitrine, cyanidine 3-galactoside, cyanidine 3-rutinoside, malvidine-3-glucoside et malvidine-3,5-diglucoside, phloridzine, phlorétine, catéchine, épicatechine, procyanidines etc.

Une étude sur le contenu total en différents types de composés phénoliques a été réalisée par Shahidi *et al.* [28]. Les valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau II.5.

**Tableau II.5. Composés phénoliques de différentes variétés de pommes [28]**

<i>Variété de pommes</i>	<i>Composés phénoliques totaux</i>	<i>Catéchines</i>	<i>Procyanidines</i>	<i>Dihydrochalcones</i>
		(équivalents de (-) épicatechine)	(équivalents de (-) épicatechine)	(équivalents de phloridzine)
<i>(mg.kg<sup>-1</sup> produit frais)</i>				
Golden	1280	102	761	26
Delicious	1100	106	515	26
Judor	1740	Traces	1066	38
Guillevic	2220	177	1372	28
Petit Jaune	2500	241	1254	51
Binet Rouge	2250	154	1551	122
Juliana	2400	351	1144	40
Clozette	2560	Traces	1528	80
Avrolles	3130	418	1902	39
Dous Moen	3350	466	1796	55
Antoinette	3210	627	2417	42
Bedan	6000	1464	4731	82

D'autres études [29-31] ont été axées sur l'analyse quantitative de composés phénoliques dans différentes variétés de pommes et de leurs résidus.

Par exemple Escarpa *et al.* [32] ont comparé les temps de rétention et les spectres UV de standards avec ceux de composés extraits à partir de peaux et de la pulpe de différentes variétés de pommes. Leurs résultats indiquent des niveaux appréciables de catéchines et de flavonols glycosylés et révèlent certaines différences entre le contenu en composés

phénoliques de la pulpe de pommes et celui de la peau, la dernière pouvant être considérée plus riche. L'acide chlorogénique a été trouvé comme un des composés majoritaires dans toutes les variétés de pommes étudiées à l'exception de la variété Granny Smith. Du point de vue quantitatif des différences significatives ont été observées. Ainsi une quantité importante de composés phénoliques a été notée pour la variété Reineta alors que la variété Golden Delicious ne contient que des faibles quantités. Le contenu détaillé est présenté dans les Tableau II.6 et II.7 [32].

**Tableau II.6. Composés phénoliques de la peau de différentes variétés de pommes [32]**

<i>Composé</i>	<i>Contenu (mg.kg<sup>-1</sup> échantillon frais)</i>			
	<i>Golden</i>	<i>Reineta</i>	<i>Red</i>	<i>Granny</i>
Acide chlorogénique	17 – 37	100 – 400	113 – 157	6 – 60
Acide caféique	ND	8 – 38	ND	10 – 14
(+)-Catéchine	66 – 164	229 – 460	297 – 445	374 – 486
(-)-Epicatechine	82 – 168	238 – 439	248 – 481	246 – 312
Rutine	136 – 237	327 – 671	136 – 504	390 – 414
Phloridzine	31 – 71	83 – 418	104 – 159	12
Anthocyanidine*	ND	ND	585 – 1037	ND
Procyanidine B1*	32 – 53	103 – 242	127 – 172	173 – 241
Procyanidine B2*	69 – 166	388 – 581	433 – 659	558 – 574
Procyanidine B3*	25 – 66	125 – 158	11 – 14	70 – 124

\*quantifiée en quantité équivalente de catéchine

ND – non-déterminé

**Tableau II.7. Composés phénoliques de la pulpe de différentes variétés de pommes [32]**

<i>Composé</i>	<i>Contenu (mg.kg<sup>-1</sup> échantillon frais)</i>			
	<i>Golden</i>	<i>Reineta</i>	<i>Red</i>	<i>Granny</i>
Acide chlorogénique	29 – 57	266 – 357	63 – 106	28 – 71
Acide caféique	6 – 9	9 – 11	2	4 – 5
(+)-Catéchine	28 – 49	113 – 136	44 – 70	136 – 182
(-)-Epicatechine	19 – 34	91 – 111	36 – 59	71 – 97
Phloridzine	4 – 8	16 – 20	13 – 14	5
Dérivé de phlorétine	5 – 8	19 – 21	2 – 4	7
Procyanidine B1*	10 – 11	57 – 67	11 – 21	62 – 84
Procyanidine B2*	23 – 32	82 – 94	34 – 54	97 – 105
Procyanidine B3*	21 – 27	33 – 41	20 – 28	61 – 100

\*quantifiée comme catéchine

Un autre groupe de composés, moins étudié que celui des composés phénoliques, se trouvant dans les pommes et les résidus obtenus après leur pressage est représenté par la famille des **composés triterpéniques**. Parmi ceux-ci, l'acide ursolique est le plus abondant mais d'autres molécules apparentées sont référencées aussi.

Ma et ses collaborateurs [33] ont analysé l'extrait à l'acétate d'éthyle de peau de pommes. Leurs recherches indiquent la présence de plusieurs composés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide 2 $\alpha$ -hydroxyursolique, l'acide euscaphique, l'uvanolo, l'acide 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-urs-12-en-28-oic, l'acide 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-oléan-12-en-28-oic. En revanche, Frighetto *et al.* [34] qui ont étudié la possibilité d'isoler les composés triterpéniques de peau de pommes Fuji, Gala, Smith et Granny Smith par chromatographie à contre courant n'ont pas détecté d'autres composés triterpéniques à part l'acide ursolique.

La peau des pommes Red Delicious a été analysée par He et Liu [35]. Parmi les composés triterpéniques identifiés dans les extraits nous pouvons citer les alcools tels que : oléan-12-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol,  $\beta$ -amyrine, oléan-12-en-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -triol, urs-12-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol, urs-12-ene-3 $\beta$ -ol, urs-12-ene-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,28-triol, urs-12-en-28-ol et les acides 3 $\beta$ -trans-p-coumaroyloxy-

2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,13 $\beta$ -trihydroxy-urs-11-en-28-oic et 3 $\beta$ -cis-p-coumaroyloxy-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,13 $\beta$ -trihydroxy-urs-11-en-28-oic.

D'autres composés triterpéniques ont été séparés par chromatographie sur colonne de silice puis quantifiés à partir de la variété de pommes italiennes Annurca D'Abrosca *et al.* [36]. Cette variété a fait aussi l'objet de l'étude quantitative réalisée par Cefarelli *et al.* [37] dont les résultats sont reportés dans le Tableau II.8.

**Tableau II.8. Analyse quantitative de composés triterpéniques de pommes Annurca [37]**

<i>Composé</i>	<i>Quantité déterminée (mg.kg<sup>-1</sup> produit frais)</i>
Aldéhyde bétulinique	0,004
Acide bétulinique	0,004
Aldéhyde oléanique	0,006
Acide oléanique	0,029
Ursanaldéhyde	0,010
Acide ursolique	1,171
Acide pomolique	0,012
Uvaol	0,025
Acétate d'uvaol	0,006
Acide annurcoïque	0,008
Acide annurconique	0,006
Acide 2-oxopomolique	0,004

L'étude bibliographique concernant les deux sources végétales de composés bioactifs choisies pour être analysées au cours de nos travaux de recherches nous a permis de constater que tant les cerises que les résidus de pommes contiennent des quantités variées de différentes molécules susceptibles d'avoir des effets bénéfiques pour l'organisme humain.

Ainsi, nous avons pu remarquer que les cerises sont riches surtout en composés phénoliques tels que les anthocyanines ou les acides phénoliques possédant une forte activité antioxydante. Ce type de composés se trouve également dans les pommes et dans les résidus obtenus lors de la valorisation des pommes en vue de la fabrication du jus clair. De plus, les résidus de pommes contiennent également des composés faisant partie de la classe de triterpènes et ayant entre autres des propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et antipaludiques.

En retenant ces aspects, nous allons discuter par la suite les différentes étapes nécessaires à la récupération des principes actifs à partir des sources d'origine végétale. Ces étapes ont été schématisées dans la Figure II.1 au début de ce chapitre.

## II. 2. TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL

La préparation du matériel végétal présente une importance majeure pour la récupération, l'analyse et la purification des composés bioactifs qu'il contient.

Vu la grande variété de composés bioactifs se trouvant autant dans les fruits que dans les résidus issus de leurs valorisation, un prétraitement adapté à leurs différentes caractéristiques (concentration, solubilisation, complexité de la matrice etc.) doit être choisi.

Le plus souvent le prétraitement du matériel végétal a, avant tout, comme but, de préserver et conserver les échantillons. Plusieurs techniques consistent à réduire l'eau contenue dans le végétal afin d'inhiber le développement des microorganismes et de limiter les activités enzymatiques. Ainsi, nous pouvons citer le changement de l'état de l'eau présente (congélation) ou la diminution de la quantité d'eau à chaud (déshydratation) ou à froid (lyophilisation).

### II. 2. 1. Congélation

La congélation est la technique la plus couramment utilisée pour la préservation du matériel végétal. Elle consiste à abaisser la température de ce matériel et de la maintenir en dessous de la température de fusion de la glace afin de supprimer l'activité des microorganismes.

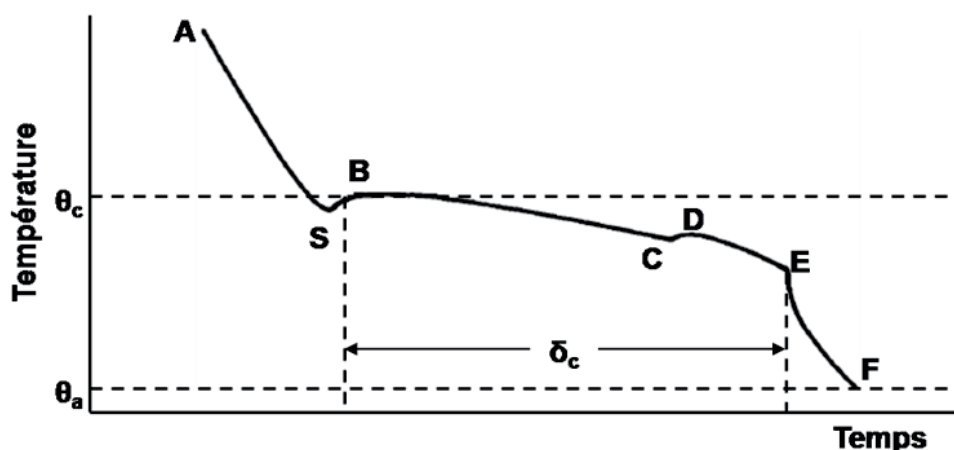


Figure II.6. Les étapes de congélation d'un produit végétal [38]

La variation de température à l'intérieur du produit est un indicateur pour la finalisation du processus (Figure II.6). Au début (AS) le produit est refroidi en dessous de son point de congélation ( $\theta_c$ ). Au moment de l'apparition des cristaux la température augmente rapidement jusqu'au point de congélation du produit (SB). La chaleur latente est libérée et le point de congélation descend (BC) à cause de l'augmentation de la concentration des solutés dans le liquide non congelé qui conduit à une légère baisse de la température du produit. Les solutés sursaturés commencent à cristalliser en libérant la chaleur latente de cristallisation, la température du produit augmente jusqu'à la température eutectique des solutés (CD) et ensuite elle diminue pendant que la cristallisation de l'eau et des solutés continue (DE) jusqu'à atteindre la température  $\theta_a$  du congélateur (EF). La durée totale nécessaire ( $\tau_c$ ) pour la congélation et pour la libération de la chaleur est connue comme plateau de congélation. En fonction de la nature du matériel végétal, de sa composition et de la température de stockage une proportion variable d'eau contenue dans le matériel végétal reste toujours non congelée [38].



Le processus de congélation doit être mené de telle façon que le produit traverse le plus rapidement possible la phase de cristallisation maximale de l'eau (comprise entre -1 et -5°C). 60 - 75% de l'eau du produit se solidifie lors de cette phase. Le processus de refroidissement doit continuer jusqu'à une température finale de -18...-25°C capable d'assurer la congélation de 90 - 95% de l'eau [38]. En effet, deux types de congélation peuvent être réalisés : soit une congélation lente, soit une congélation rapide.

Dans le cas de la congélation lente la cristallisation intercellulaire est prédominante ; les cristaux de glace ont des dimensions importantes et des formes irrégulières ce qui conduit à l'apparition de tensions locales responsables des modifications de la structure des tissus par déformations et perforations des parois cellulaires. A cause de la différence de pression osmotique créée, l'eau et les solutés concentrés à l'intérieur des cellules migrent vers l'extérieur dans l'espace intercellulaire. L'effet de plasmolyse a comme résultat la déshydratation des cellules d'un côté et l'accumulation de la glace dans les espaces intercellulaires d'un autre côté.

Lors de la congélation rapide la cristallisation de l'eau a lieu au niveau intracellulaire ce qui assure la formation d'un réseau microcristallin uniforme, repartit dans les espaces intercellulaires et intracellulaires. Les tensions locales sont plus faibles, les différences de pression osmotique sont beaucoup moins importantes et les modifications structurales ont une influence réduite sur les tissus cellulaires [39].

Par conséquent, il est plus indiqué de congeler le matériel végétal en utilisant des vitesses de congélation importantes afin d'obtenir une cristallisation rapide de l'eau ce qui permet de mieux préserver et conserver le contenu en principes actifs.

## **II. 2. 2. Déshydratation**

### **II. 2. 2. 1. Lyophilisation**

Utilisée pour la première fois en 1950, la lyophilisation comporte une étape de congélation du matériel végétal et une étape de sublimation de l'eau.

Pour le bon déroulement du processus de lyophilisation le matériel végétal congelé est placé dans une enceinte étanche afin d'assurer (sous un apport contrôlé de chaleur et à une pression assez basse) une vitesse élevée d'élimination de la vapeur d'eau. La vitesse de déroulement du séchage et par conséquent, le rendement et la rentabilité du processus, dépendent de la vitesse avec laquelle la chaleur pénètre le produit et de la mesure avec laquelle l'humidité peut être éliminée du produit exclusivement par sublimation. La chaleur en excès peut déterminer la fonte partielle ou totale de la glace et entraîner ainsi la cuisson sous vide.

Le processus de lyophilisation implique divers phénomènes complexes et inter conditionnés tels que la transformation de phase (solide – vapeur), la migration de la vapeur du produit vers l'extérieur, les transferts de chaleur. Une fois que le front de sublimation migre vers l'intérieur du produit, la longueur du trajet qui doit être parcouru par la vapeur d'eau augmente, une partie de ce trajet se réalisant à travers les pores de petite dimension du produit.

A la fin de la période de sublimation, le produit contient encore 10 – 30 % d'eau à l'état liquide. Le séchage continue afin de réduire l'humidité résiduelle jusqu'à une valeur maximale admissible dépendant de la composition chimique du produit. Ce paramètre doit être déterminé en fonction du matériel végétal sachant que certains composés peuvent être plus stables dans un milieu aqueux.

L'apport de chaleur pendant la dernière étape du processus de séchage conduit au chauffage du produit et à l'augmentation de sa température au-delà du point de congélation. Afin d'éviter les possibles dégradations physiques (carbonisation, caramélisation) ou chimiques (pertes de vitamines, la précipitation de protéines) il est nécessaire de réduire à la fois l'apport de chaleur et la température de la source de chauffage [40].

### II. 2. 2. 2. Zéodratation

La zéodratation est une technique de déshydratation mise au point dans les années 1990. Cette technique permet de s'affranchir de l'opération de refroidissement associée à la lyophilisation (fortement consommatrice d'énergie) en utilisant des zéolites.

Le terme « zéolite » (ou zéolithe) (Figure II.7) vient du grec et signifie « pierre qui bout ». Les zéolithes sont des aluminosilicates fréquemment présents dans la nature sous différentes formes cristallographiques. Ils possèdent des structures tridimensionnelles formées par l'arrangement de tétraèdres  $\text{SiO}_4^{4-}$  et  $\text{AlO}_4^{5-}$  liés par des atomes d'oxygène pontants [41].

À l'état naturel, environ 40 types de zéolites sont répertoriés dont la formation est due à des altérations alcalines de matériaux réactifs, en général d'origine volcanique (tuff, verres, argiles). A partir de 1940 plus de 120 types de zéolites différents ont été synthétisés en laboratoire.

Une des caractéristiques principales de ces solides réside dans le développement de pores de taille régulière dans le domaine microporeux ( $< 2 \text{ nm}$ ), contenant de l'eau adsorbée ainsi que des cations compensateurs. L'eau est facilement perdue par chauffage et ré-adsorbée par mise en contact avec une atmosphère humide. Les cations compensateurs ont pour origine la présence de charges électriques dans le réseau cristallin ; ces charges proviennent de la substitution d'une partie du silicium ( $4+$ ) par de l'aluminium ( $3+$ ) sans qu'il soit possible, pour des raisons de répulsion électrostatique

(règle de Loewenstein<sup>1</sup>), d'obtenir un rapport Si/Al inférieur à 1. Ces cations possèdent un degré de mobilité important qui donne naissance à des propriétés d'échange en phase liquide.

Ayant une faible densité, les zéolites se caractérisent par une stabilité cristalline à l'état déshydraté. Ils détiennent des propriétés catalytiques et présentent une capacité d'adsorption de gaz et de vapeurs [41].

Associée aux techniques de déshydratation par le froid, au même titre que la lyophilisation, la zéodratation est basée sur l'utilisation couplée de l'évaporation sous vide (avec apport modéré d'énergie thermique) avec l'utilisation de zéolites dont les pores de petite taille, adsorbent la vapeur d'eau émise par le produit lors de l'évaporation ou de la sublimation. Par conséquent, contrairement à la lyophilisation, la zéodratation ne nécessite pas de système de réfrigération pour capter la vapeur d'eau émise par le produit, puisque les vapeurs d'eau sont captées par les zéolithes.

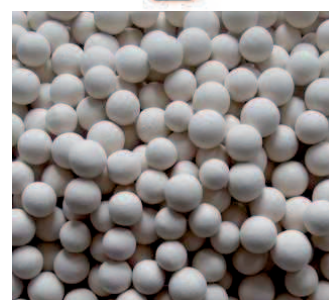
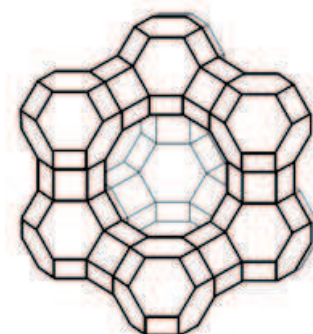
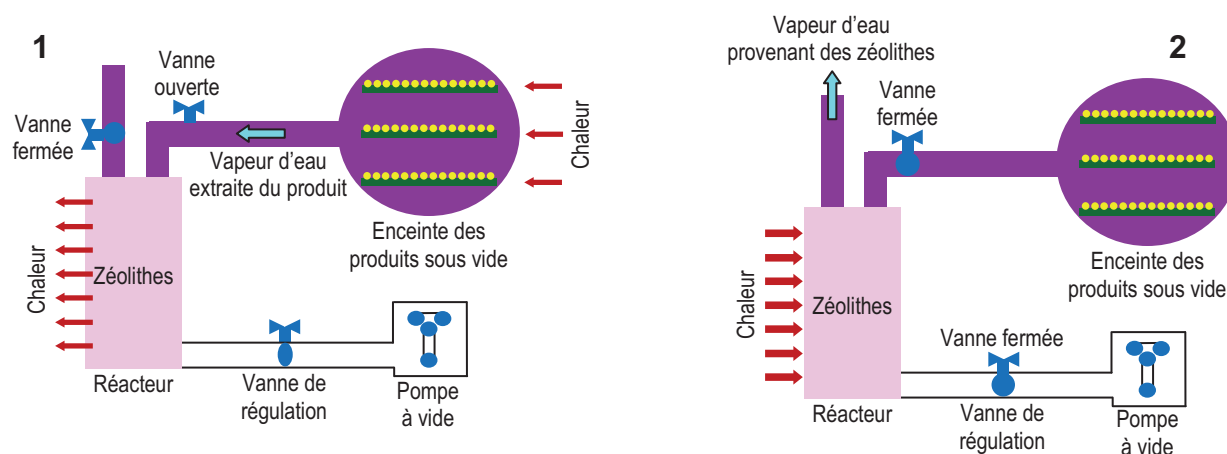


Figure II.7. Zéolithes de type X

<sup>1</sup> Règle de Loewenstein : deux atomes d'aluminium ne peuvent pas être connectés par un atome d'oxygène

Un cycle de zéodratation comporte généralement 2 phases (Figure II.8):

1. **L'adsorption** dont le mécanisme repose sur la surface fortement polaire des pores des zéolithes (les liaisons sont par conséquent de très faible énergie). Ainsi le produit à déshydrater est placé sur des plateaux dans une enceinte (cuve, baratte, tunnel), de manière à obtenir le rapport surface/volume le plus important possible, afin de réduire les gradients d'humidité dans la masse du produit. Ensuite les plateaux sont placés sur les radiants qui apportent l'énergie nécessaire à l'évaporation ou à la sublimation et l'enceinte est mise sous vide pouvant atteindre des pressions inférieures à 100 Pa. Une fois que l'humidité résiduelle souhaitée est atteinte, la déshydratation est terminée. Le vide est alors réduit et le produit est retiré de l'enceinte.
2. **La régénération de la zéolithe**, lors de laquelle celle-ci est chauffée à température élevée (250 à 300°C) permet la désorption des molécules d'eau adsorbées sur les zéolithes par changement d'état (passage à l'état gaz). Cette vapeur d'eau est ensuite condensée par refroidissement puis évacuée. La capacité de désorption des zéolithes influe sur le nombre de répétitions de cycles de déshydratation [42].



**Figure II.8. Etapes du processus de zéodratation [42]**  
 1. L'adsorption de l'eau ; 2. La régénération de zéolithes

La société française ZéoDry+Plus [43] indique les avantages de la zéodratation en marquant plusieurs aspects. Ainsi, d'un point de vue qualitatif, cette technique est capable d'assurer la préservation de la structure, des couleurs, des arômes et des principes actifs du produit. Economiquement, elle nécessite une consommation d'énergie inférieure à celle des autres procédés de séchage. La rapidité du cycle de séchage (environ 12 heures) contribue au retour sur investissement sur une courte période. L'absence de fluides frigorigènes (fréon ou CFC) et les rejets limités à la vapeur d'eau font que ce procédé est considéré écologique et son utilisation appropriée dans le cadre du développement durable.

## II. 3. EXTRACTION DE COMPOSES BIOACTIFS

Après un prétraitement adéquat le produit végétal peut être utilisé comme matière première pour l'obtention de principes actifs.

A cause de son utilisation facile et de son efficacité relativement élevée, l'extraction solide-liquide reste la technique la plus répandue pour la récupération et l'isolement des composés bioactifs.

Réalisée à l'aide d'un solvant, l'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière, qui se réalise principalement par diffusion moléculaire et par diffusion par convection.

L'extraction solide-liquide est régie par la première loi de Fick (équations 1 et 2) conformément à laquelle la quantité de substance qui diffuse par unité de temps est proportionnelle au gradient de concentration, à la direction et au sens de la diffusion [44].

$$\frac{dM}{d\tau} = -DA \frac{dC}{dx} \quad (\text{II.1.})$$

$$\frac{dM}{A \cdot d\tau} = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{II.2.}) \quad \text{où:}$$

M – quantité de substance extraite, kg

$\tau$  – durée de l'extraction, s

D – coefficient de diffusion, m<sup>2</sup>/s

A – aire de la surface par laquelle se réalise l'extraction, m<sup>2</sup>

$\frac{dM}{A \cdot d\tau}$  – vitesse d'extraction, kg/(m<sup>2</sup>·s)

$\frac{dC}{dx}$  – gradient de concentration

dC – différence de concentration à la limite de la couche solide

dx – épaisseur de la couche de diffusion.

Le coefficient de diffusion moléculaire est une caractéristique physique de la substance et il est déterminant pour la capacité de transfert de cette substance dans un milieu quelconque. Il représente la quantité de substance diffusée par unité de temps, par unité de surface dans les conditions d'existence d'un gradient de concentration égal à l'unité. Cette grandeur est inversement proportionnelle au rayon de la particule diffusante et directement proportionnelle à la température de diffusion [45].

L'extraction solide-liquide de principes actifs de matériel végétal implique le transfert d'un ou de plusieurs solutés du solide vers un solvant tel que l'eau, l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme, l'hexane, l'heptane, pur ou en mélange. Le plus souvent la nature de solutés récupérés est inconnue et la totalité de solutés constitue ce qu'on appelle « un extrait » [46].

Pendant l'extraction, la concentration des solutés à l'intérieur du matériel végétal varie conduisant à des conditions non stationnaires ou instables. Toute une série d'étapes phénoménologiques (Figure II.9) se déroule pendant la période d'interaction du produit contenant les particules d'intérêt avec le solvant qui réalise l'extraction.

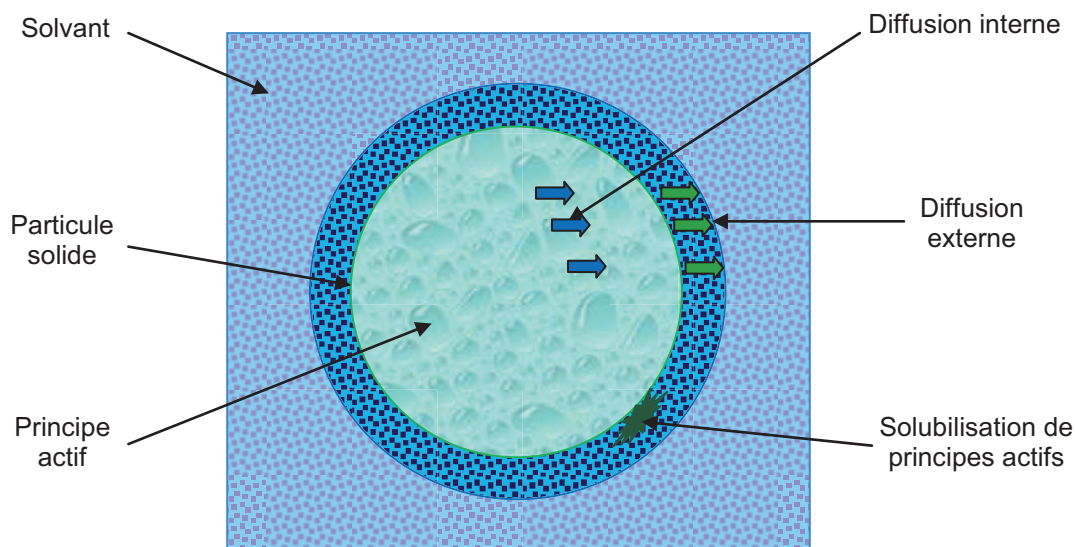


Figure II.9. Etapes de l'extraction solide-liquide

Ces étapes incluent :

- la pénétration du solvant dans la matrice végétale solide ;
- la solubilisation et / ou la décomposition de constituants ;
- le transport des solutés vers l'extérieur de la matrice solide ;
- la migration des solutés extraits de la surface externe de la matrice solide vers le solvant ;
- le déplacement des solutés par rapport à la matrice solide ;
- la séparation de solutés de la matrice solide [47].

Comme résultats de ces phénomènes, l'extraction peut être exprimée en termes de masse de solutés dissous par unité de temps, ou plus communément, comme un échange de la concentration en solutés du solide par unité de temps. Vu que les étapes élémentaires mentionnées précédemment ont des durées différentes, la durée totale du processus d'extraction est déterminée par l'étape la plus lente ou par l'étape qui contrôle le processus.

L'extraction solide-liquide est influencée par différents facteurs dont un des plus importants est lié au matériel végétal.

Les matrices végétales ont une structure complexe formée par des cellules, des espaces intercellulaires, capillaires et pores. Les principes actifs peuvent être présents à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules végétales. Dans le premier cas, les parois cellulaires intactes et les membranes adhérentes constituent une résistance majeure à la diffusion. Elles affectent la perméabilité de solutés : les petites molécules passent avec une vitesse plus élevée que celles ayant des dimensions plus importantes conduisant à un transfert sélectif. La perméabilité des parois cellulaires et des membranes est élevée et la sélectivité diminuée par la dénaturation induite par la chaleur. De plus, les parois cellulaires formant la majorité de tissus de soutenance et certaines cellules de gestion sont lignifiées et réduisent le passage de principes actifs. Pour une meilleure extraction la matrice végétale est broyée sachant qu'au moins théoriquement la durée d'extraction varie inversement avec le carré de la dimension du solide. Une fois que la taille de particules diminue les ruptures extérieures de cellules constituent une proportion plus importante du volume total du solide et les caractéristiques de l'extraction par unité de masse changent [47].

### II. 3. 1. Macération (M)

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction etc. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint [48].

### II. 3. 2. Extraction par solvant pressurisé (ASE)

L'extraction par solvant pressurisé est utilisée pour l'extraction de différents composés bioactifs de différents matériels végétaux tels que les caroténoïdes des aliments [49] ou les antioxydants de micro algues [50].

Cette technique utilise les mêmes solvants que la macération mais à des pressions élevées (100 – 140 atm) ce qui permet de maintenir le solvant à l'état liquide à des températures supérieures à son point d'ébullition (50 – 200°C). Dans ces conditions, le solvant présente des propriétés favorisant le processus d'extraction telles qu'une viscosité réduite, des coefficients de diffusion élevés conduisant à de bonnes cinétiques de dissolution et favorisant la désorption de solutés de la matrice végétale [51].

La Figure II.10 illustre un système d'extraction par solvant pressurisé.

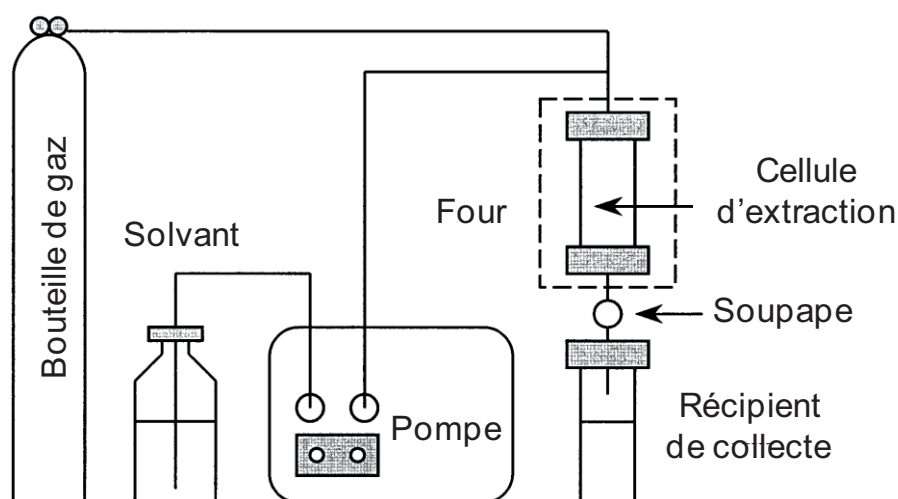


Figure II.10. Schéma d'un système d'extraction par solvant pressurisé [52]

L'échantillon solide est introduit dans une cellule d'extraction en acier qui est ensuite placée dans un four et remplie avec le solvant d'extraction. Afin d'éviter la surpression, une valve statique s'ouvre et se ferme automatiquement si la pression dépasse la limite pré établie. Le solvant qui s'échappe est collecté dans un récipient. Les cycles d'extraction statique peuvent être répétés plusieurs fois afin d'optimiser l'extraction et sont suivis par un rinçage au solvant frais afin de nettoyer la cellule. Tout l'extrait est purgé avec du gaz comprimé, en général azote, dans le récipient de collecte [53-54]. En fonction de sa concentration l'extrait

peut être soumis à l'analyse soit directement, soit après une concentration des solutés par différentes méthodes telles que l'évaporation sous vide.

Richter *et al.* [53] indiquent deux principales raisons pour justifier l'amélioration de l'extraction par utilisation de solvants pressurisés par rapport aux autres techniques existantes:

1. l'effet de la solubilité et du transfert de matière :
  - l'utilisation de températures élevées augmente la capacité des solvants à solubiliser les solutés ;
  - l'augmentation de la température d'extraction conduit à des taux de diffusion plus importants ;
  - l'apport de solvant frais augmente le gradient de concentration entre la solution de la cellule d'extraction et la surface de la matrice végétale en améliorant le transfert de matière et le rendement d'extraction ;
2. les perturbations des équilibres de surface :
  - dues à l'effet de la température :
    - les températures élevées peuvent détruire les fortes interactions (liaisons van der Waals, liaisons hydrogène, attractions dipôle-dipôle) existant entre les solutés et la matrice ;
    - les températures élevées diminuent la viscosité du solvant (lui permettant une meilleure pénétration dans les cellules de la matrice végétale) et diminuent la tension de surface du solvant, des solutés et de la matrice en assurant un meilleur contact de solutés avec le solvant ;
  - dues à l'effet de la pression :
    - si les pressions utilisées sont assez importantes le solvant peut atteindre des températures supérieures à la température d'ébullition ;
    - à cause de la pression, le solvant pénètre plus facilement la matrice végétale en assurant le contact avec des solutés qui dans des conditions atmosphériques ne peuvent pas être contactés ;
    - le solvant pressurisé assure un contact plus rapide avec les solutés.

### II. 3. 3. Extraction assistée par ultrasons (USAE)

Un autre mode d'extraction de solutés à partir de différentes matrices végétales [55-61] dans un temps court est l'extraction assistée par ultrasons.

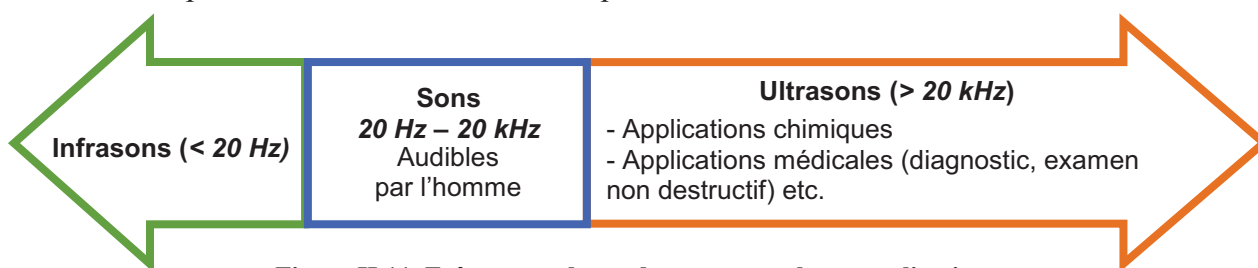
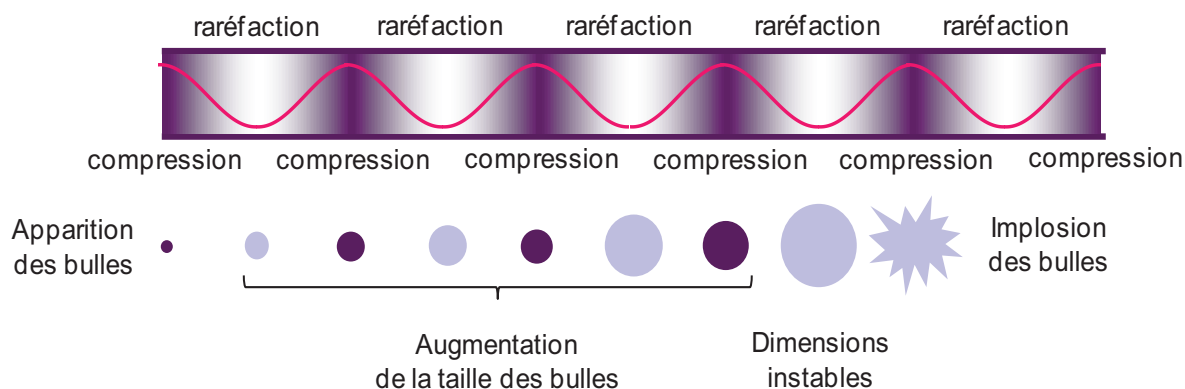


Figure II.11. Fréquences des ondes sonores et leurs applications

Les ultrasons sont des ondes mécaniques ayant une fréquence supérieure à celle audible par les êtres humains (Figure II.11) ce qui peut assurer une meilleure pénétration du solvant dans le matériel végétal et améliorer le transfert de matière.

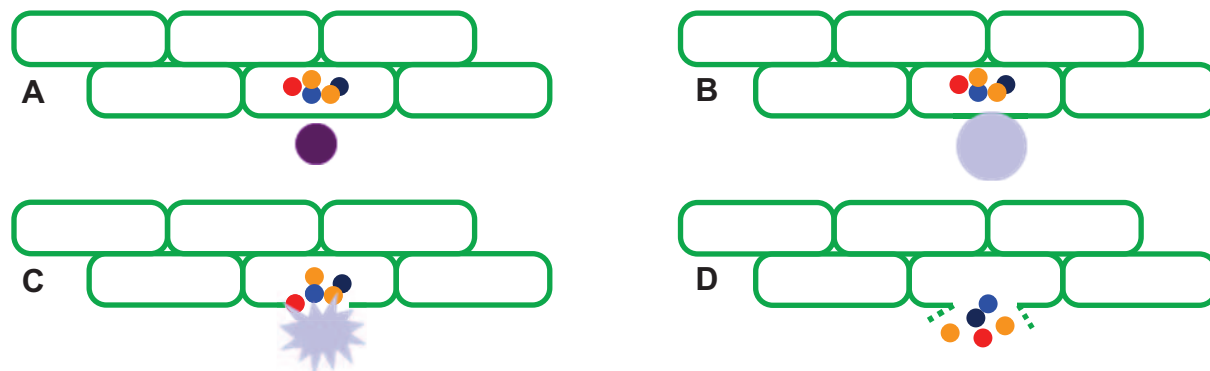
L'effet des ultrasons sur un fluide est dû à l'action de la pression acoustique et hydrostatique sur le milieu. A basse intensité, la pression acoustique induit un mouvement à l'intérieur du fluide. Pendant la phase d'expansion d'un cycle, à des intensités élevées, la pression locale diminue sous la pression de vapeur de liquide causant l'augmentation de

bulles créées à partir de noyaux gazeux existant dans le fluide (Figure II.12). Cette augmentation génère des pressions de transition négatives et produit de nouvelles cavités par l'effet de tension sur le fluide. Au moment de la dimension critique les bulles implosent pendant le cycle de compression. Ce processus de compression-raréfaction des molécules du milieu et le collapse de bulles est appelé « cavitation » [62-64].



**Figure II.12. Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons [65]**

Les cavitations peuvent être générées proche de la surface du matériel végétal (Figure II.13A). Au cours du cycle de compression les bulles explosent (Figure II.13B) et un micro jet dirigé vers le matériel végétal est créé (Figure II.13B et C). La pression locale élevée (1000 atm) et la température élevée (5000 K) impliquées dans ce processus peuvent détruire les parois de cellules de la matrice végétale et leur contenu peut être libéré dans le milieu environnant (Figure II.13D).



**Figure II.13. Explosion de bulles de cavitation et libération du matériel végétal [26]**

*A. génération de bulles de cavitation; B. explosion de bulles; C. création de micro jet; D. libération de solutés*



## II. 3. 4. Extraction assistée par microondes (MWAE)

Découvertes mathématiquement par Maxwell et vérifiées expérimentalement par Hertz les microondes sont des radiations électromagnétiques de haute fréquence allant de 300 MHz à 300 GHz avec des longueurs d'onde entre 1 m et 1 mm [66] constituées d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaires (Figure II.14).

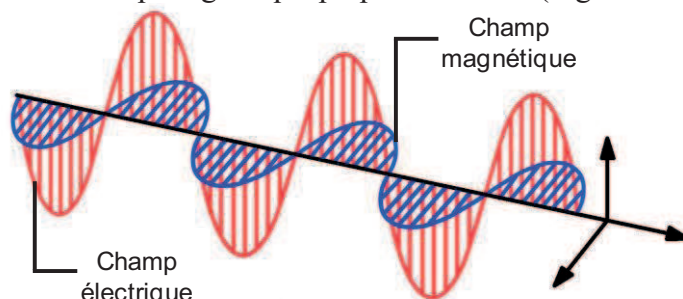


Figure II.14. Représentation graphique d'un champ électromagnétique

La capacité d'un solvant à absorber l'énergie microondes et de la transmettre sous forme de chaleur vers les molécules environnantes dépend partiellement du facteur de dissipation ( $\tan \delta$ ) représenté par l'équation :

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (\text{II.3.}) \quad [66] \quad \text{où}$$

$\varepsilon''$  – perte diélectrique (mesure de la conversion de l'énergie microondes en chaleur)

$\varepsilon'$  – constante diélectrique (mesure de la polarisabilité d'une molécule sous l'action d'un champ électrique).

Les molécules polaires et les solutions ioniques absorbent très bien l'énergie microondes dû à leur moment dipolaire permanent. En revanche, les solvants apolaires ne s'échauffent pas sous l'action d'un champ électromagnétique. Le Tableau II.9 présente les propriétés diélectriques des solvants couramment utilisés en extraction à 2450 MHz et à température ambiante.

Tableau II.9. Constante diélectrique et facteur de pertes pour différents solvants [54, 67-68]

<i>Solvant</i>	<i>Constante diélectrique (<math>\varepsilon'</math>) (Debye)</i>	<i>Perte diélectrique (<math>\varepsilon''</math>)</i>
Eau	78,3	1,87
Acétonitrile	37,5	3,44
Acétone	20,7	2,69
Ethanol	24,3	1,69
Méthanol	32,6	2,87
Acétate d'éthyle	6,5	0,5
Hexane	1,89	
2-propanol	19,9	1,66
Dichlorométhane	8,9	1,14

Dans le cas de l'extraction conventionnelle, au moment du chauffage, l'énergie thermique est transférée de l'extérieur vers l'intérieur de l'échantillon par conduction et convection alors que lors de l'extraction assistée par microondes le chauffage se fait en volume de l'intérieur vers l'extérieur (Figure II.15).

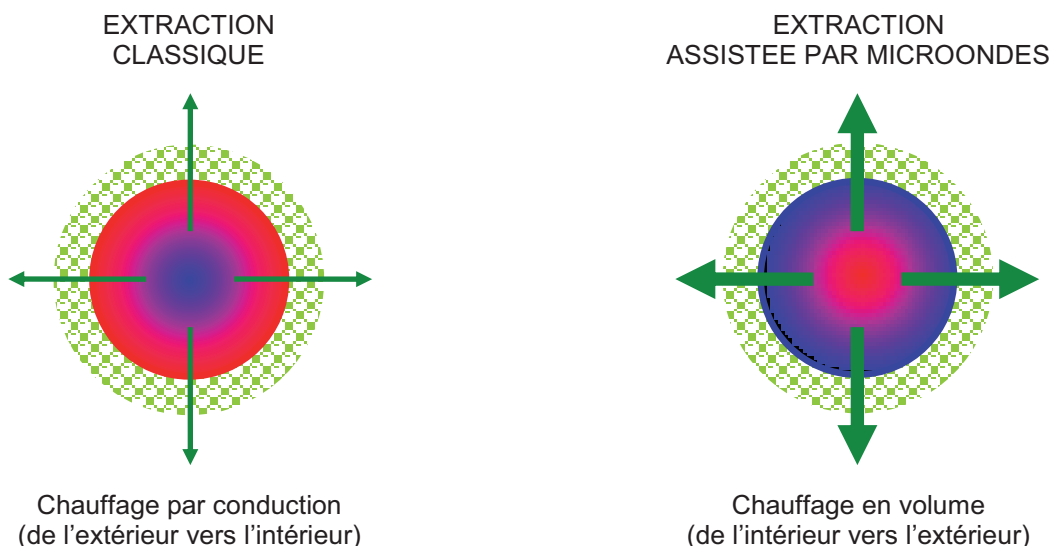





Figure II.15. Principes du chauffage classique et assisté par microondes

 Molécules extraites     
  Flux d'extraction     
  Gradient de température

Dans l'extraction assistée par microondes les ondes électromagnétiques pénètrent dans l'échantillon et l'énergie est transformée en chaleur par deux mécanismes : la conduction ionique et la rotation de dipôles. La conduction ionique implique le mouvement des ions d'une solution sous l'action d'un champ électromagnétique. Les frictions entre la solution et les ions génèrent de la chaleur. Le deuxième mécanisme (Figure II.16) est basé sur le fait que les molécules polaires (telles que l'eau, le méthanol, l'éthanol etc.) sont dipolaires et présentent des extrémités positives et négatives.

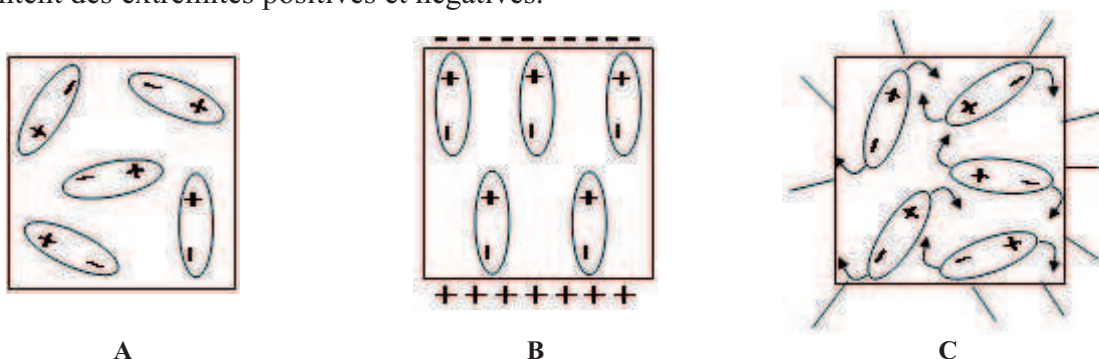


Figure II.16. Comportement de molécules dipolaires [69]  
 A. agitation thermique; B. action de champ électrique; C. action de microondes

Normalement ces molécules dipolaires ont un mouvement brownien. Sous l'effet d'un champ électrique les molécules s'orientent dans le sens de celui-ci. Plus l'intensité du champ électrique est importante, plus l'agitation thermique des molécules diminue en terme d'importance. Au moment où toutes les molécules sont orientées, un moment dipolaire global s'installe. Sous l'action d'une radiation microondes les molécules polarisées s'orientent dans la direction du champ, se désorientent si l'action de microondes disparaît et s'orientent de nouveau, dans l'autre direction si les microondes sont réappliquées [70-71]. Les forces d'interaction intermoléculaires (les liaisons d'hydrogène, les liaisons Van der Waals), qui s'opposent à la rotation de dipôles, provoquent des frictions internes et finalement du chauffage. Sous l'action des microondes, les molécules dipolaires s'alignent rapidement en fonction du champ électromagnétique ( $4,9 \times 10^9$  fois par seconde) et commencent à vibrer en libérant aussi de la chaleur [67]. Cette chaleur conduit à une augmentation importante de la température à l'intérieur du solvant d'extraction et/ou à l'intérieur du matériel végétal en

provoquant une surpression interne et conduisant finalement à la rupture de cellules. Les solutés se trouvant à l'intérieur de cellules peuvent migrer facilement vers l'extérieur et peuvent soit constituer directement l'extrait (cas de l'extraction assistée par microondes sans solvant) soit se mélanger avec le solvant environnant qui est capable de les solubiliser (cas de l'extraction assistée par microondes avec solvant) [72].

L'extraction assistée par microondes se déroule dans des équipements spécifiques dont les principaux éléments constitutifs sont :

- le magnétron (source des ondes électromagnétiques) (Figure II.17) ;
- le guide d'ondes qui sert pour la propagation des microondes vers l'enceinte de l'appareil ;
- l'applicateur microondes qui peut être de proximité (échantillon ciblée directement), monomode (échantillon introduit dans un récipient placé dans le guide d'ondes) ou multi-modes (les microondes agissent de façon aléatoire sur l'échantillon) [73].

Influencée par toute une série de facteurs tels que : la nature du solvant, le rapport matrice végétale : solvant et la surface de contact entre les deux, la durée, la puissance microondes, la température atteinte au cours du processus [75], cette technique d'extraction peut être utilisée pour l'obtention de composés phénoliques [76-77], de terpènes [78-80], de la pectine [81-82] etc.

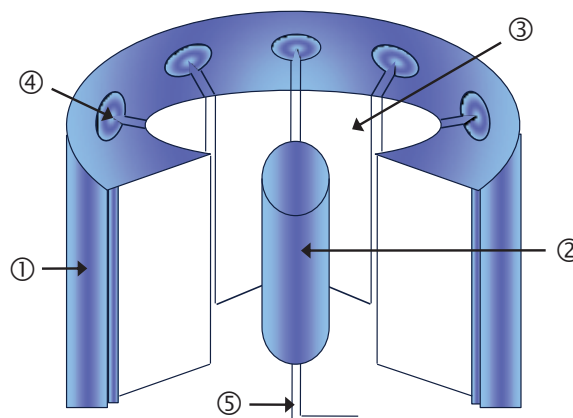


Figure II.17. Schéma d'un magnétron [74]

1 – anode, 2 – cathode,  
3 – espace d'interaction (vide poussé),  
4 – cavité de résonance, 5 – circuit de chauffage

## II. 4. CARACTERISATION DES EXTRAITS

### II. 4. 1. Analyse par chromatographie de haute performance sur couche mince (HPTLC)

La chromatographie de haute performance sur couche mince (HPLTC) est une forme améliorée de la chromatographie sur couche mince (TLC). A la place des plaques de silice sur aluminium recouverte de particule de silice d'environ 10 µm (spécifique à la TLC) elle utilise, le plus souvent, des plaques en verre recouverte de particule de silice d'environ 5 µm. Ces particules peuvent être greffées par différents types de groupements (chaîne alkyle C18, NH<sub>2</sub> OH etc.). L'HPTLC permet l'emploi de nouvelles procédures de migration de la phase mobile (chambre horizontales) et des systèmes améliorés (automatiques) pour déposer les échantillons. Elle est reconnue pour permettre une séparation plus efficace dans un temps plus court en nécessitant de faibles volumes de phase mobile.

Les principaux paramètres qui influent l'efficacité de la séparation de solutés d'un mélange ainsi que leur résolution sont les coefficients de partage, les facteurs de rétention, la sélectivité de la phase mobile et celle de la phase stationnaire pour les solutés.

Afin d'obtenir la meilleure séparation chromatographique, dans un temps court et sur une distance de migration minimale les conditions de séparation sur un support spécifique doivent être optimisées par un bon choix des solvants constituant la phase mobile qui doivent être mélangés dans des proportions adéquates [83].

L'utilisation de l'HPTLC comporte plusieurs étapes. Premièrement, l'échantillon est déposé sur la plaque. Ensuite la plaque est soumise au développement ou élution et à l'évaluation (une dérivation peut être nécessaire). Les étapes peuvent être automatisées mais la plaque, qui est la pièce centrale d'un système HPTLC, doit être portée manuellement d'une étape à l'autre.

Des nombreux avantages peuvent être attribués à l'utilisation de l'HPTLC :

- les résultats visuels : les informations obtenues sont facilement observables ;
- la simplicité ;
- l'analyse simultanée de plusieurs échantillons dans les mêmes conditions chromatographiques en utilisant un très faible volume de phase mobile ;
- la rapidité : due à l'absence du temps d'équilibrage et au temps court d'élution ;
- la flexibilité : plusieurs paramètres peuvent être optimisés pour améliorer la séparation ;
- l'unique utilisation de la plaque ;
- la détection multiple.

## II. 4. 2. Analyse par chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide de haute performance est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange se trouvant en phase homogène liquide. Son principe repose sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) et à leur affinité respective pour la phase stationnaire et pour la phase mobile. A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

L'analyse HPLC se réalise à l'aide d'un système constitué de quatre modules principaux :

1. un système de pompage ;
2. une système d'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique ;
3. une colonne chromatographique ;
4. un détecteur.

### LE SYSTEME DE POMPAGE

La pompe permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler le liquide jusqu'à une pression de 400 bars. En pratique, la pression de travail ne dépasse généralement pas 250 bars.

Un système de pompage peut être utilisé selon deux modes différents :

- **mode isocratique** (la composition de la phase mobile est constante au cours du temps) :
  - consiste à faire délivrer par la pompe les mêmes proportions de solvant durant toute l'analyse ;
  - mode d'élution très simple à mettre en œuvre ;
  - ne nécessite pas de temps de rééquilibrage de la colonne HPLC entre deux analyses ;

- **mode gradient d'éluion** (la composition de la phase mobile varie au cours du temps) :
  - nécessite au minimum deux solvants ;
  - assure une variation des proportions des constituants du mélange éluant ;
  - permet de réduire le temps d'analyse d'un mélange complexe contenant différents composés de polarités très variées en conservant une séparation satisfaisante des analytes ;
  - nécessite un temps de rééquilibrage dans les conditions initiales entre 2 analyses.

## LA VANNE D'INJECTION A BOUCLE EXTERNE

Le plus souvent avec six voies, elle présente 2 temps de fonctionnement (Figure II.18) :

1. le chargement (load) : la boucle d'injection (dont le volume est choisi en fonction de la taille de la colonne et de la concentration des produits à analyser) est remplie à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue ;
2. l'injection (inject) : l'éluant issu de la pompe HPLC circule dans la boucle, entraînant l'échantillon dans la colonne.

Cette modalité d'injecter l'échantillon dans la colonne permet le passage de la pression atmosphérique (boucle d'injection) à une pression beaucoup plus importante (existante dans la colonne chromatographique) sans que l'équilibre du système ne soit perturbé ce qui assure un bon déroulement des analyses à effectuer.

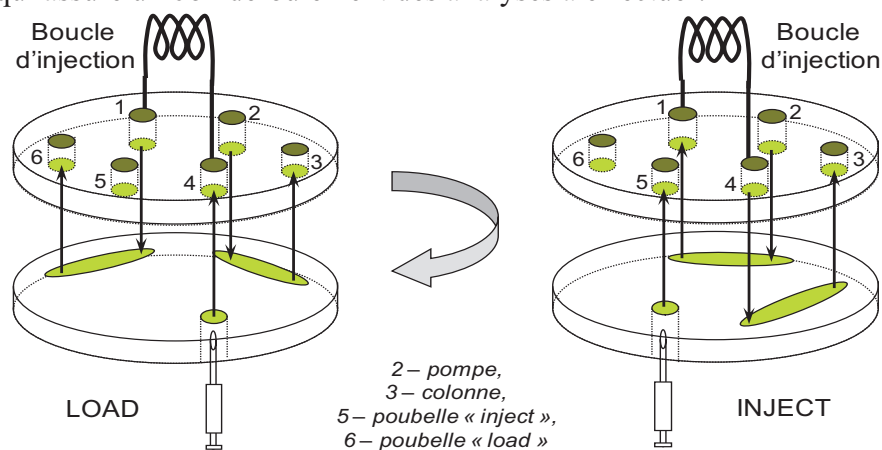


Figure II.18. Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection à six voies

## LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE

Elle assure la séparation chromatographique des solutés de l'échantillon injecté. Ses performances sont reliées à la nature de sa phase stationnaire, à sa longueur, à son diamètre et à la taille de ses particules. Généralement, une colonne HPLC a une longueur de 5 à 30 cm, un diamètre interne de 1 à 4,6 mm et une taille de particules comprise entre 3 et 5  $\mu\text{m}$ . Le débit du solvant est adapté en fonction du diamètre de la colonne : 20 à 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour une colonne de 1 mm et de 0,5 à 2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour une colonne de 4,6 mm de diamètre. Une large panoplie de phases stationnaires est disponible, plusieurs modes d'interactions (polaires, apolaires, ioniques etc.) pouvant être développés en fonctions des caractéristiques des molécules à analyser.

## LE DETECTEUR

Il assure la visualisation des solutés élués de la phase stationnaire.

Le choix du mode de détection est basé principalement sur les caractéristiques physico-chimiques des solutés. Si les solutés possèdent un ou plusieurs groupements chromophores (le cas de composés phénoliques) l'utilisation d'une détection par UV est justifiée. Pour la détection de solutés non volatils (qu'ils possèdent ou non un groupement chromophore) un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) peut être utilisé. Les composés triterpéniques, qui n'absorbent pas en UV au-delà de 210 nm et qui sont non volatils seront par exemple détectés avec le DEDL. Ces deux types de détecteurs à côté de la spectrométrie de masse sont parmi les plus utilisés pour la détection de principes actifs des échantillons végétaux.

### La détection spectrophotométrique (UV-Vis)

Ce mode de détection est le plus courant. Il assure la meilleure combinaison de sensibilité, linéarité et versatilité pour la détection des composés possédant des groupements chromophores. La plupart des solutés absorbent les radiations UV entre 200-350 nm y compris toutes les substances contenant une ou plusieurs doubles liaisons et toutes les substances ayant des électrons libres (les composés au noyau aromatique, les composés contenant des groupements fonctionnels tels que >CO, >CS, -N=O etc.).

La relation entre l'intensité de la lumière UV transmise à travers la cellule du détecteur et la concentration du soluté est soumise à la loi de Lambert-Beer:

$$A = \log \left[ \frac{I_0}{I} \right] = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{II.4}) \quad \text{où :}$$

$I_0$  – intensité de la lumière monochromatique incidente envoyée sur l'échantillon

$I$  – intensité de la lumière transmise

$\varepsilon$  – coefficient d'absorptivité molaire du soluté (dépend de la longueur d'onde)

$l$  – longueur du trajet optique

$C$  – concentration de l'espèce détectée

La longueur d'onde du détecteur doit être sélectionnée en fonction des groupements chromophores des molécules à détecter. Afin de limiter les interférences et la faible sensibilité liée à l'absorbance de la phase mobile (la plupart des solvants utilisés en HPLC absorbant à des faibles longueurs d'onde (Tableau II.10), il est préférable de choisir une longueur d'onde supérieure à 230 nm.

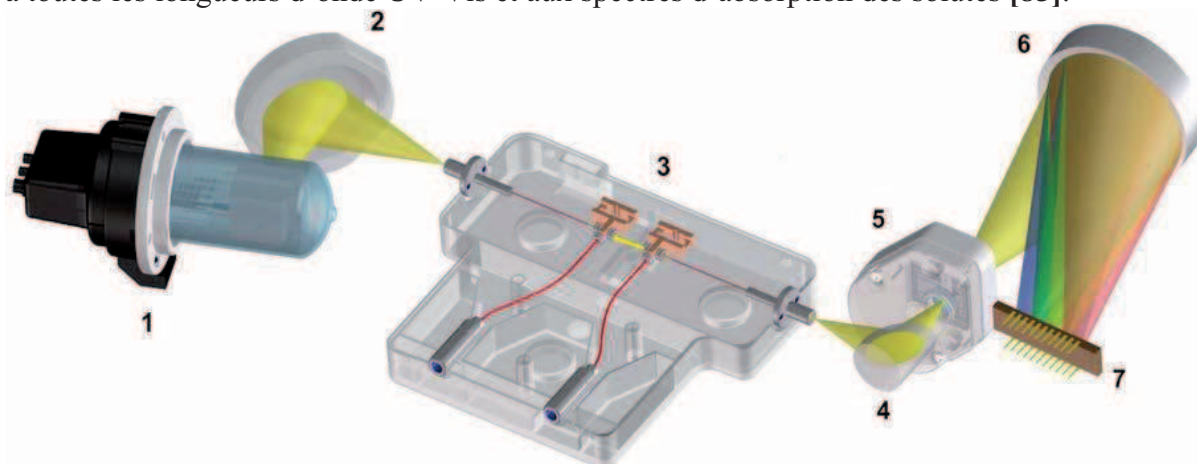
Tableau II.10. Valeurs cutoff en UV pour les solvants les plus utilisés [84]

<i>Solvant</i>	<i>UV cutoff (nm)</i>
Acétonitrile	190
Dichlorométhane	233
Acétate d'éthyle	256
<i>n</i> -Hexane	192
Méthanol	205
2-Propanol	205
Eau	<190

Un des détecteurs UV les plus utilisés est celui à barrette de diodes dont le système optique est illustré dans la Figure II.19.

La source de radiation est une lampe au deutérium (1) pour longueur d'onde comprise entre 190 nm et 400 nm et tungstène de 400 à 800 nm. Sa lumière est focalisée par une lampe miroir (2) placée à l'entrée de la cuve à circulation (3) avec des guides d'ondes optofluidiques. La lumière sort de la cuve à circulation à l'autre extrémité et est focalisée par

le miroir grossissant (4) à travers de l'ensemble des fentes (5) sur une lumière de réseau holographique (6) étant dispersée sur la barrette de diodes (7). Cela permet un accès simultané à toutes les longueurs d'onde UV-Vis et aux spectres d'absorption des solutés [85].



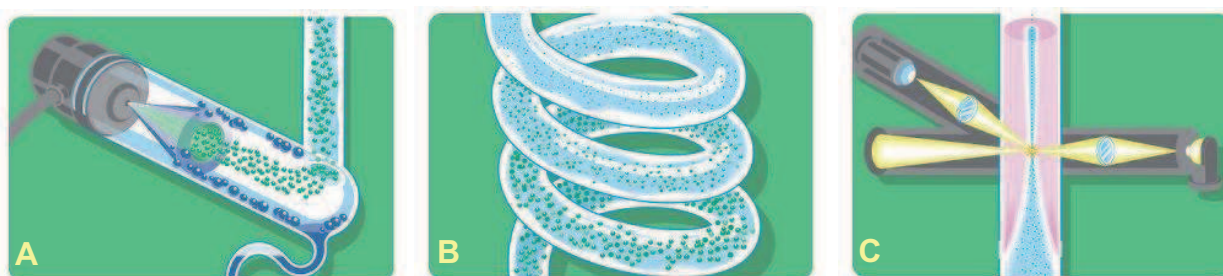
**Figure II.19. Le système optique d'un détecteur à barrette de diodes [85]**

1. lampe UV ; 2. lampe miroir ; 3. cuve à circulation ;  
4. miroir grossissant ; 5. micro fente ; 6. réseau ; 7. barrette de diodes

### Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)

Le DEDL est un autre détecteur souvent utilisé lors de l'analyse d'un extrait végétal par HPLC puisqu'il permet la détection de toute molécule dès lors qu'elle est moins volatile que la phase mobile. Il permet ainsi de détecter les composés non volatils sans chromophores. Son principe de fonctionnement est représenté dans la Figure II.20. Brièvement la solution sortant de la colonne chromatographique subit une nébulisation homogène sous l'action d'un flux d'azote (Figure II.20A). Les microgouttelettes formées sont sélectionnées en fonction de leur taille et les plus petites sont emportées par le gaz vecteur et passent dans un tube d'évaporation où leur diamètre s'amointrit jusqu'à transformer les molécules contenues dans l'éluant en particules solides (Figure II.20B). Ces particules passent au travers d'un faisceau laser entraînant sa diffusion. Un détecteur, placé à un angle de  $120^\circ$  recueille une partie de la lumière diffusée dépendant de la concentration initiale en solution de ces particules solides (Figure II.20C) [86].

Cette détection présente une bonne sensibilité et la nature des composés n'a qu'un faible impact sur la mesure de leur concentration.



**Figure II.20. Fonctionnement d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière [86]**

A. nébulisation de l'échantillon ; B. évaporation de la phase mobile ;  
C. diffusion de la lumière par les particules

L'avantage du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) est représenté par sa grande universalité puisque tout composé moins volatil que le solvant d'éluant est détecté. Ce détecteur offre donc une différence de détection et une complémentarité vis-à-vis de l'UV.

### La détection par spectrométrie de masse (MS)

Est basée sur l'ionisation de molécules sous l'action d'une énergie élevée qui conduit à la rupture des liaisons interatomiques et par conséquent à l'apparition de fragments chargés ( $z$ ) ayant une masse déterminée ( $m$ ) et caractérisés par le rapport  $m/z$ . Ces caractéristiques offrent des informations sur la structure de molécules étudiées (Figure II.21).

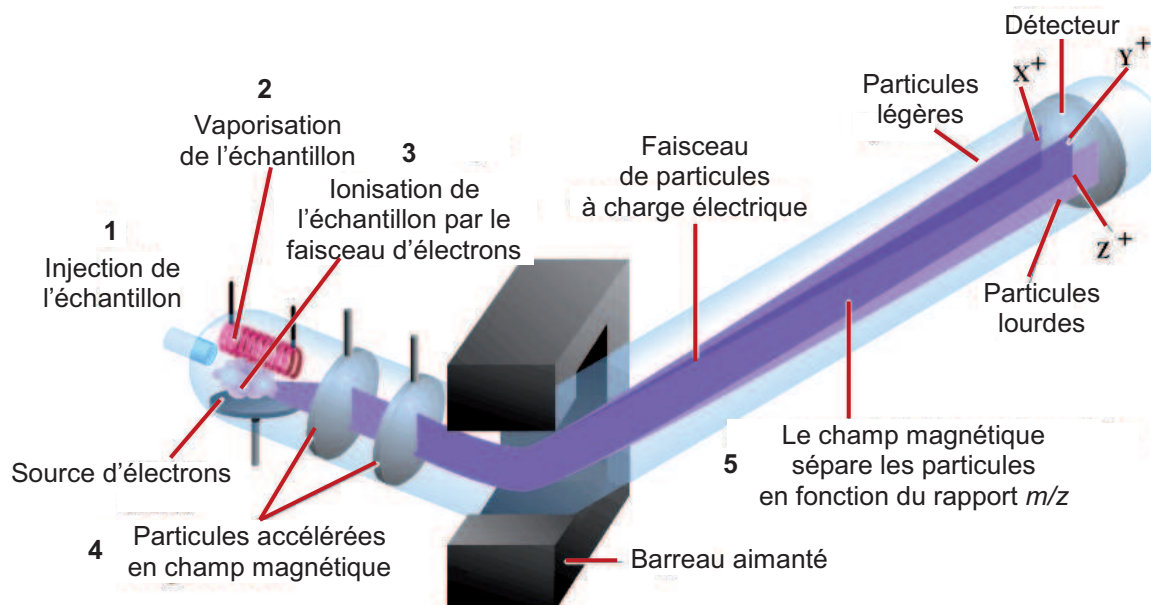


Figure II.21. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse [87]

L'analyse de composés bioactifs végétaux par spectrométrie de masse implique différentes étapes :

1. introduction de l'échantillon dans l'appareil et transformation des analytes en vapeurs ;
2. ionisation de molécules gazeuses ;
3. accélération des ions et focalisation en fonction du rapport  $m/z$  en utilisant des lentilles électroniques pour l'augmentation de l'énergie cinétique des ions ;
4. séparation des faisceaux d'ions ayant des rapports  $m/z$  différents ;
5. détection des ions séparés à l'aide d'un détecteur qui quantifie les charges électriques ;
6. enregistrement du spectre de masse, représentant l'abondance des ions en fonction de leur rapport  $m/z$  [88].

Ces étapes se déroulent dans un spectromètre de masse équipé avec :

- une source d'ions responsable du processus d'ionisation qui peut se réaliser par : nébulisation à pression atmosphérique (ESI, APCI, APPI) ;
- un analyseur tel que : les filtres quadripolaires, le piège à ions, l'analyseur à temps de vol ;
- un détecteur qui collecte et enregistre le signal [89].

Parmi les sources d'ionisation utilisées pour l'analyse de composés extraits de plantes (fruits et résidus de fruits inclus) le plus souvent sont mentionnées : ESI [90-93], APCI [94].

En ce qui concerne les analyseurs les différentes études indiquent fréquemment l'utilisation du triple quadripôle [95].

Prenant en considération ces observations nous avons utilisé au cours de cette thèse un spectromètre de masse équipé d'une source ESI et APCI et d'un triple quadripôle. Le principe de fonctionnement de ces trois modules est donc présenté ci dessous.



### Source d'ionisation par électrospray (ESI)

Introduite pour la première fois en 1968 par Dole et couplé à la spectrométrie de masse en 1984 par Yamashita et Fenn, l'ESI est une des techniques d'ionisation les plus douces qui n'entraîne que très peu de fragmentation des ions formés [96].

L'ionisation par électrospray est utilisable notamment pour l'analyse de molécules polaires. La préparation de l'échantillon contenant ce type de composés se réalise par dissolution à une concentration adéquate dans un mélange d'eau avec un solvant organique volatil tel que MeOH, iPrOH, MeCN. Dans le cas de l'analyse en mode d'ionisation positif une proportion d'acide formique ou d'acide acétique est souvent rajoutée afin de faciliter la formation d'ions chargés positivement. En mode d'ionisation négatif il est nécessaire que les molécules d'analytes soient sous forme d'ion chargé négativement ce qui implique souvent l'ajout d'une solution de formiate d'ammonium ou d'une amine volatile.

L'échantillon ainsi obtenu est transporté par un capillaire placé à un potentiel élevé (1 à 4 kV) positif ou négatif. Un spray de gouttelettes chargées sort du cône de Taylor. La taille de ces gouttelettes diminue par évaporation sous l'action d'un flux d'azote chauffé qui traverse le front de la source d'ionisation (Figure II.22). Les ions se forment à pression atmosphérique et passent par un orifice conique dans une région intermédiaire en arrivant finalement sous vide poussé à l'analyseur du spectromètre de masse [96-97].

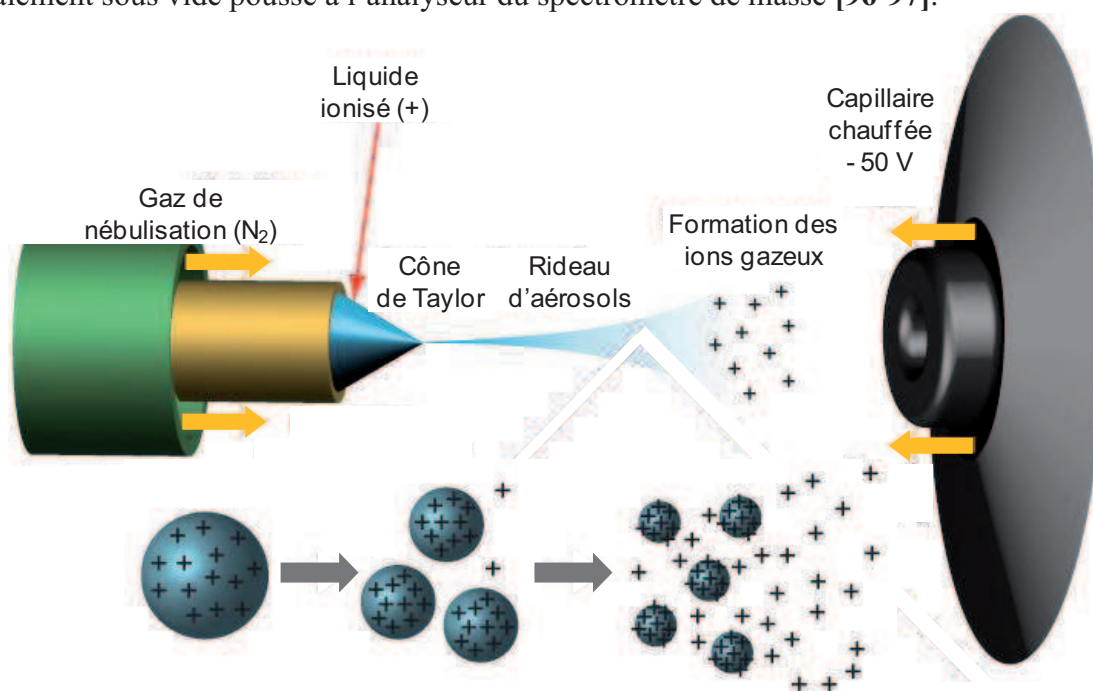


Figure II.22. Représentation schématique d'une source d'ionisation type ESI [98]

### Source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

Introduite par Horning en 1970 pour l'ionisation de molécules peu polaires de petites masses moléculaires, l'APCI conduit généralement à des ions mono chargés [99]. Son principe de fonctionnement est illustré dans la Figure II.23. Brièvement, un nébuliseur pneumatique à azote est utilisé pour former un aérosol à l'intérieur d'une chambre (le vaporisateur) chauffée à des températures élevées (350 – 500°C). L'effluent à analyser est évaporé et mélangé ensuite avec le gaz nébuliseur ce qui permet aux analytes d'arriver à l'électrode à décharge corona constituée d'une aiguille et d'une chambre de nébulisation qui sert de contre-électrode. L'application d'une différence de potentiel élevée ( $\pm 2 - 3$  kV) sur cette électrode, provoque une décharge corona (décharge électrique lumineuse) de  $\sim 2 - 3$   $\mu\text{A}$ . Cette décharge ionise le gaz ambiant et crée un plasma autour de la pointe de l'aiguille. Les

ions radicalaires du plasma participent ensuite à des réactions chimiques qui donnent lieu à des transferts de protons et à l'ionisation des analytes [100].

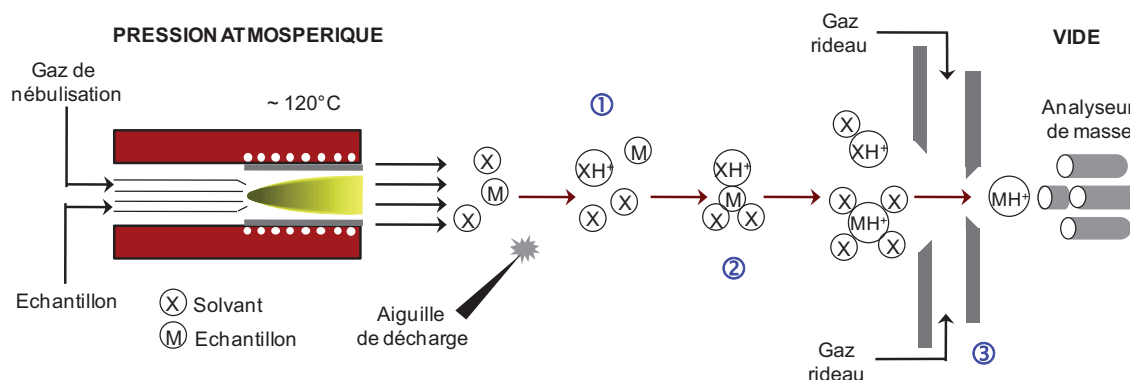


Figure II.23. Source d'ionisation APCI [101]

1 – ionisation des molécules de solvant ; 2 – formation des clusters ; 3 – declustering

### Analyseur quadripôle

Cet analyseur est constitué de quatre barres d'une longueur de 10 à 20 cm couplées deux par deux et raccordées de telle façon qu'une différence de potentiel puisse être créée entre elles. Deux barres sont chargées positivement et deux négativement et pour chaque paire d'électrodes un voltage décalé de 180° est appliqué. De plus, un champ de haute fréquence est appliqué ce qui fait que le quadripôle ne nécessite pas la présence d'un électroaimant.

Les tensions alternatives de paires de barres de quadripôle sont déphasées, le champ obtenu est donc constitué de deux parties : une fixe et l'autre variable. Les ions sortant de la chambre d'ionisation arrivent dans le quadripôle. Ici, ils sont soumis à une force d'intensité et de direction variables ce qui fait que leurs trajectoires sont complexes et parfois instables [96]. Seuls les ions de  $m/z$  adéquat auront une trajectoire stable leur permettant de traverser l'analyseur et seront détectés (Figure II.24).

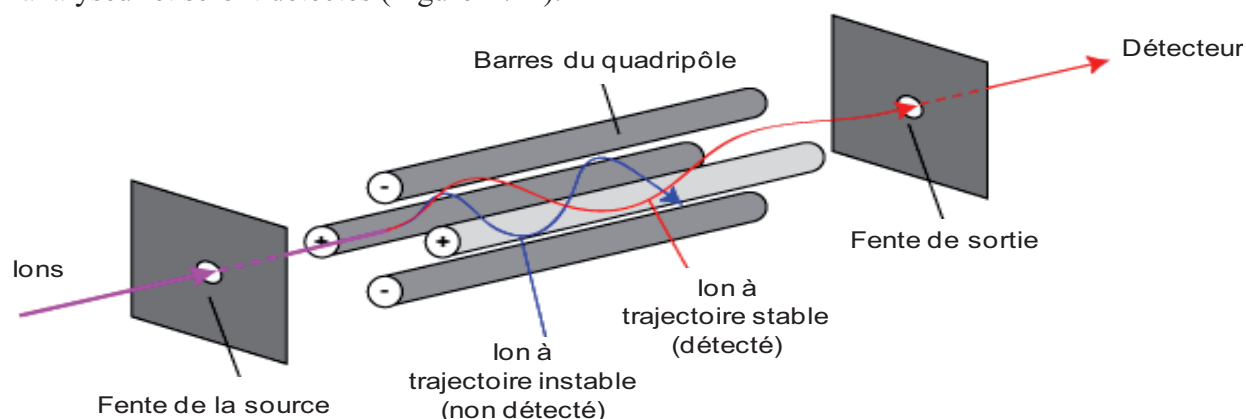


Figure II.24. Représentation schématique d'un analyseur quadripôle [102]

## II. 4. 3. Analyse par chromatographie en phase supercritique (SFC)

Cette technique de séparation chromatographique utilise comme phase mobile, un fluide ou un mélange des fluides en état supercritique. C'est une technique complémentaire aux chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide [103]. Son emploi présente plusieurs avantages parmi lesquels nous pouvons citer :

- le pouvoir de solubilisation d'un liquide et la faible viscosité d'un gaz ;
- la grande efficacité par unité de temps due à la diffusion rapide des composés d'intérêt dans les fluides supercritiques ;

- la sélectivité importante due aux interactions des solutés avec la phase éluante supercritique et avec la phase stationnaire ;
- la possibilité d'utiliser des systèmes de détection identiques à la chromatographie en phase liquide (UV, DEDL, MS) ;
- la facilité d'évaporer la phase mobile par simple détente etc. [104].

Différents types de fluides peuvent être utilisés en tant que phase mobile pour la SFC. Les propriétés de quelques uns sont présentées dans le Tableau II.11.

Tableau II.11. Propriétés de solvants qui peuvent être utilisés en SFC (d'après [105])

Solvant	Température critique (°C)	Pression critique (atm)	Densité critique (g.cm <sup>-3</sup> )
Dioxyde de carbone	30,9	73,74	0,469
Eau	619,6	220,6	0,322
Méthane	- 82,5	46	0,162
Ethane	32,1	48,7	0,203
Propane	96,6	42,5	0,217
Ethylène	9,1	50,4	0,215
Propylène	91,7	46	0,232
Méthanol	240,7	80,9	0,272
Ethanol	240,7	61,5	0,276
Acétone	234,9	47	0,278
Trifluorométhane	25,8	48,4	0,526

Parmi ces solvants, le CO<sub>2</sub> (Figure II.25) est le plus utilisé pour les raisons suivantes :

- facilité de manipulation (il atteint son état supercritique à une température de 31°C et à une pression de 73 bars) ;
- bon pouvoir solvant ;
- compatibilité de sa température critique avec la stabilité thermique des solutés et des silices greffées utilisées comme phases stationnaires;
- non-toxique, non-inflammable, non-corrosif, inodore, peu onéreux ;
- la récupération des solutés est aisée (par détente ou réchauffement) ;
- couplage possible avec différents types de détecteurs [104].

L'utilisation de CO<sub>2</sub> en tant que phase mobile est conseillée surtout pour la séparation des composés non-polaires. L'analyse des composés plus polaires peut être améliorée par l'ajout d'un modificateur organique EtOH [107], MeCN, iPrOH [108], ou le 2,2,2-trifluoroéthanol [109] ou MeOH qui est le co-solvant le plus employé [110]. Conformément aux résultats de l'étude réalisée par Ibañez *et al.* [111] ce co-solvant est capable de changer la rétention des analytes par l'augmentation du pouvoir de solubilisation de la phase mobile et par désactivation des sites actifs de la phase stationnaire.

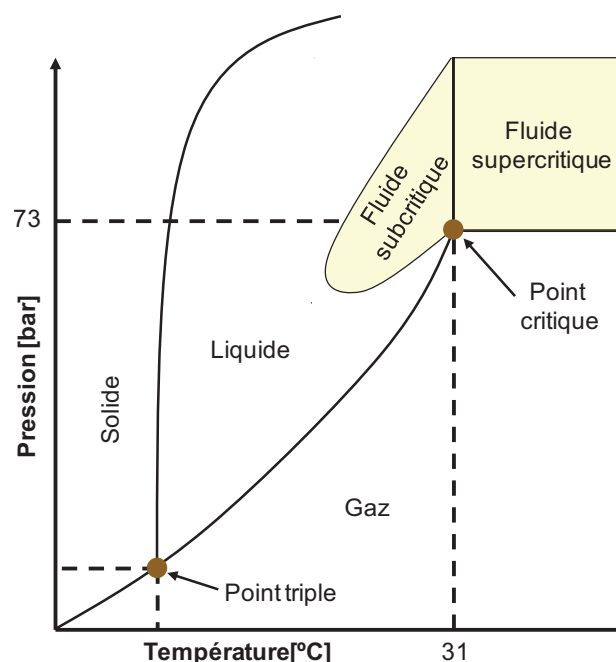


Figure II.25. Diagramme de phase de CO<sub>2</sub> (adapté de [106])

En ce qui concerne les colonnes compatibles avec la SFC nous pouvons noter qu'il est intéressant de préciser que les phases stationnaires de l'HPLC peuvent servir aussi en SFC [112].

Les équipements utilisés pour les analyses par chromatographie en phase supercritique ressemblent à ceux employés en HPLC. Tout de même, quelques aspects particuliers doivent être mis en évidence. Parmi ceux-ci le plus important concerne le contrôle précis de la température, de la pression et du débit du CO<sub>2</sub>, paramètres nécessaires pour maintenir la phase mobile en état supercritique et assurer ainsi la séparation chromatographique attendue et une bonne reproductibilité des résultats [113]. Pour cela le plus approprié est d'utiliser une pompe haute pression. Généralement les plus adéquates sont les pompes à piston, à membrane ou à seringue. Afin d'éviter le phénomène de cavitation qui peut conduire à une diminution de la capacité de pompage ou à des chocs de pression la pompe doit être refroidie afin que le CO<sub>2</sub> soit pompé liquide [114]. Un autre aspect critique porte sur la récupération des analytes après la détection qui peut se faire par la décompression de la phase mobile. Majewski *et al.* [114] stipulent que d'habitude ce processus doit se faire à une pression de plus de 5 bars afin d'éviter l'apparition de la glace dans le système.

## II. 5. FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES EXTRAITS

De nos jours, différentes méthodes permettant le fractionnement des extraits sont connues. Parmi celles-ci l'extraction liquide-liquide, la chromatographie de partage centrifuge et la chromatographie semi-préparative ont été utilisées au cours des travaux réalisés dans cette étude. La première technique citée nous a été utile pour le fractionnement des extraits de résidus de pommes alors que les deux autres techniques ont été développées pour le fractionnement des extraits de cerises.

Nous allons voir par la suite le principe de chacune de ces techniques.

### II. 5. 1. Extraction liquide-liquide (ELL)

La séparation par extraction liquide-liquide de certains constituants peu ou pas volatils se trouvant dans un mélange liquide, repose sur le transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, inertes aux réactions avec les solutés et ayant des masses volumiques différentes. Elle consiste à extraire une ou plusieurs molécules (les *solutés*) d'un milieu liquide (la *solution*) au contact d'un solvant dans lequel les solutés sont solubles.

L'extraction liquide-liquide peut être réalisée dans des ampoules à décanter, extracteurs spécifiques etc. La solubilisation des analytes dans le solvant a lieu jusqu'à l'équilibre. Ceci est lié à la vitesse de diffusion du soluté d'une phase à l'autre. La rapidité de l'extraction est proportionnelle à la différence de concentration en soluté entre les deux phases non-miscibles. L'agitation du milieu influe aussi le processus car elle augmente la surface de contact entre les phases favorisant ainsi la diffusion des solutés. La séparation des phases consiste dans la coalescence des fines gouttelettes de la phase dispersée en grosses gouttes, le regroupement de ces gouttes et leur rassemblement en une phase continue, distincte de l'autre. Elle se réalise par décantation gravimétrique ou par centrifugation et elle est d'autant plus rapide que les liquides ont des tensions superficielles élevées, et des masses volumiques suffisamment éloignées [115].

## II. 5. 2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La CPC a été introduite au Japon en 1982 et utilise un système bi-phasique liquide-liquide sans support solide pour la phase stationnaire.

La séparation est basée sur le partage des solutés entre ces deux phases liquides non-miscibles préparées par mélange de deux, trois ou plusieurs solvants. Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (rotor) par un champ de force centrifuge constant généré par la rotation de la colonne contenant des cellules de partage. Ces cellules sont reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide « mobile » est pompée au travers de la phase stationnaire (Figure II.26) [116]. Les solutés migrent à travers le rotor en fonction de leur coefficient de partage.

L'utilisation de la CPC pour le fractionnement des extraits de plantes implique des systèmes constitués d'éléments usuels (pompe, injecteur, colonne CPC, détecteur, système d'enregistrement du signal et collecteur de fractions).

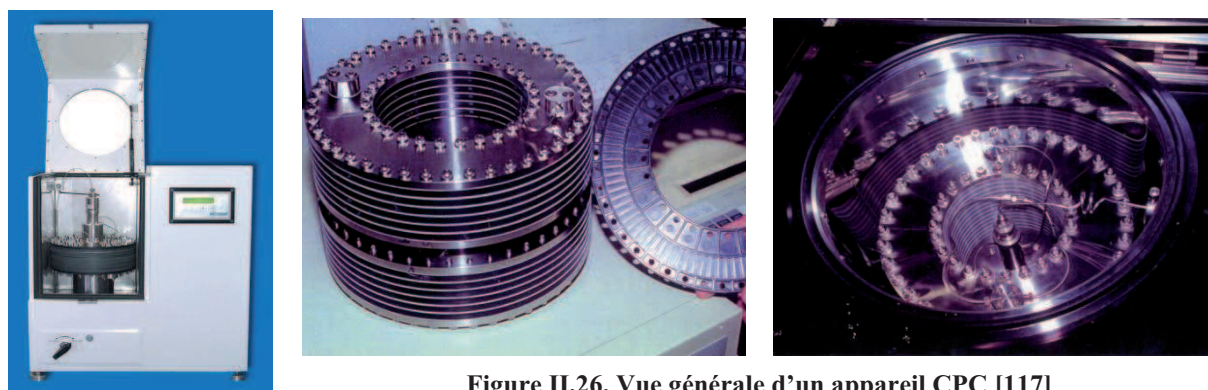


Figure II.26. Vue générale d'un appareil CPC [117]

Parmi les avantages de la CPC nous pouvons distinguer ceux dûs à :

- l'absence de support solide qui entraîne :
  - l'absence d'adsorption irréversible des solutés ;
  - peu de dégradation et de dénaturation des solutés ;
  - l'absence de déchets solides potentiellement contaminés ;
  - la récupération intégrale de l'échantillon ;
- l'usage de mélange de solvants qui assure :
  - une grande diversité de systèmes liquides bi phasiques ;
  - la récupération de la phase stationnaire à la fin de l'expérience (par extrusion).
- la possibilité de choisir le mode d'utilisation : les deux phases étant liquides, il est possible de choisir la phase stationnaire et la phase mobile. Conventionnellement, le mode est dit « normale » quand phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile et « inverse » dans le cas contraire. Nous pouvons également choisir de travailler en mode descendant (quand la phase mobile est plus lourde que la phase stationnaire) ou ascendant (la phase mobile est la plus légère) [117].

En ce qui concerne les inconvénients de la CPC l'utilisation exclusive de liquides nécessite une bonne étanchéité du système afin d'éviter les fuites de solvants. L'appareil doit résister à l'augmentation de la perte de charge dans la colonne en rotation. D'autre part, l'injection de l'échantillon est une étape très importante qui impose l'emploi de systèmes de solvants capables de solubiliser l'échantillon en totalité [118].

### II. 5. 3. Chromatographie semi-préparative (CSP)

Les extraits de fruits ou de résidus de fruits peuvent être fractionnés également par chromatographie semi-préparative dont le principe est similaire à celui de l'HPLC mais en utilisant des colonnes de dimensions plus élevées (la longueur de la colonne peut varier de 15 à 25 cm, son diamètre interne peut arriver même à 50 mm, la taille des particules peut atteindre 10  $\mu\text{m}$ ) et des débits de phase mobile plus élevés.

Il est nécessaire de préciser que dans ce cas le système utilisé est plus robuste et implique l'existence d'une pompe pouvant délivrer d'importants volumes de solvant avec des pertes de charges allant de quelques bars jusqu'à plus de 100 bars. Les pompes à plusieurs voies permettent l'usage simultané de plusieurs solvants ou de mélanges de solvants ce qui permet le développement de gradients d'éluion parfois nécessaires pour une bonne séparation des analytes. La collecte des fractions obtenues lors de la séparation chromatographique peut se réaliser manuellement ou automatiquement.

## II. 6. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS BRUTS ET DES FRACTIONS

L'activité antioxydante de fruits et de leurs résidus est reliée à la présence de certaines molécules appelées « antioxydants » capables d'inhiber les « radicaux libres » tels que les dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote responsables du stress oxydatif inter et/ou intracellulaire.

Jusqu'à maintenant, un grand nombre de méthodes *in vitro* capables de quantifier l'activité antioxydante ont été mises au point. En fonction du mécanisme impliqué, ces méthodes se basent sur le transfert soit d'un atome d'hydrogène soit d'un électron d'un antioxydant vers les radicaux libres [119] afin que ceux-ci deviennent stables (Tableau II.12).

**Tableau II.12. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro* [120-121]**

<i>Classe de méthodes</i>	<i>Equation du mécanisme spécifique</i>	<i>Exemples</i>
Transfert d'atome d'hydrogène	$\text{AH} + \text{X}\bullet \rightarrow \text{XH} + \text{A}\bullet \quad (\text{II.5})$ <p>AH – antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène)            X• – radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène)            XH – radical libre inhibé            A• – antioxydant stable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Capacité d'absorption des radicaux libres (test ORAC)</li> <li>▪ Capacité de piégeage des radicaux libres (test TRAP)</li> <li>▪ Inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique</li> <li>▪ Inhibition de l'oxydation des lipoprotéines basse densité</li> </ul>
Transfert d'électron	$\text{M(III)} + \text{AH} \rightarrow \text{AH}\bullet + \text{M(II)} \quad (\text{II.6})$ <p>M(III) – antioxydant (donneur d'un électron)            AH – radical libre (accepteur d'un électron)            AH• – radical libre inhibé            M (II) – antioxydant stable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pouvoir réducteur (test FRAP)</li> <li>▪ Réduction du radical stable DPPH'</li> <li>▪ Contenu en phénols totaux (test FC)</li> <li>▪ Capacité antioxydante en équivalents trolox (TEAC)</li> </ul>

Au cours de la présente étude, les extraits bruts de résidus de pommes et les fractions obtenus par extraction liquide-liquide ont été soumis à différents tests *in vitro* afin de savoir s'ils présentent des activités antioxydantes. Ainsi, nous avons déterminé le contenu en composés phénoliques totaux, le contenu en flavonoïdes totaux et nous avons testé l'activité anti radicalaire et le pouvoir réducteur.

Le principe de ces analyses est détaillé par la suite.

## II. 6. 1. Composés phénoliques totaux (Test Folin-Ciocalteu)

La nature précise du réactif Folin-Ciocalteu est assez complexe, son obtention comportant plusieurs étapes. Ainsi, premièrement, un mélange constitué de 100 g de tungstate de sodium ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g de molybdate de sodium ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 100 mL d'acide chlorhydrique concentré, 50 mL d'acide phosphorique 85% et 700 mL d'eau est porté à ébullition pendant 10 h. Ensuite 150 g de sulfate de lithium ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sont ajoutés afin d'obtenir la couleur jaune intense spécifique du réactif [121].

La méthodologie basée sur l'utilisation de ce réactif nécessite la présence d'un milieu hautement basique. Dans ce système les composés phénoliques sont énergiquement oxydés conduisant à la formation de dérivés d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ ). Ceux-ci réagissent avec le molybdate avec l'apparition de l'ion  $\text{MoO}^{4+}$  qui absorbe fortement à 760 nm [122].

Le contenu en composés phénoliques des extraits et des fractions obtenues lors de l'extraction liquide-liquide est déterminé par le test de Folin-Ciocalteu.

Les extraits et les standards dilués dans du MeOH sont mélangés avec du réactif de Folin-Ciocalteu et un certain volume de solution de carbonate de sodium est rajouté. Le volume final est ensuite ajusté avec de l'eau ultra-pure. Après une période d'incubation de 2 h à l'abri de la lumière, les absorbances des échantillons sont lues à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats s'expriment en équivalence d'acide gallique en utilisant une gamme étalon.

## II. 6. 2. Flavonoïdes totaux

Le contenu en flavonoïdes peut être facilement déterminé à l'aide du chlorure d'aluminium. Sous sa forme anhydre cette substance présente une structure de réseau hexa-coordinée [123]. En solution aqueuse elle est totalement ionisée ( $(\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6)^{3+}$ ;  $pK_{1,1} = 4,97-5,55$ ). Ayant un caractère acide le chlorure d'aluminium est considéré comme un des plus forts acides de Lewis [124]. Des nombreuses recherches [125-129] ont été axées sur l'étude de sa capacité à former des complexes stables en présence de flavonoïdes et des mécanismes impliqués. A titre d'exemple, la Figure II.27 illustre le mécanisme de complexation de la quercétine proposé par Cornard *et al.* [130] après détection par spectroscopie électronique.

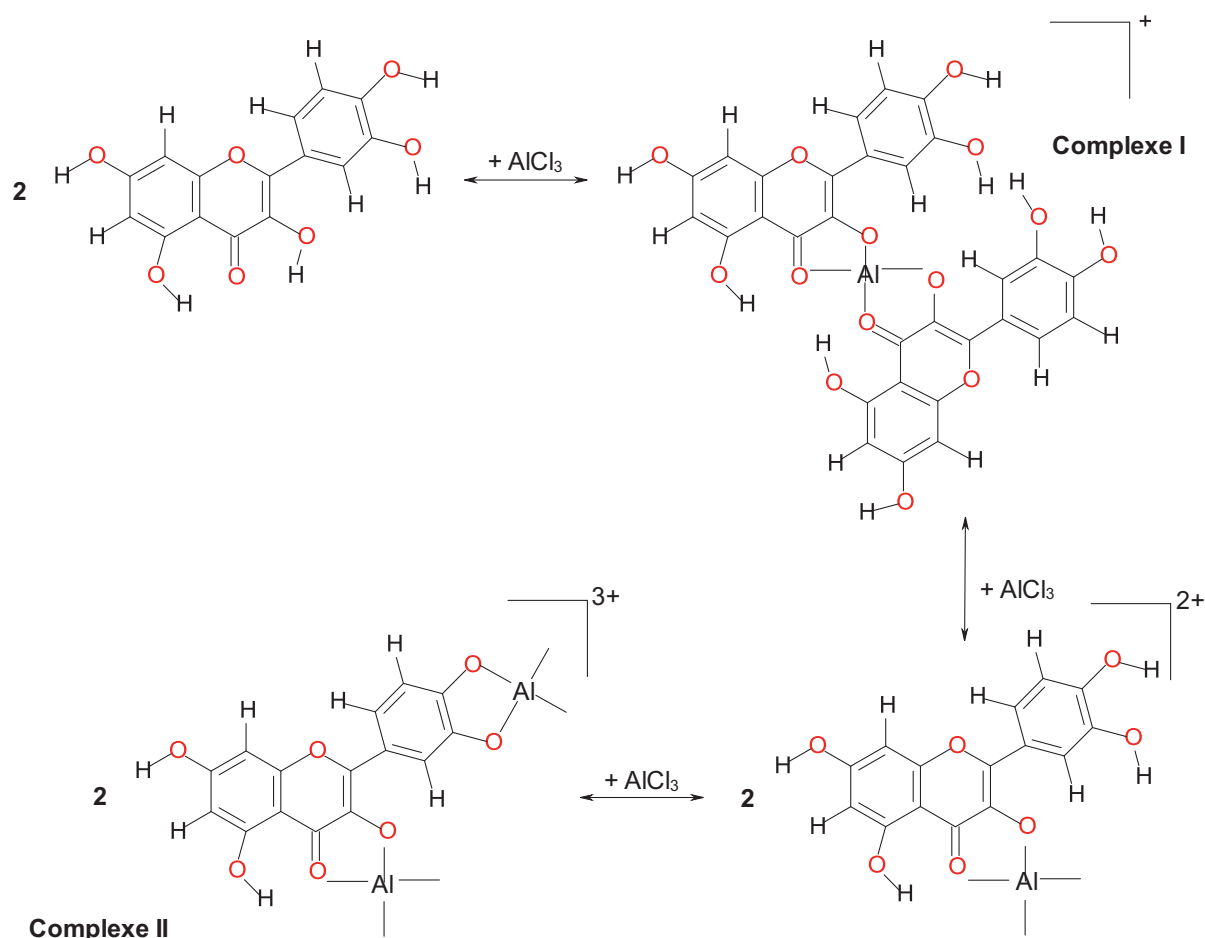


Figure II.27. Mécanisme de complexation de Al (III) par la quercétine [130]

Afin de quantifier les flavonoïdes des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions les échantillons sont mélangés en proportions égales avec une solution de faible concentration de chlorure d'aluminium. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre on lit l'absorbance du mélange à 435 nm. Une droite d'étalonnage permet la détermination des quantités de flavonoïdes existants dans les échantillons. Les résultats s'expriment en équivalence de rutine [131].

### II. 6. 3. Activité anti radicalaire (Test DPPH)

Découvert en 1922, le DPPH est un radical libre stable ayant au centre de sa molécule deux atomes d'azote. Il peut être inhibé par transfert d'atome d'hydrogène, par transfert d'électrons (équations II.5 et II.6 du Tableau II.12) ou par perte séquentielle du proton-transfert d'électron. En milieu aqueux le premier de ces trois mécanismes est prédominant. En revanche, en milieu non-aqueux les deux derniers mécanismes sont plus importants ce qui peut être expliqué par la capacité des solvants organiques à former des liaisons d'hydrogène fortes avec les antioxydants [132]. La forme radicalaire du DPPH peut être influencée négativement par d'autres facteurs tels que : la présence de la lumière ou le pH [133].

La méthode du DPPH utilisée pour déterminer l'activité anti radicalaire des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions implique donc la réduction d'une solution alcoolique



de l'espèce radicalaire DPPH<sup>•</sup> en présence d'un donneur d'hydrogène (AH) ce qui conduit à la formation du DPPH-H non-radicalaire (Figure II.28). Cette réaction induit une perte de la couleur violette qui peut être facilement suivie par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm. La rapidité de la perte de couleur est directement proportionnelle à l'activité antioxydante du donneur d'hydrogène.

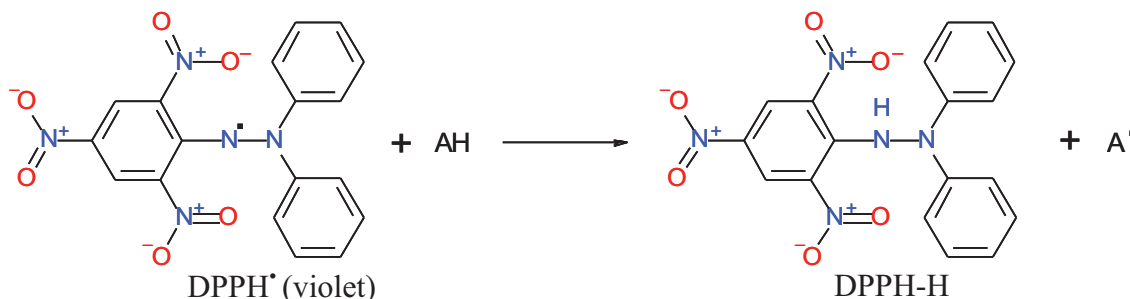


Figure II.28. Réduction du radical DPPH<sup>•</sup> en présence d'un antioxydant

## II. 6. 4. Pouvoir réducteur (Test FRAP)

Utilisé pour la première fois par Benzie *et al.* [134] le test FRAP implique la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique ((Fe(III)-TPTZ)<sub>2</sub>)<sub>c</sub> en un complexe tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)-TPTZ)<sub>2</sub>) par un antioxydant (Figure II.29).

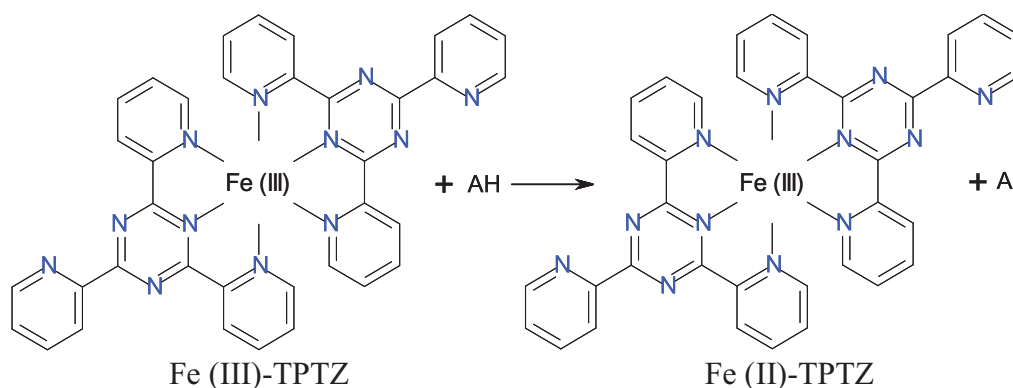


Figure II.29. Réduction du complexe Fe(III)-TPTZ par un antioxydant

Le pouvoir réducteur est relié au degré d'hydroxylation et à la présence des liaisons conjuguées des antioxydants. La réaction nécessite un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer et se base totalement sur le transfert d'électron [135].

L'apparition d'une couleur bleu intense (spécifique pour la tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)-TPTZ)<sub>2</sub>) lors du contact avec les extraits de résidus de pommes et de leurs fractions indique la présence des composés antioxydants. Le changement de couleur est mesuré à 593 nm et il est directement relié au pouvoir réducteur des antioxydants [120].

## CONCLUSIONS

Le présent chapitre a eu pour but la présentation du cheminement que nous avons suivi pour la récupération des composés actifs existants dans sources d'origine végétale.

Nous avons vu premièrement la description du matériel végétal choisi de cerises fraîches et de résidus de pommes.

L'étude de leurs caractéristiques nous a permis de réaliser l'encadrement de chaque dans une certaine classe botanique. Nous avons présenté ensuite la composition chimique du matériel végétal en mettant l'accent surtout sur le contenu en principes actifs connu jusqu'à présent. Parmi ceux-ci nous pouvons citer les composés phénoliques tels que les anthocyanines et les acides phénoliques se trouvant abondamment présents dans les cerises mais aussi les composés triterpéniques et d'autres composés phénoliques, dans les résidus de pommes.

Ce deuxième chapitre a inclut également la description des méthodes impliquées dans le processus de récupération des molécules bioactives du matériel végétal. Ainsi nous avons présenté le principe :

- du traitement du matériel végétal (congélation, zéodratation) ;
- des techniques d'extraction solide-liquide (macération, extraction par solvant pressurisé, extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par microondes) ;
- des méthodes de caractérisation des extraits (HPTLC, HPLC, SFC) ;
- des méthodes utilisées pour le fractionnement et la purification des extraits (extraction liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge, chromatographie semi-préparative) ;
- des tests appliqués afin de déterminer l'activité antioxydante des extraits (Test Folin-Ciocalteu, flavonoïdes totaux, Test DPPH, Test FRAP).

Le fait d'avoir caractérisé le matériel végétal et d'avoir présenté les étapes nécessaires pour l'extraction et l'analyse des principes actifs extraits nous a permis de mieux choisir les conditions de déroulement de nos travaux de recherche dont les résultats seront discutés dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Blamey, M., Grey-Wilson, C. *La flore d'Europe Occidentale* **2003**, Flammarion, Paris.
2. Vaughan, J.G., Geissler, C.A. *The new Oxford book of food plants*. **2009**, Oxford University Press, Oxford.
3. Khoo, G.M., Clausen, M.R., Pedersen, B.H., Larsen, E. *Bioactivity and total phenolic content of 34 sour cherry cultivars*. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2011**, 24, (6), 772-776.
4. Min, J., Yu, S.-W., Baek, S.-H., Nair, K.M., Bae, O.-N., Bhatt, A., Kassab, M., Nair, M.G., Majid, A. *Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia*. *Neuroscience Letters*. **2011**, 500, (3), 157-161.
5. Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N.C., Tavazzi, B., Galvano, G. *Cyanidins: metabolism and biological properties*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **2004**, 15, (1), 2-11.
6. Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., Neri, D. *Cherry Antioxidants: From Farm to Table*. *Molecules*. **2010**, 15, (10), 6993-7005.
7. Conte, A., Scrocco, C., Lecce, L., Mastromatteo, M., Del Nobile, M.A. *Ready-to-eat sweet cherries: Study on different packaging systems*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **2009**, 10, (4), 564-571.
8. Mitić, S., Obradović, M., Mitić, M., Kostić, D., Pavlović, A., Tošić, S., Stojković, M. *Elemental Composition of Various Sour Cherry and Table Grape Cultivars Using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry Method (ICP-OES)*. *Food Analytical Methods*. **2011**, 1-8.
9. Usenik, V., Fabčić, J., Stampar, F. *Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.)*. *Food Chemistry*. **2008**, 107, (1), 185-192.
10. Bonerz, D., Würth, K., Dietrich, H., Will, F. *Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars*. *European Food Research and Technology*. **2007**, 224, (3), 355-364.
11. Kim, D.-O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., Lee, C.Y. *Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, (26), 9921-9927.
12. Mozetic, B., Trebse, P., Hribar, J. *Anthocyanins and hydroxycinnamic acids in sweet cherries*. *Food Technology and Biotechnology*. **2002**, 40, (3), 207-212.
13. Mozetic, B., Simčić, M., Trebse, P. *Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatment*. *Food Chemistry*. **2006**, 97, (2), 302-309.
14. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. *Food Chemistry*. **1999**, 66, (4), 401-436.
15. Wang, H., Nair, M.G., Iezzoni, A.F., Strasburg, G.M., Booren, A.M., Gray, J.I. *Quantification and characterization of anthocyanins in balaton tart cherries*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**, 45, (7), 2556-2560.
16. Chandra, A., Nair, M.G., Iezzoni, A. *Evaluation and characterization of the anthocyanin pigments in tart cherries (*Prunus cerasus* L.)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1992**, 40, (6), 967-969.
17. Chandra, A., Rana, J., Li, Y. *Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49, (8), 3515-3521.

18. Gao, L., Mazza, G. *Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1995**, 43, (2), 343-346.
19. Gonçalves, B., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E., Meyer, A.S. *Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (Prunus avium L.)*. Food Chemistry. **2007**, 103, (3), 976-984.
20. Kirakosyan, A., Seymour, E.M., Llanes, D.E.U., Kaufman, P.B., Bolling, S.F. *Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products*. Food Chemistry. **2009**, 115, (1), 20-25.
21. Seeram, N.P., Momin, R.A., Nair, M.G., Bourquin, L.D. *Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries*. Phytomedicine. **2001**, 8, (5), 362-369.
22. Wu, X., Prior, R.L. *Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53, (7), 2589-2599.
23. Luby, J.J., *Taxonomic Classification and Brief History*, in *Apples. Botany, production and uses*, Ferree, D.C., Warrington, I.J. **2003**, CABI Publishing, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique.
24. Henríquez, C., Speisky, H., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Simpson, R., Almonacid, S. *Development of an Ingredient Containing Apple Peel, as a Source of Polyphenols and Dietary Fiber*. Journal of Food Science. **2010**, 75, (6), H172-H181.
25. Jensen, E.N., Buch-Andersen, T., Ravn-Haren, G., Dragsted, L.O. *Mini-review: The effects of apples on plasma cholesterol levels and cardiovascular risk – a review of the evidence*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. **2009**, 34–41.
26. Walker, N.W. *Fresh vegetable and fruit juices*. **1978**, Norwalk Press, Arizona, Etats-Unis d'Amérique.
27. Queji, M.D., Wosiacki, G., Cordeiro, G.A., Peralta-Zamora, P.G., Nagata, N. *Determination of simple sugars, malic acid and total phenolic compounds in apple pomace by infrared spectroscopy and PLSR*. International Journal of Food Science and Technology. **2010**, 45, (3), 602-609.
28. Shahidi, F., Naczki, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. **2006**, CRC Press, Boca Raton, Etat Unis d'Amérique.
29. Wolfe, K.L., Liu, R.H. *Apple Peels as a Value-Added Food Ingredient*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2003**, 51, (6), 1676-1683.
30. Soares, M.C., Ribeiro, E.T., Kuskoski, E.M., Valdemiro Gonzaga, L., Lima, A., Filho, J.M., Fett, R. *Composition of phenolic acids content in apple (Malus sp) pomace*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. **2008**, 29, (2), 339-348.
31. Podsędek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., Markowski, J. *Compositional characterisation of some apple varieties*. European Food Research and Technology. **2000**, 210, (4), 268-272.
32. Escarpa, A., González, M.C. *High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties*. Journal of Chromatography A. **1998**, 823, (1-2), 331-337.
33. Ma, C.-M., Cai, S.-Q., Cui, J.-R., Wang, R.-Q., Tu, P.-F., Hattori, M., Daneshtalab, M. *The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry. **2005**, 40, (6), 582-589.
34. Frighetto, R.T.S., Welendorf, R.M., Nigro, E.N., Frighetto, N., Siani, A.C. *Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography*. Food Chemistry. **2008**, 106, (2), 767-771.

35. He, X., Liu, R.H. *Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2008**, 56, (21), 9905-9910.
36. D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Pacifico, S. *Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple*. Food Chemistry. **2006**, 98, (2), 285-290.
37. Cefarelli, G., D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Izzo, A., Mastellone, C., Pacifico, S., Piscopo, V. *Free-Radical-Scavenging and Antioxidant Activities of Secondary Metabolites from Reddened Cv. Annurca Apple Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54, (3), 803-809.
38. Fellows, P. *Food Processing Technology. Principles and Practice*. **2000**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Angleterre.
39. Kennedy, C., *Developments in freezing*, in *Food preservation techniques*, Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. **2003**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Angleterre.
40. Brennan, J.G., *Evaporation and Dehydration*, in *Food Processing Handbook*, Brennan, J.G. **2006**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Allemagne.
41. Plee, D. *Zéolites*. Techniques de l'Ingenieur - Genie des procedes. **2003**, J 6 675, 1-4.
42. Roustel, S. *Zéodratation*. Techniques de l'Ingénieur. **2011**, F3 010, 1-6.
43. ZeoDry+Plus. *Zéodratation par confinement. La haute technologie au service du naturel*. [http://www.zeodryplus.com/French/process\\_advantages.asp](http://www.zeodryplus.com/French/process_advantages.asp). (consulté le **17.03.2011**).
44. Richardson, J.F., Harker, J.H., Backhurst, J.R. *Coulson and Richardson's Chemical Engineering - 5th ed. Vol. II. Particle technology and separation processes*. **2002**, Butterworth-Heinemann,
45. Crank, J. *The mathematics of diffusion*. **1975**, Oxford Science Publication, Londre, Angleterre.
46. Priday, G., Silverblatt, C.E., Slottee, J.S., Smith, J.C., Todd, D.B., *Liquid-solid operations and equipment*, in *Perry's chemical engineers' handbook - 7th ed*, Perry, R.H., Green, W., Maloney, J.O. **1999**, The McGraw-Hill Companies, Inc., Etats Unis d'Amerique.
47. Aguilera, J.M., *Solid-Liquid Extraction*, in *Extraction optimization in food engineering*, Tzia, C., Liadakis, G. **2003**, Marcel Dekker, New York, Etats-Unis d'Amérique.
48. Singh, J., *Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants*, in *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. **2008**, International centre for science and high technology, Trieste, Italie.
49. Breithaupt, D.E. *Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction*. Food Chemistry. **2004**, 86, (3), 449-456.
50. Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns, J., Cifuentes, A. *Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography*. Journal of Chromatography A. **2004**, 1047, (2), 195-203.
51. Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., Kaminski, M. *Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. **2007**, 70, (2), 253-261.
52. Björklund, E., Nilsson, T., Bøwadt, S. *Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis*. Trends in Analytical Chemistry. **2000**, 19, (7), 434-445.

53. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*. Analytical Chemistry. **1996**, 68, (6), 1033-1039.
54. Kaufmann, B., Christen, P. *Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction*. Phytochemical Analysis. **2002**, 13, (2), 105-113.
55. Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C.G. *Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers*. Talanta. **2008**, 75, (5), 1332-1337.
56. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. *Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Ultrasonics Sonochemistry. **2007**, 14, (6), 767-778.
57. Diouf, P.N., Stevanovic, T., Boutin, Y. *The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts*. Industrial Crops and Products. **2009**, 30, (2), 297-303.
58. Entezari, M.H., Hagh Nazary, S., Haddad Khodaparast, M.H. *The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms*. Ultrasonics Sonochemistry. **2004**, 11, (6), 379-384.
59. Fu, C., Tian, H., Li, Q., Cai, T., Du, W. *Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace*. Ultrasonics Sonochemistry. **2006**, 13, (6), 511-516.
60. Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. *Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection*. Journal of Chromatography A. **2005**, 1100, (1), 1-7.
61. Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Ye, X.-Q. *Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound*. Ultrasonics Sonochemistry. **2009**, 16, (1), 57-62.
62. Patist, A., Bates, D. *Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2008**, 9, (2), 147-154.
63. McClements, D.J. *Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing*. Trends in Food Science & Technology. **1995**, 6, (9), 293-299.
64. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. *The uses of ultrasound in food technology*. Ultrasonics Sonochemistry. **1996**, 3, (3), S253-S260.
65. Mason, T.J., Paniwnyk, L., *Ultrasound as a preservation technology*, in *Food preservation techniques* Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. **2000**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Angleterre.
66. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. *Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research*. **2007**, 1, (1), 7-18.
67. Sparr Eskilsson, C., Björklund, E. *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A. **2000**, 902, (1), 227-250.
68. Anizon, J.-Y., Lemaire, B., Surbled, M. *Extraction assistée par microondes*. Techniques de l'ingénieur. **2003**, F 3060,
69. Lucchesi, M.-E., *Extraction sans solvant assistée par microondes. Conception et application à l'extraction des huiles essentielles*. 2005, Université de La Réunion St. Denis, France d'Outre Mer
70. Al-Harashseh, M., Kingman, S.W. *Microwave-assisted leaching--a review*. Hydrometallurgy. **2004**, 73, (3-4), 189-203.
71. Madej, K. *Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds*. Trends in Analytical Chemistry. **2009**, 28, (4), 436-446.

72. Desai, M., Parikh, J., Parikh, P.A. *Extraction of natural products using microwaves as a heat source*. Separation & Purification Reviews. **2010**, 39, (1), 1-32.
73. Regier, M., Schubert, H., *Microwave processing*, in *Thermal technologies in food technologies*, Richardson, P. **2001**, Woodhead Publishig Ltd., Cambridge, Angleterre.
74. Vierling, E. *Aliments et boissons. Technologies et aspects réglementaires*. **2003**, Vélizy: Doin Bordeaux : Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France.
75. Routray, W., Orsat, V. *Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review*. Food and Bioprocess Technology. **2011**, 1-16.
76. Bai, X.-L., Yue, T.-L., Yuan, Y.-H., Zhang, H.-W. *Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis*. Journal of Separation Science. **2010**, 33, (23-24), 3751-3758.
77. Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M., Sabliov, C.M. *Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation*. Bioresource Technology. **2010**, 101, (7), 2466-2471.
78. Chen, Y., Xie, M.-Y., Gong, X.-F. *Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering. **2007**, 81, (1), 162-170.
79. Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A., Esveld, D.C. *Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds*. Chemical Engineering and Processing. **2005**, 44, (12), 1320-1326.
80. Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D. *Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction*. Talanta. **2009**, 78, (1), 40-48.
81. Sahraoui, N., Vian, M.A., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C., Chemat, F. *Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD)*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. In Press, Corrected Proof,
82. Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. *Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology*. Journal of Food Engineering. **2007**, 78, (2), 693-700.
83. Variyar, P.S., Chatterjee, S., Sharma, A., *Fundamentals and theory of HPTLC-based separation*, in *HPTLC: High-Performance Thin-Layer Chromatography*, Srivastava, M. **2011**, Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
84. Morgan, N.Y., Smith, P.D., *HPLC detectors*, in *Handbook of HPLC*, Coradini, D. **2011**, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, Etats Unis d'Amérique.
85. Agilent, *Manuel d'utilisation du détecteur à barrette de diodes Agilent*. 2009, Agilent Technologies: Allemagne.
86. SEDEXLT-ELSD, *A better way to get more from HPLC / MS analysis. Introduction to Sedex Detectors*, France, S., Editor: Alfortville, France.
87. [www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/graphics/carey04oc/ch13/figures/1334.gif](http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/graphics/carey04oc/ch13/figures/1334.gif). (consulté le **11. 08.2011**).
88. Gross, J.H. *Mass Spectrometry. A text book*. **2004**, Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
89. Bouchoux, G., Sablier, M. *Spectrométrie de masse - Principe et appareillage*. Techniques de l'Ingenieur - Spectrométrie. **2005**, P 2 645, 1-32.
90. Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodriguez, E., Obendorf, R.L. *Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. 'Montgomery' fruits*. Food Chemistry. **2008**, 111, (4), 1017-1024.
91. Määttä, K.R., Kamal-Eldin, A., Törrönen, A.R. *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode Array*

- and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: *Ribes* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, (23), 6736-6744.
92. Rubilar, M., Pinelo, M., Shene, C., Sineiro, J., Nuñez, M.J. *Separation and HPLC-MS Identification of Phenolic Antioxidants from Agricultural Residues: Almond Hulls and Grape Pomace*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, (25), 10101-10109.
93. Guo, S., Duan, J.-A., Tang, Y.-P., Yang, N.-Y., Qian, D.-W., Su, S.-L., Shang, E.-X. *Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of Ziziphus Species by HPLC-ELSD-MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, (10), 6285-6289.
94. Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B. *Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection*. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1164, (1-2), 145-152.
95. Shen, D., Pan, M.-H., Wu, Q.-L., Park, C.-H., Juliani, H.R., Ho, C.-T., Simon, J.E. *LC-MS Method for the Simultaneous Quantitation of the Anti-inflammatory Constituents in Oregano (*Origanum* Species)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, (12), 7119-7125.
96. Westman-Brinkmalm, A., Brinkmalm, G., *A Mass spectrometer's building blocks, in Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation, and applications*, Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A. **2009**, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, Etats-Unis d'Amérique.
97. Gaskell, S.J. *Electrospray: principles and practice*. *Journal of Mass Spectrometry*. **1997**, 32, (7), 677-688.
98. <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php>. (consulté le **12.08.2011**).
99. de Hoffmann, E., Stroobant, V. *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. **2007**, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, Royaume Uni.
100. Dass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. **2007**, Jonh Wiley & Sons, Inc., New Jersey, Etats Unis d'Amérique.
101. *APCI Heated Nebulizer Ion Source Manual*, AB Sciex Biosystems, A., Editor.
102. [www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html](http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html) (consulté le **12.08.2011**).
103. Radcliffe, C., Maguire, K., Lockwood, B. *Applications of supercritical fluid extraction and chromatography in forensic science*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2000**, 43, (1-3), 261-272.
104. Rosset, R., Caude, M., Jardy, A. *Chromatographies en phases liquide et supercritique*. **1991**, Masson, Paris, France.
105. Guiochon, G., Tarafder, A. *Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography*. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, (8), 1037-1114.
106. McAvoy, Y., Bäckström, B., Janhunen, K., Stewart, A., Cole, M.D. *Supercritical fluid chromatography in forensic science: a critical appraisal*. *Forensic Science International*. **1999**, 99, (2), 107-122.
107. De Klerck, K., Mangelings, D., Heyden, Y.V. *Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (0),
108. Phinney, K.W. *Enantioselective separations by packed column subcritical and supercritical fluid chromatography*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2005**, 382, (3), 639-645.
109. Byrne, N., Hayes-Larson, E., Liao, W.-W., Kraml, C.M. *Analysis and purification of alcohol-sensitive chiral compounds using 2,2,2-trifluoroethanol as a modifier in*



- supercritical fluid chromatography*. Journal of Chromatography B. **2008**, 875, (1), 237-242.
110. De Klerck, K., Mangelings, D., Clicq, D., De Boever, F., Vander Heyden, Y. *Combined use of isopropylamine and trifluoroacetic acid in methanol-containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography*. Journal of Chromatography A. (0),
111. Ibañez, E., Li, W., Malik, A., Lee, M.L. *Low flow rate modifier addition in packed capillary column supercritical fluid chromatography*. Journal of High Resolution Chromatography. **1995**, 18, (9), 559-563.
112. Smith, R.M. *Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future*. Journal of Chromatography A. **1999**, 856, (1–2), 83-115.
113. Berger, T., Greibrokk, T., *Instrumentation for SFC and SFE*, in *Practical supercritical fluid chromatography and extraction*, Caude, M., Thiébaud, D. **1999**, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Olande.
114. Majewski, W., Valery, E., Ludemann-Hombourger, O. *Principle and Applications of Supercritical Fluid Chromatography*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **2005**, 28, (7-8), 1233-1252.
115. Robbins, L.A., Cusack, R.W., *Liquid-liquid extraction operations and equipment*, in *Perry's chemical engineers' handbook - 7th ed*, Perry, R.H., Green, W., Maloney, J.O. **1999**, The McGraw-Hill Companies, Inc., Etats Unis d'Amérique.
116. Liu, Y., Lopez-Avila, V., Alcaraz, M., Jones, T.L. *Centrifugal Partition Chromatographic Extraction of Phenols and Organochlorine Pesticides from Water Samples*. Analytical Chemistry. **1994**, 66, (24), 4483-4489.
117. Marchal, L., Legrand, J., Foucault, A. *Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field*. The Chemical Record. **2003**, 3, (3), 133-143.
118. Toribio, A., *Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt*. 2007, Université de Reims Champagne-Ardenne: Reims Champagne-Ardenne, France. p. 234.
119. Ndhlala, A., Moyo, M., Van Staden, J. *Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?* Molecules. **2010**, 15, (10), 6905-6930.
120. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities*. Food Analytical Methods. **2009**, 2, (1), 41-60.
121. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53, (6), 1841-1856.
122. Roginsky, V., Lissi, E.A. *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. Food Chemistry. **2005**, 92, (2), 235-254.
123. Polmear, I.J., *The elements*, in *Chemistry of aluminium, gallium indium, and thallium*, Downs, A.J. **1993**, Chapman & Hall, Londre, Angleterre.
124. Fringuelli, F., Pizzo, F., Vaccaro, L. *AlCl<sub>3</sub> as an efficient Lewis acid catalyst in water*. Tetrahedron Letters. **2001**, 42, (6), 1131-1133.
125. Satterfield, M., Brodbelt, J.S. *Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. **2001**, 12, (5), 537-549.
126. Cornard, J.P., Merlin, J.C. *Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations*. Polyhedron. **2002**, 21, (27–28), 2801-2810.
127. Cornard, J.P., Merlin, J.C. *Comparison of the chelating power of hydroxyflavones*. Journal of Molecular Structure. **2003**, 651–653, (0), 381-387.

128. Satterfield, M., Brodbelt, J.S. *Enhanced Detection of Flavonoids by Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*. **2000**, 72, (24), 5898-5906.
129. Zhang, J., Wang, J., Brodbelt, J.S. *Characterization of flavonoids by aluminum complexation and collisionally activated dissociation*. *Journal of Mass Spectrometry*. **2005**, 40, (3), 350-363.
130. Cornard, J.P., Merlin, J.C. *Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2002**, 92, (1), 19-27.
131. Ismail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., Ismail, M. *Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (cucumis melo) methanolic extracts*. *Food Chemistry*. **2010**, 119, (2), 643-647.
132. Boudier, A., Tournebize, J., Bartosz, G., El Hani, S., Bengueddour, R., Sapin-Minet, A., Leroy, P. *High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants*. *Analytica Chimica Acta*. **2012**, 711, (0), 97-106.
133. Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. *Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*. *Journal of Food Science*. **2003**, 68, (2), 487-490.
134. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239, (1), 70-76.
135. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, (10), 4290-4302.





## **CHAPITRE III**

# **COMPOSES BIOACTIFS OBTENUS DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS**

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**





### III. 1. COMPOSES BIOACTIFS DE CERISES

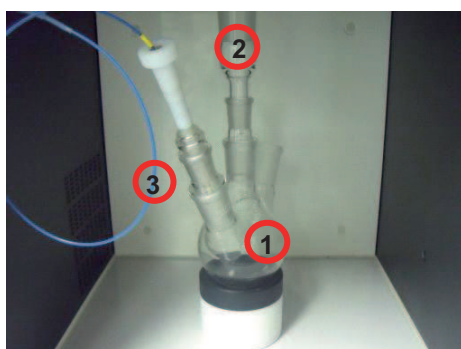
Le choix de la méthode et du solvant d'extraction est fondamental pour un processus optimal. Il dépend premièrement de la source et du type des composés à extraire et il doit assurer un rendement élevé sans dégradation de composés [1].

L'extraction solide-liquide est la méthode la plus utilisée pour l'extraction de composés bioactifs à partir d'un matériel végétal. Afin de choisir le solvant adéquat, il est nécessaire de connaître ses propriétés, ses interactions avec la matrice végétale et son pouvoir de solubiliser les analytes d'intérêt. De plus, le solvant doit présenter une bonne sélectivité pour les composés à extraire et il doit être compatible avec la méthode utilisée pour l'analyse des extraits [2].

Les anthocyanines sont des composés phénoliques solubles dans des solvants polaires. Ils sont extraits d'une grande variété de végétaux [3-6] par extraction solide-liquide en utilisant des solvants tels que le MeOH [7], l'EtOH [8] ou l'eau [9]. Même si différentes études stipulent que l'ajout d'acide dans le solvant d'extraction peut entraîner l'hydrolyse totale ou partielle des anthocyanes acylés [10] ou conduire à une dégradation des pigments d'intérêt lors de leur concentration pendant l'évaporation des extraits, plusieurs études ont montré que les acides diminuent le pH de la solution et limitent la dégradation des anthocyanines non-acylés. Par conséquent, les solvants d'extraction sont souvent acidifiés avec différentes proportions d'acide chlorhydrique [11], formique ou acétique [12].

Nous avons vu lors de la description du matériel végétal du deuxième chapitre que les anthocyanines se trouvent aussi dans les cerises dont ils sont responsables de la couleur rouge.

Puisque ces composés sont facilement dégradables, nous avons essayé de développer au cours de nos travaux une méthode d'extraction rapide en utilisant l'irradiation microondes. Cette technique modifie la texture du matériel végétal et augmente la diffusion des analytes par l'augmentation de la perméabilité cellulaire. Les microondes sont capables d'entraîner la rupture de cellules du fait de leur fort pouvoir de pénétration qui conduit à une amélioration du transfert de matière de l'intérieur vers l'extérieur du matériel végétal. L'extraction assistée par microondes peut être conduite soit avec des faibles volumes de solvants considérés biodégradables tels que l'eau ou l'EtOH soit sans solvant (dans ce cas l'eau existant dans les cerises est utilisée comme solvant d'extraction). Une installation ouverte (Figure III.1) a été adaptée pour l'extraction des anthocyanines de cerises.



**Figure III.1. Installation d'extraction microondes**

1 – ballon d'extraction, 2 – réfrigérant, 3 – fibre optique qui mesure la température

Nous allons voir par la suite quelles sont les meilleures conditions pour l'extraction des anthocyanines de cerises.

### **III. 1. 1. Extraction sans solvant assistée par microondes des anthocyanines de cerises**

#### **III. 1. 1. 1. Influence des paramètres d'extraction**

##### **III. 1. 1. 1. 1. Influence du solvant d'extraction**

Afin de déterminer quel est le solvant d'extraction le plus adéquat nous avons réalisé des extractions à l'eau et à l'éthanol (Annexe 1) – solvants polaires capables de solubiliser les anthocyanines et ayant la propriété de bien absorber les ondes électromagnétiques.

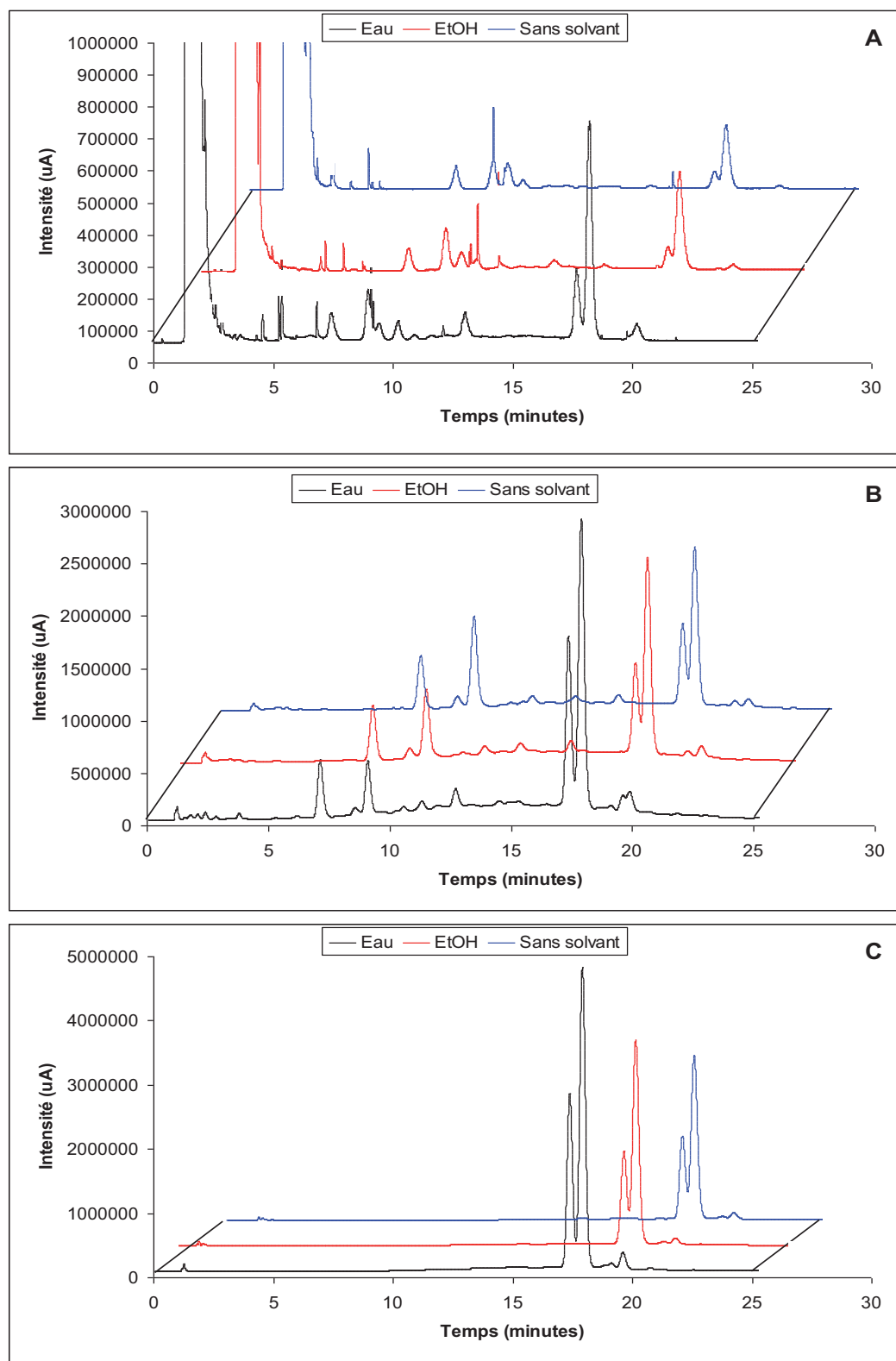
En nous basant sur le fait que sous l'effet des pressions et des températures élevées atteintes à l'intérieur d'un matériel végétal contenant des molécules polaires, les parois cellulaires vont se détruire permettant la libération des composés d'intérêt, nous avons réalisé également des extractions sans solvant.

Une quantité d'environ 5 g de cerises congelées a été soumise à l'extraction assistée par microondes. Un volume de 5 mL de solvant a été suffisant pour couvrir complètement les cerises. Cette condition est nécessaire pour avoir un échauffement du mélange (échantillon végétal-solvant) et une extraction plus homogènes. Une puissance de 100 W a été appliquée pendant 3 minutes.

Lors de l'extraction (avec ou sans solvant) nous avons constaté que pendant environ une minute la température à l'intérieur du réacteur reste faible ne dépassant pas la valeur de 30 – 40°C. Ceci peut être dû à la décongélation des cerises. Une fois la décongélation terminée, la température augmente et arrive à une valeur proche de 100°C pour l'extraction avec eau ou EtOH et ne dépasse pas 60°C dans le cas de l'extraction sans solvant. Cette différence de température peut s'expliquer par le fait que les solvants utilisés absorbent par eux mêmes les ondes électromagnétiques et s'échauffent fortement tandis que dans le cas d'une extraction sans solvant l'eau constitutive du matériel végétal nécessite plus de temps pour traverser les cellules végétales et dispose d'une période plus courte pour s'échauffer une fois migrée de l'intérieur vers l'extérieur de cellules.

Les extraits obtenus ont été filtrés sur filtres seringue et 20 µL ont été ensuite analysés par HPLC. La méthode d'analyse a été développée sur une colonne de silice greffée C18 type Purospher Star RP C18e en utilisant une phase mobile constituée d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B). Les études bibliographiques réalisées indiquent le fait que les anthocyanines sont plus stables sous forme protonée. Pour cela nous avons acidifié l'eau de la phase mobile en rajoutant 1% TFA. L'élution en mode isocratique n'a pas conduit à une séparation acceptable des composés présents dans les extraits de cerises. Par conséquent un gradient linéaire d'élution a été utilisé. La détection des molécules extraites a été réalisée à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) qui permet de détecter les composés non volatils. 3 longueurs d'ondes différentes ont été utilisées pour le DAD : 254 nm et 280 nm pour les composés phénoliques et 520 nm pour les anthocyanines.

L'analyse chromatographique des extraits de cerises réalisés dans l'eau, l'éthanol ou sans solvant est reportée sur la Figure III.2.



**Figure III.2. Influence de la nature du solvant sur l'extraction de composés de cerises**

Colonne : Purospher STAR RP C18e (LxΦ = 125x4 mm, 5µm)

Détection A : DEDL : température 52°C, pression 2,2 bars, gain 8 ; B : UV : 280 nm ; C : Vis : 520 nm

Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O acidifiée avec 1% TFA ; B. MeOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>

Gradient d'élution : 0 - 25 min, 5 - 65% B

Les extraits analysés sont complexes et présentent tous le même profil chromatographique. La détection par DEDL permet de visualiser les composés qui



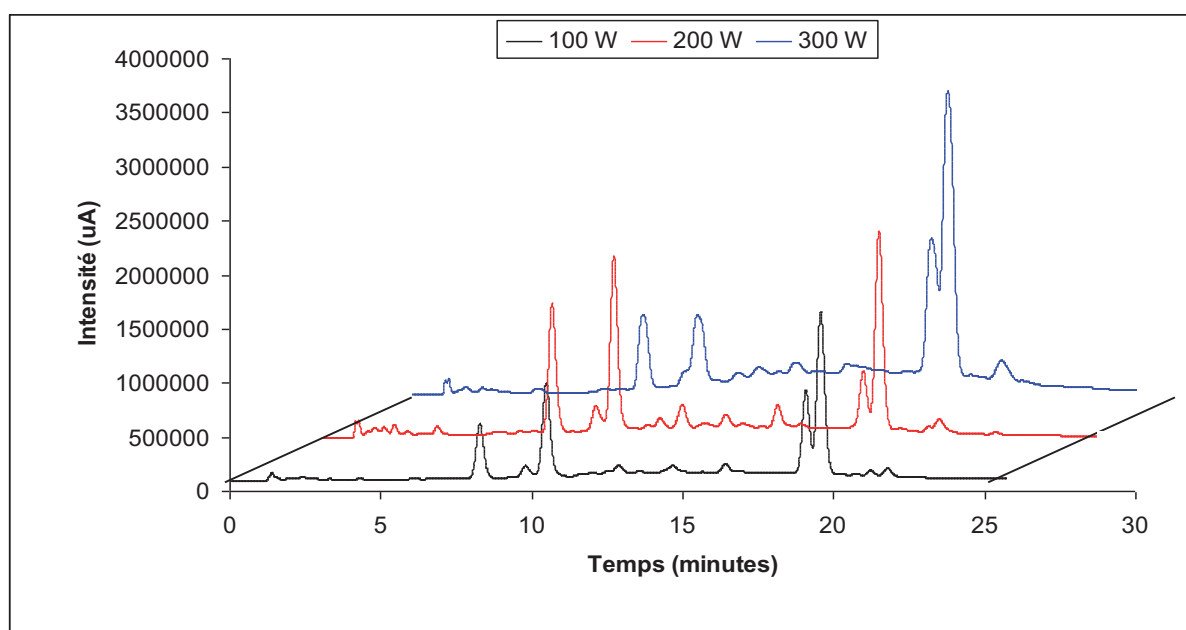
n'absorbent pas en UV aux longueurs d'onde choisies. Pour ces trois conditions d'extraction les mêmes composés ont été extraits dans des proportions similaires (l'extrait aqueux est un peu plus concentré que les deux autres). L'extraction microondes sans solvant étant une méthode plus verte, moins coûteuse et conduisant à des extraits comparables aux extraits avec solvant et directement utilisables a donc été choisie pour la suite de l'étude.

### III. 1. 1. 2. Influence de la puissance microondes

Afin d'évaluer l'influence de la puissance de l'irradiation microondes sur le processus d'extraction, des extractions sans solvant de 3 minutes ont été réalisées à 3 puissances différentes : 100 W, 200 W, 300 W à partir d'une quantité d'environ 5 g de cerises congelées.

L'augmentation de la puissance microondes a entraîné une augmentation de la température à l'intérieur du réacteur. La valeur enregistrée a été de 121°C pour les extractions réalisées à 200 et à 300 W.

Les extraits obtenus ont été traités et analysés dans les conditions décrites auparavant et leurs profils chromatographiques (illustrés dans la Figure III.3) nous indiquent le fait que des quantités plus élevées d'anthocyanines ( $t_r = 17 - 18$  min) sont extraites si la puissance microondes utilisée est plus importante. En revanche, l'augmentation de la puissance microondes semble entraîner une diminution des quantités de composés phénoliques extraits ( $t_r < 17$  min).



**Figure III.3. Influence de la puissance microondes sur l'extraction de composés de cerises**

Colonne : Purospher STAR RP C18e (LxΦ = 125x4 mm, 5μm) ; Détection : UV 280 nm ;

Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O acidifiée avec 1% TFA ; B. MeOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>

Gradient d'élution : 0 - 25 min, 5 - 65% B

Puisque l'extraction des anthocyanines augmente avec la puissance d'extraction nous avons réalisé des extractions à 1000 W (puissance maximale de l'appareil). Toutefois pour éviter une trop forte augmentation de la température qui ne doit pas excéder 200°C (consigne constructeur), le temps d'extraction a été réduit.

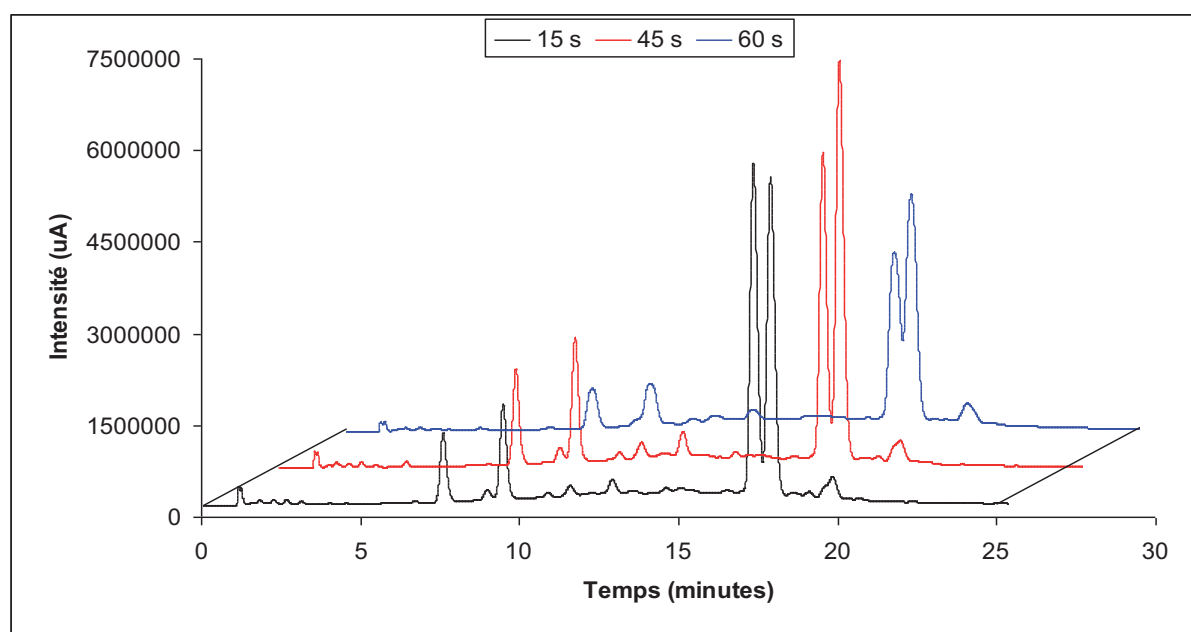
### III. 1. 1. 3. Influence de la durée d'extraction

Pour déterminer la durée optimale du processus nous avons réalisé des extractions de 15, 45 et 60 s en soumettant une quantité plus importante de cerises congelées (environ 15 g) à une puissance microondes de 1000 W.

Le temps de décongélation a été considérablement réduit (quelques secondes).

En ce qui concerne la température atteinte au cours de l'extraction, nous avons constaté que si pour une durée du processus de 15 s elle n'excède pas 43°C, pour un temps de 45 s ou de 60 s elle se situe autour de 121°C. Dans le dernier cas l'extrait commence à s'évaporer, ce qui conduit à une dégradation des composés. De plus, une caramélisation des sucres a été constatée.

Les profils chromatographiques des extraits (Figure III.4) des anthocyanines de cerises confirment que la durée optimale d'extraction à une puissance microondes de 1000 W est de 45 s.



**Figure III.4. Influence du temps sur l'extraction de composés de cerises**

Colonne : Purospher STAR RP C18e (LxΦ = 125x4 mm, 5μm) ; Détection : UV 280 nm ;  
Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O acidifiée avec 1% TFA ; B. MeOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>  
Gradient d'élution : 0 - 25 min, 5 - 65% B

D'après les résultats de notre étude nous pouvons indiquer que les quantités les plus importantes d'anthocyanines de cerises peuvent être obtenues en utilisant les conditions d'extraction assistée par microondes suivantes:

- solvant : aucun ;
- puissance de l'irradiation électromagnétique : 1000 W ;
- durée du processus : 45 s.

### III. 1. 2. Application de la méthode d'extraction optimisée

En retenant les conditions optimales d'extraction déterminées nous avons choisi de réaliser des extractions à partir d'une quantité plus importante de matériel végétal. Ainsi environ 50 g de cerises ont été soumis à l'extraction assistée par microondes sans solvant. Afin d'épuiser le matériel végétal 4 cycles d'extraction de 45 s ont été nécessaires. Pour éviter les possibles dégradations de composés, après chaque cycle l'extrait obtenu a été récupéré et seule la matrice végétale a été soumise à un nouveau cycle d'extraction. Comme nous pouvons le constater sur la Figure III.5 à la fin des 4 cycles d'extraction les cerises ont été desséchées et plus aucune trace de jus n'est disponible pour l'extraction.



**Figure III.5. Photographies montrant l'évolution de cerises au cours de l'extraction**  
*A. cerises avant l'extraction ; B. 1 cycle d'extraction ; C. 2 cycles d'extraction ;  
 D. 3 cycles d'extraction ; E. 4 cycles d'extraction*

Un volume final d'environ 30 mL d'extrait a été obtenu à partir de 50 g de cerises. Un aliquote de 20  $\mu$ L a été immédiatement analysé par HPLC sans aucun traitement préliminaire et l'empreinte chromatographique obtenue a été similaire à celle de l'extrait obtenu à partir d'une quantité plus faible de cerises ce qui indique que la quantité du matériel végétal n'influence pas le processus d'extraction d'anthocyanines.

### III. 1. 3. Séchage des extraits de cerises

A l'intérieur de la matrice végétale les anthocyanines sont stabilisés par un pH acide, par l'inter- ou l'intra-co pigmentation, par l'association spontanée ou par complexation avec des ions métalliques [13] mais une fois séparés de leur milieu d'origine ils se dégradent rapidement.

Afin d'assurer l'utilisation d'un même extrait sur une longue période pour l'analyse et la purification des composés d'intérêt il nous a semblé approprié de chercher une méthode de conservation efficace.

Dans ce but, nous avons comparé les effets de la *congélation*, du *séchage sous un flux d'azote* et de la *lyophilisation*. Les extraits conservés ont été ré analysés par HPLC dans les mêmes conditions que les extraits frais.

Les profils chromatographiques obtenus ont clairement montré que *la congélation* de l'extrait liquide à  $-20^{\circ}\text{C}$  est adéquate pour préserver les extraits. Cependant après plusieurs cycles de décongélation – congélation une baisse de l'intensité des pics des composés d'intérêt et l'apparition de nouveaux pics ont été observée.

*L'évaporation sous azote* durant 12 h a conduit également à des dégradations des composés d'autant plus que ce processus est accélérée par l'hygroscopie de l'extrait sec.

En revanche, *la lyophilisation* assure une bonne préservation de l'extrait ce qui peut être expliqué par le fait que la congélation rapide à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$  stoppe immédiatement la dégradation des molécules d'intérêt. L'extrait sec est ensuite conservé au congélateur et seule la quantité nécessaire à l'analyse est prélevée. Même si cette méthode implique une plus forte consommation d'énergie et nécessite plus de temps (plusieurs étapes

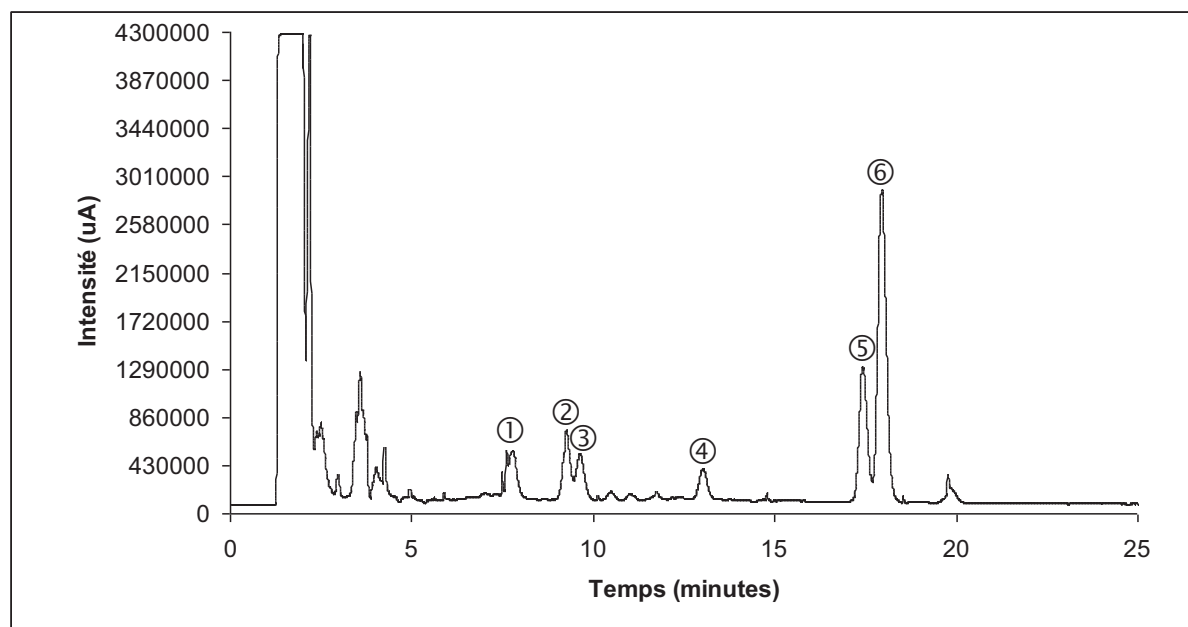
successives de congélation – lyophilisation) elle est capable d'assurer une bonne conservation des composés extraits pour une longue période (testée sur six mois sans dégradation).

La quantité d'extrait sec obtenu après lyophilisation (3,16 g) a été rapportée à celle de cerises fraîches soumises à l'extraction (53,37 g). Le rendement d'extraction ainsi déterminé a été d'environ 6%.

### III. 1. 4. Caractérisation des extraits de cerises

En regardant les empreintes chromatographiques des extraits nous pouvons remarquer la présence de différents composés.

L'utilisation du DEDL (Figure III.6) permet de détecter tous les composés présents même ceux qui ne présentent pas de groupements chromophores. La forte intensité des pics observée à l'aide de ce type de détecteur est un indicateur plus fiable des proportions relatives de composés extraits que le détecteur UV.



**Figure III.6. Chromatogramme de l'extrait de cerises obtenu dans les conditions optimales d'extraction**

Colonne : Purospher STAR RP C18e (LxΦ = 125x4 mm, 5μm) ;

Détection : DEDL : température de nébulisation, 52°C ; pression du gaz de nébulisation, 2,2 bars ; gain, 7

Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O acidifiée avec 1% TFA ; B. MeOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>

Gradient d'élution : 0 - 25 min, 5 - 65% B

Les molécules fortement polaires non retenues sur la phase stationnaire dans les conditions chromatographiques développées et non détectables en UV peuvent être des sucres tels que le fructose ou le saccharose souvent présents dans les cerises.

Afin de pouvoir identifier les familles moléculaires des autres composés extraits nous avons analysé dans les mêmes conditions chromatographiques une standard d'acide chlorogénique (Tableau III.1). La comparaison de son temps de rétention et de son spectre d'absorption avec ceux des composés présents dans les extraits de cerises nous a permis de confirmer la présence des acides phénoliques (7 < tr < 15 minutes) décrits dans la littérature [7, 14-18].

Tableau III.1. Absorption UV des composés majoritaires des extraits de cerises

	<i>Composés</i>	<i>Pic d'extrait</i>	<i>t<sub>r</sub> (min)</i>	<i>λ max (nm)</i>
<i>Composés phénoliques</i>	Acide chlorogénique (standard)		10,1	324
	Acides phénoliques des extraits de cerises	1	7,7	324
		2	9,1	312
		3	9,5	310
<i>Anthocya nines</i>	Cy-3- <i>O</i> -glucoside chloride (standard)	4	11,7	323
			15,5	518
	Anthocyanines des extraits de cerises		16,3	520
		5	17,3	518
	6	17,9	520	

Les spectres UV des deux pics majoritaires ayant des temps de rétention autour de 18 min ont montré une bande d'absorption à 520 nm (longueur d'onde spécifique des anthocyanines). La littérature indiquant que la cyanidine-3-*O*-glucoside et la cyanidine-3-*O*-rutinoside sont les anthocyanines majoritaires dans les cerises [15, 19] nous avons analysé les standards de chlorure de cyanidine-3-*O*-glucoside et de chlorure de cyanidine-3-*O*-rutinoside. Nous avons constaté que ces deux composés ont des temps de rétention et des spectres d'absorption proches de ceux des composés des extraits de cerises (Tableau III.1).

### III. 1. 5. Isolement et purification des anthocyanines de cerises

Notre étude est axée sur l'isolement et la purification des anthocyanines des extraits de cerises.

Pour cela nous avons envisagé deux approches différentes de fractionnement:

- la chromatographie de partage centrifuge
- la HPLC semi-préparative.

#### III. 1. 5. 1. Fractionnement des extraits de cerises par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Afin de séparer les différentes catégories de composés présents dans les extraits bruts et faciliter leur identification ultérieure par LC-MS, un fractionnement par extraction liquide-liquide peut être envisagé.

Nous avons vu dans le deuxième chapitre de ce manuscrit que la chromatographie de partage centrifuge est une technique de fractionnement liquide-liquide dont le principe de séparation se base sur le partage des solutés entre deux phases liquides non-miscibles. Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (rotor) par un champ de force centrifuge constant généré par la rotation de la colonne sur elle-même. L'autre phase liquide « mobile » est pompée au travers de la phase stationnaire.

La première étape à réaliser lors d'un fractionnement par CPC est de chercher le meilleur mélange de solvants pouvant assurer un partage adéquat de composés. Pour cela des essais préliminaires ont été réalisés.

Ainsi, 100 µL d'extrait obtenu dans les conditions optimales ont été mis en contact avec 2 mL de mélange de différents solvants plus ou moins polaires. Le choix de ces solvants a été basé sur leur capacité de solubiliser les composés polaires tels que les anthocyanines.

8 combinaisons différentes ont été testées :

- EtOAc / H<sub>2</sub>O (50 / 50) ;
- EtOAc / MeOH / H<sub>2</sub>O (40 / 10 / 50) ;
- EtOAc / EtOH / H<sub>2</sub>O (40 / 10 / 50) ;
- BuOH / H<sub>2</sub>O (50 / 50) ;
- BuOH / MeOH / H<sub>2</sub>O (45 / 5 / 50) ;
- BuOH / MeOH / H<sub>2</sub>O (40 / 10 / 50) ;
- BuOH / MeOH / H<sub>2</sub>O (35 / 15 / 50) ;
- BuOH / EtOH / H<sub>2</sub>O (40 / 10 / 50).

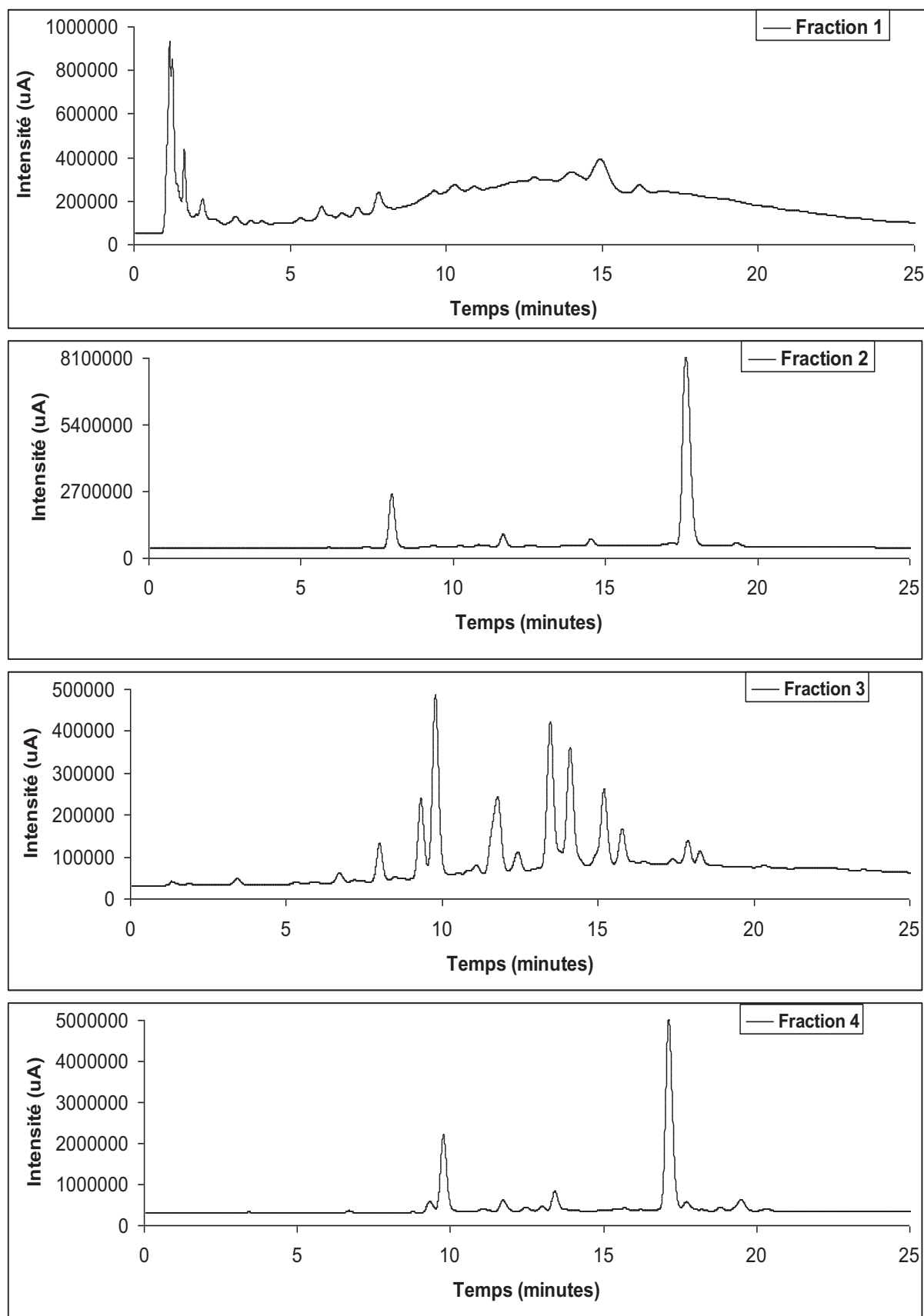
Après agitation, les phases supérieures et inférieures sont séparées et analysées par la méthode HPLC développée précédemment. Finalement le système de solvants BuOH / H<sub>2</sub>O (50 / 50) a été choisi pour la séparation CPC en utilisant les conditions suivantes:

- volume d'échantillon non-dilué injecté : 8 mL ;
- phase stationnaire : butanol ;
- phase mobile : eau ;
- mode : descendant ;
- volume de la colonne : 200 mL ;
- débit de phase mobile lors de l'élution : 1 mL.min<sup>-1</sup> ;
- débit de phase mobile lors de l'extrusion : 8 mL.min<sup>-1</sup> ;
- vitesse de rotation de la colonne pendant l'élution : 1200 tr.min<sup>-1</sup> ;
- vitesse de rotation de la colonne pendant l'extrusion : 300 tr.min<sup>-1</sup>.

44 tubes à essais ont été collectés directement en sortie de colonne et ensuite analysés en HPLC. Les tubes ont été ensuite regroupés selon leur similitude de composition. Les 4 fractions finales obtenues ont été évaporées à sec sous vide pour concentrer les composés, reprises dans un volume de 5 mL d'un mélange (50% MeOH / 50% H<sub>2</sub>O) acidifié avec 1% TFA et analysées de nouveau en HPLC.

Les profils chromatographiques (présentés dans la Figure III.7) montrent que la fraction 1 contient plutôt les composés les plus polaires de l'extrait alors que la fraction 3 regroupe les acides phénoliques. Les fractions 2 et 4 ont des profils chromatographiques assez proches et moins riches que celui de la fraction 3. Les pics majoritaires détectés vers 17 min pour ces deux fractions absorbent à 520 nm suggérant la présence d'anthocyanines.

Le fractionnement par CPC peut s'avérer avantageux du fait de l'absence de support solide qui permet la récupération de tout l'échantillon et de la possibilité d'injecter l'extrait directement. Toutefois, le fractionnement a duré environ 5 heures et a nécessité l'utilisation d'un volume d'environ 1 L de solvant. De plus, l'analyse chromatographique ultérieure de tous les tubes obtenus (environ 24 heures), le rassemblement des tubes selon leurs profils chromatographiques et l'évaporation à sec des fractions peuvent entraîner certaines dégradations de composés. Par conséquent, une autre méthode de fractionnement permettant de diminuer la durée totale de purification a été évaluée.



**Figure III.7. Analyse HPLC des 4 fractions CPC obtenues par fractionnement d'un extrait brut de cerises**  
 Colonne : Purospher STAR RP C18e (LxΦ = 125x4 mm, 5µm) ; Détection : UV 280 nm, Vis 520 nm ;  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O acidifiée avec 1% TFA ; B. MeOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>  
 Gradient d'élution : 0 - 25 min, 5 - 65% B

### III. 1. 5. 2. Fractionnement des extraits de cerises par HPLC semi-préparative (CSP)

La chromatographie préparative (généralement sur gel de silice) et la chromatographie à contre courant sont souvent utilisées pour fractionner et isoler des composés purs de matrices végétales. Comme nous avons vu la CPC peut s'avérer longue et nécessiter plusieurs étapes.

La chromatographie semi-préparative en mode phase inverse peut constituer alors un bon compromis. Comparé à l'HPLC préparative, cette technique nécessite des volumes moins importants de solvants purs et n'implique pas des systèmes de solvants non-miscibles (souvent polluants) comme la chromatographie à contre courant.

Afin d'isoler les composés des extraits de cerises nous avons essayé de transposer la méthode développée précédemment de l'échelle analytique à l'échelle semi-préparative en visant également un processus plus vert.

Conformément à l'étude réalisée par Pat Sandra [20] un procédé vert implique :

- Premièrement, **la diminution de l'utilisation de solvants ou d'additifs nocifs**. Pour cela, le méthanol et l'acétonitrile (dont la fabrication à partir de l'acrylonitrile est fortement consommatrice d'énergie et se déroule avec dégagement de NO<sub>2</sub>) qui sont considérés comme des solvants toxiques peuvent être remplacés par l'EtOH qui est biodégradable et qui se caractérise par une viscosité plus importante et une volatilité plus faible ce qui peut assurer une stabilité plus élevée de la phase mobile. En ce qui concerne les additifs souvent ajoutés dans la phase mobile l'acide trifluoroacétique (TFA) (cytotoxique, corrosif, persistant dans l'environnement) peut être remplacé par l'acide formique.
- Deuxièmement, il est nécessaire de **réduire la consommation d'énergie**. Les procédés plus rapides et plus efficaces peuvent fortement contribuer à atteindre cet objectif.
- Troisièmement, **ne doit pas conduire à l'obtention de quantités élevées de déchets de solvants**. Le recyclage et la miniaturisation constituent des alternatives aux systèmes chromatographiques classiques.

Nous avons essayé d'appliquer ces principes lors de l'isolement des anthocyanines des extraits de cerises.

Ainsi une colonne Hypersil H5 C18 a été utilisée en tant que phase stationnaire. La phase mobile a été constituée d'eau comme solvant A et d'EtOH comme solvant B. Les deux solvants ont été acidifiés avec 1% d'acide formique afin d'assurer un pH acide nécessaire pour maintenir les anthocyanines sous leur forme stable. L'élution de composés a été réalisée en mode isocratique (86% A / 14% B) et le débit de la phase mobile a été de 4 mL.min<sup>-1</sup>.

Afin de réduire les volumes de déchets de solvants, nous avons essayé de développer un système de recyclage de la phase mobile. Comme illustré dans la Figure III.8 lors d'un processus de fractionnement on ne récupère que les fractions contenant les composés d'intérêt (flèches bleues). L'utilisation d'un mode d'élution isocratique et une bonne séparation des pics permet de renvoyer la phase mobile dans son flacon d'origine (flèches vertes) entre chaque collecte de fraction au lieu de l'envoyer comme généralement directement à la poubelle.



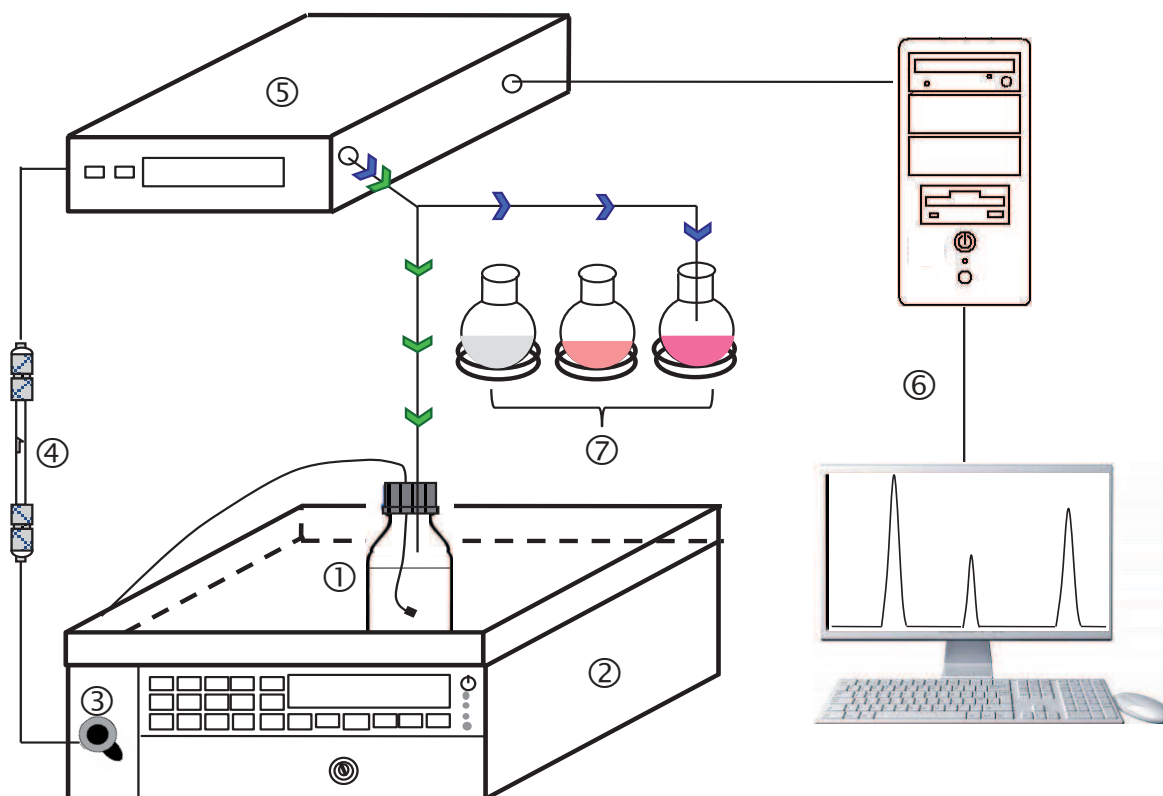


Figure III.8. Représentation schématique du système « boucle fermée » développé lors du fractionnement par HPLC semi-préparative pour la réutilisation de la phase mobile

1 – récipient phase mobile ; 2 – pompe HPLC ; 3 – vanne d'injection ; 4 – colonne chromatographique ; 5 – détecteur ; 6 – système acquisition données ; 7 – collecte de fractions

Trois solutions de différentes concentrations (10 ; 100 and 500 mg.mL<sup>-1</sup>) préparées par dilution de l'extrait de cerises dans la phase mobile ont été injectées avec une boucle d'injection de 100 µL. Nous avons remarqué qu'au delà de 500 mg.mL<sup>-1</sup> la solubilité de l'extrait n'est pas suffisante pour une injection directe en HPLC.

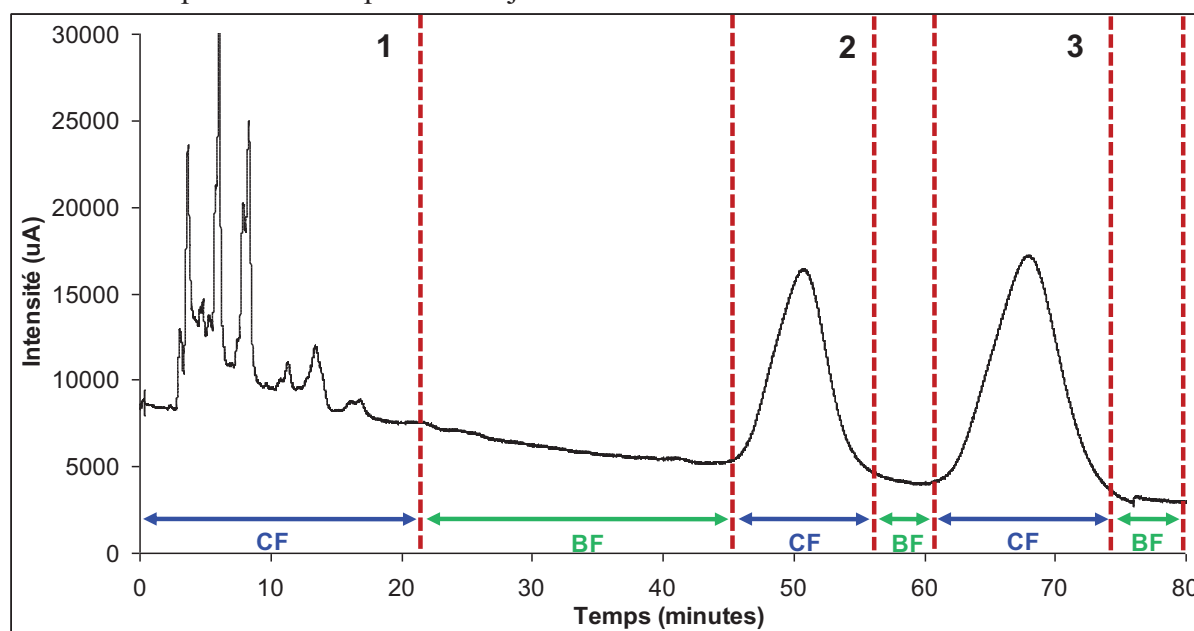


Figure III.9. Profil chromatographique (HPLC semi-préparative) de l'extrait de cerises  
CF – collecte des fractions 1, 2, 3 ; BF – boucle fermée

Colonne : Hypersil H5 C18 (L x Φ = 250 x 10 mm ; 5 µm) ; Détection: UV 280 nm  
Phase mobile (4 mL min<sup>-1</sup>) : A. H<sub>2</sub>O + 1% HCOOH; B. EtOH + 1% HCOOH; Elution isocratique : 86%A/14%B

La séparation chromatographique a été obtenue en mode d'élution isocratique ce qui nous a permis d'éviter le temps de rééquilibrage de la colonne entre les injections et de recycler la phase mobile entre la collecte des fractions. La Figure III.9 correspond au chromatogramme obtenu lors du fractionnement de l'extrait de cerises ( $500 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). La bonne séparation facilite la récupération de trois fractions différentes. La fraction **1** contient des sucres et des composés phénoliques autres que les anthocyanines. Deux autres fractions (**2** et **3**) contenant chacune un des anthocyanines majoritaires ont été collectées séparément, lyophilisées et soumises à l'analyse HPLC classique.

Afin de réduire la consommation de solvants la phase mobile a été recyclée entre la collecte de fractions. Avec un volume d'environ 650 mL de phase mobile 4 injections ont pu être réalisées. Au cours de la dernière injection nous avons constaté un bruit de fond plus intense mais la séparation des composés n'a pas été affectée. Afin d'éviter la dégradation de la séparation aucune autre injection supplémentaire n'a été effectuée avec la même phase mobile.

Le calcul des rendements a indiqué qu'à partir de 200 mg (4 injections de 50mg chacune) d'un extrait de cerises nous avons récupéré 1,3 mg de fraction **2** et 2,5 mg de fraction **3**.

Nous pouvons donc conclure que, par rapport à la chromatographie de partage centrifuge, le fractionnement par HPLC semi-préparative semble être plus avantageux vu qu'il ne nécessite que l'utilisation des solvants biodégradables qui peuvent être recyclés et qu'il permet l'isolement des 2 anthocyanines.

### III. 1. 6. Analyse des anthocyanines purifiés

Les profils chromatographiques des fractions **2** et **3** lyophilisées ont été enregistrés à une longueur d'onde de 280 nm et n'ont pas révélé la présence d'autres composés que les anthocyanines (Figure III.10). La pureté de ces molécules a été estimée à 98% pour la fraction **2** et à 97% pour la fraction **3**.

L'analyse HPLC-MS a été réalisée en mode ESI positif par infusion directe des fractions solubilisées dans un mélange  $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  (5 : 95, v / v) acidifié avec 0,1% d'acide formique. Les spectres obtenus nous ont permis d'identifier la cyanidine-3-*O*-glucoside dans la fraction **2** et la cyanidine-3-*O*-rutinoside dans la fraction **3**. Sur ces spectres nous pouvons constater l'ion  $[\text{M}^+]$  correspondant à la masse moléculaire de l'analyte. La perte d'un sucre (glucose et respectivement rutinoside) conduit à l'apparition d'un ion fragment détecté non pas à  $m/z$  de 287 (masse moléculaire de la cyanidine) mais à 309,5 à cause d'un adduit de sodium.

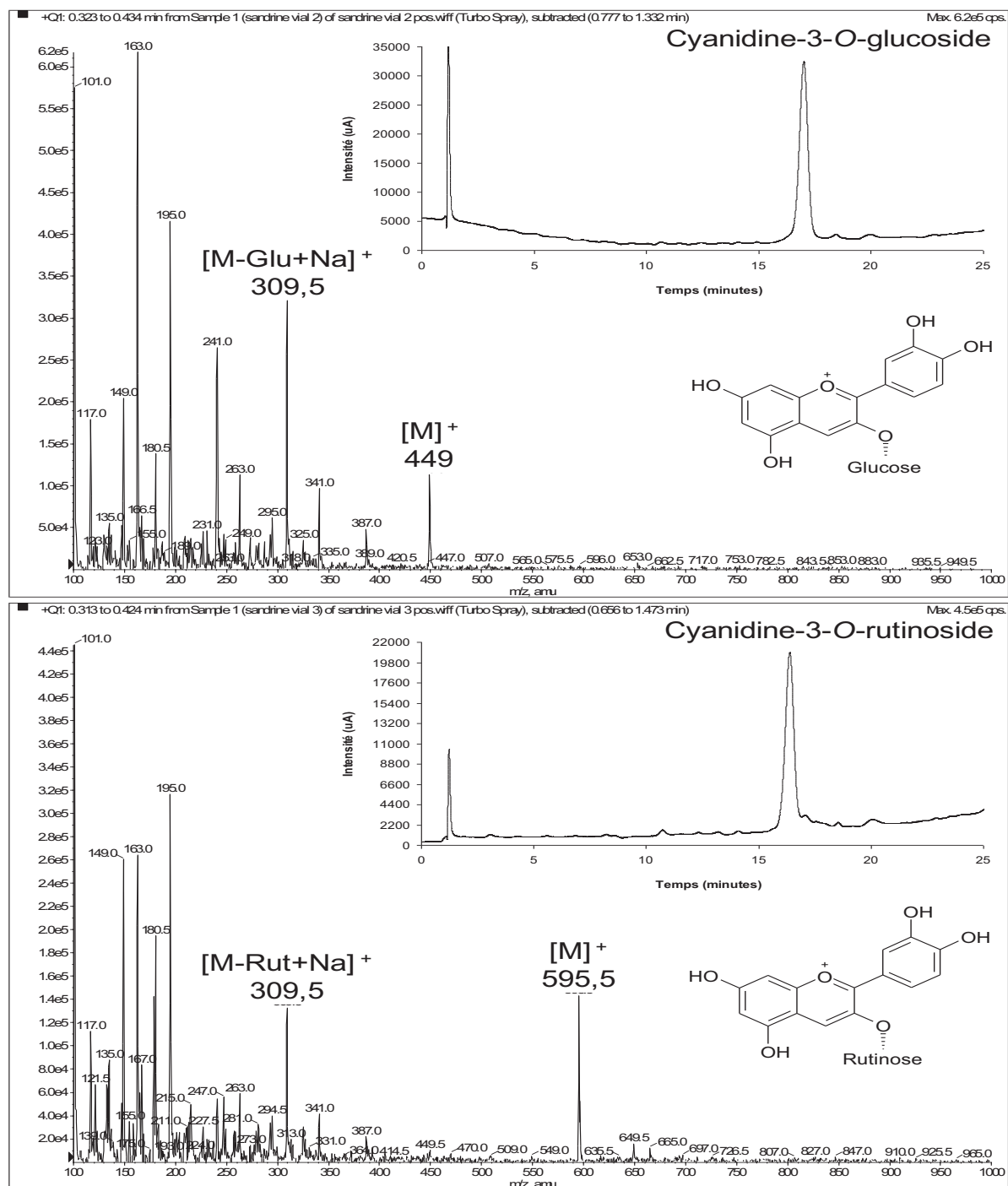


Figure III.10. Spectres MS (mode ESI<sup>+</sup>) et chromatogrammes (UV à 280 nm) des anthocyanines de cerises  
 A. Cy-3-Glu B. Cy-3-Rut

En regardant les résultats obtenus nous pouvons conclure que :

- les composés phénoliques de cerises dont les anthocyanines sont majoritaires peuvent être facilement récupérés par extraction sans solvant assistée par microondes ;
- les anthocyanines représentatifs des extraits de cerises sont la cyanidine-3-O-glucoside et la cyanidine-3-O-rutinoside ;
- la purification de ces molécules peut être réalisée convenablement par HPLC semi-préparative à l'aide d'une phase mobile constituée de solvants biodégradables ;
- la conservation des extraits bruts de cerises ainsi que des composés bioactifs purifiés peut être assurée par lyophilisation.

## III. 2. COMPOSES BIOACTIFS DE RESIDUS DE POMMES

Nous avons vu dans les deux premiers chapitres que les résidus de pommes sont les sous-produits (représentant environ 30% du produit de départ) associés à l'obtention de jus clair lors du pressage de pommes. Ces résidus, très sensibles à une biodégradation, posent un réel problème pour les industriels de l'agro-alimentaire qui ont à gérer des volumes extrêmement importants de déchets générés quotidiennement lors du processus de fabrication du jus.

Les résidus humides servent souvent de fourrage pour les animaux et sont utilisés aussi comme fertilisants pour le sol, ce qui peut endommager l'environnement à cause de leur activité anti germinante, de leur acidité, et de leur contenu assez élevé en composés organiques. D'autres pratiques plus intensives incluent la production d'agro combustibles ou la transformation en charbon [21-24] à partir de ces résidus.

On peut aussi envisager une valorisation de ces résidus de pommes en se basant sur les composés présents initialement dans les fruits et restant dans ces résidus après l'étape de pressage tels que les polysaccharides, les vitamines, les fibres ou les polyphénols. Un intérêt certain s'est porté ces dernières années sur la valorisation des composés polyphénoliques reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et leurs capacités à limiter les dommages du stress oxydatif dus aux espèces radicalaires [25-30]. Cependant, les résidus de pommes contiennent aussi des terpénoïdes, une famille de molécules peu étudiée. Ces composés ont aussi des propriétés intéressantes et reconnues telles qu'anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antimycotiques, antioxydantes, hépato protectrices, antiviraux, immunomodulatrices, hémolytiques ou cytostatiques [31].

Par conséquent, nous nous sommes intéressés dans la suite de notre étude à caractériser et identifier les composés bioactifs et plus particulièrement ceux de la famille des terpènes présents dans les résidus de différentes variétés de pommes afin d'obtenir des ingrédients potentiellement incorporables dans diverses formulations alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Dans un premier temps, une méthode de conservation de résidus frais a été développée et les performances de la zéodratation ont été comparées à celles de la lyophilisation.

Différentes techniques d'extraction (macération, extraction par fluide pressurisé, extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par microondes) et différents solvants ont été ensuite évalués. Les extraits obtenus à partir de résidus de quatre variétés de pommes (Gala, Golden, Granny Smith, Pink Lady) ont été analysés par HPTLC, HPLC-UV-DEDL et SM afin d'évaluer et comparer leur composition chimique en fonction de la technique d'extraction, du solvant et de la variété de pommes utilisées.

Ensuite, les extraits bruts et les fractions obtenues par extraction liquide-liquide ont été soumis à des tests chimiques pour caractériser leur activité antioxydante tels que :

- détermination de composés phénoliques totaux (Test Folin-Ciocalteu) ;
- détermination de flavonoïdes totaux ;
- activité anti radicalaire (Test DPPH) ;
- pouvoir réducteur (Test FRAP) ;

Nous allons discuter par la suite les résultats obtenus lors de nos travaux.

### III. 2. 1. Obtention de résidus de pommes

Quatre variétés différentes de pommes (Gala v. Royal Gala Tenroy, Golden v. Golden, Granny Smith, Pink Lady v. Cripps Pink) (Figure III.11) ont été sélectionnées. Afin d'obtenir les résidus au niveau du laboratoire, pour chaque variété, une quantité de l'ordre de 1 kg de pommes a été coupée en quartiers et immédiatement pressée dans une centrifugeuse maison.

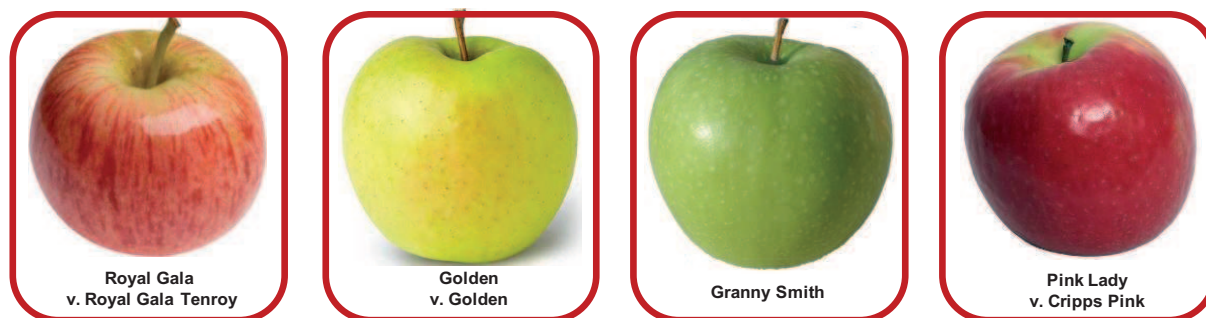


Figure III.11. Variétés de pommes utilisées pour l'obtention de résidus au laboratoire

### III. 2. 2. Conservation des résidus de pommes : zéodratation versus lyophilisation

Pour éviter la dégradation des résidus de pommes (processus accéléré du fait de leur teneur élevée en eau), ils ont été séchés, juste après leur obtention, par deux méthodes différentes :

- **la lyophilisation** : les résidus de pommes emballés dans des sacs en plastique ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures et ensuite lyophilisés pendant 72 heures ;
- **la zéodratation** : une partie des résidus de la variété Granny Smith a été soumise à la zéodratation juste après le processus de pressage pendant 10 heures à une température d'environ  $12 - 13^{\circ}\text{C}$  dans un système Pilot plant ZD+3 de la société française ZeoDry+Plus (l'autre partie ayant été lyophilisée pour la comparaison des 2 méthodes).

Les deux techniques de séchage ont conduit à l'obtention de produits avec une teneur en matière sèche similaire (environ 15%). Pour ce qui concerne les propriétés organoleptiques une couleur plus foncée (Figure III.12) et une odeur plus forte ont été observées pour l'échantillon zéodraté ce qui pourrait être dû à des dégradations lors de la période de séchage.

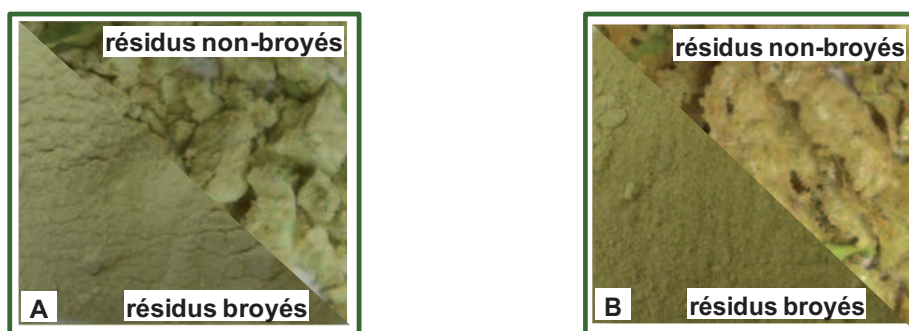


Figure III.12. Résidus de pommes Granny Smith séchés par lyophilisation (A) et par zéodratation (B)

Les résidus séchés ont été enfin finement broyés et stockés à température ambiante dans des récipients en verre, hermétiquement fermés, jusqu'au moment de leur utilisation.

Afin de déterminer l'influence du processus de séchage sur la dégradation éventuelle des composés bioactifs, les résidus de pommes Granny Smith (séchés par lyophilisation et par zéodration) ont été soumis à l'extraction par différentes techniques (macération (M), extraction par solvant pressurisé (ASE), extraction assistée par ultrasons (USAE), extraction assistée par microondes (MWAE)) en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol (EtOH). Ce solvant a été choisi du fait de sa capacité à solubiliser plutôt les composés polaires et moyennement polaires majoritaires dans ces résidus.

La comparaison des rendements d'extraction reportés Figure III.13, met en évidence peu de différences entre les deux procédés de séchage et ce, quelque soit la technique d'extraction même si la zéodration semblerait moins favorable à la bonne conservation des composés si l'on regarde les résultats obtenus avec l'extraction microondes.

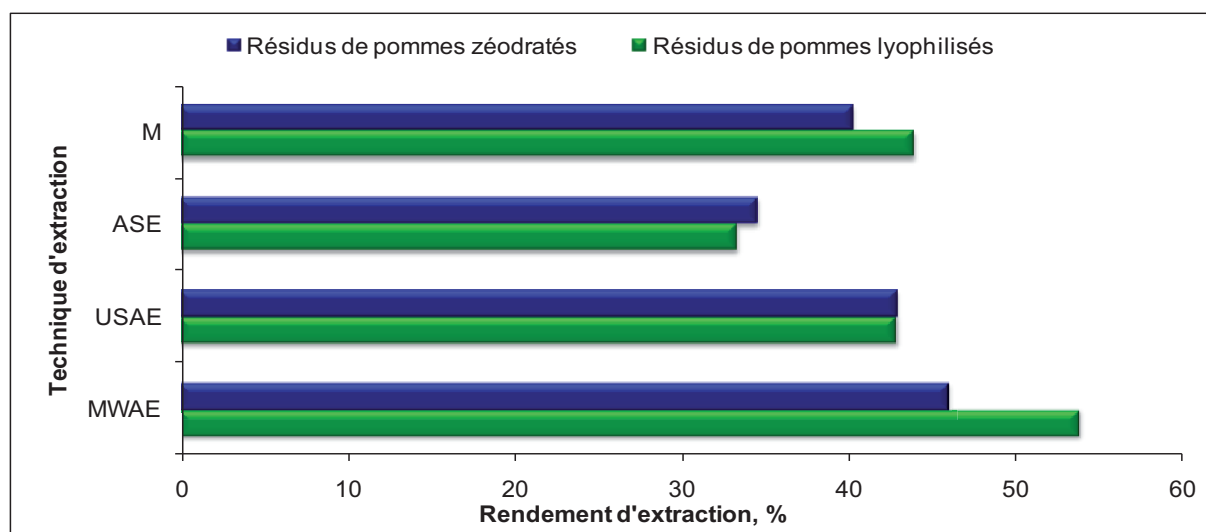


Figure III.13. Comparaison des rendements d'extraction pour les extraits à l'éthanol obtenus à partir de résidus de pomme lyophilisées et zéodratés

Les profils chromatographiques des extraits de résidus lyophilisés ou zéodratés sont similaires et aucune différence concernant la nature des composés extraits n'a été notée. Ceci confirme le fait que les deux techniques de séchage préservent bien les molécules bioactives.

Nous pouvons finalement conclure que la zéodration peut constituer une bonne alternative à la lyophilisation car plus économique. En effet, le séchage selon ce procédé se réalise dans un temps beaucoup plus court (10 heures par rapport aux 60 heures) et ne nécessite pas l'étape préliminaire de congélation obligatoire dans le cas de la lyophilisation.

### III. 2. 2. Extraction de composés bioactifs de résidus de pommes

4 techniques différentes ont été utilisées et comparées pour l'extraction de composés bioactifs de résidus de pommes de différentes variétés :

- macération (M) ;
- extraction par solvant pressurisé (ASE) ;
- extraction assistée par ultrasons (USAE) ;
- extraction assistée par microondes (MWAE).

Nous allons détailler par la suite les conditions opératoires utilisées pour chaque technique ainsi que les résultats obtenus.

### **III. 2. 2. 1. Méthodologie d'extraction**

#### **III. 2. 2. 1. 1. Extraction par macération (M)**

1 g de résidus de pommes séchés a été extrait dans un flacon en verre de 50 mL, fermé, à température ambiante et avec 20 mL de solvant sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté pendant 60 minutes.

#### **III. 2. 2. 1. 2. Extraction par solvant pressurisé (ASE)**

Les extractions ont été réalisées dans un extracteur type ASE 100 de Dionex. Un filtre de cellulose a été placé à l'intérieur d'une cellule d'extraction en acier de 34 mL. 3 g de résidus de pommes séchés ont été mélangés avec la même quantité de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en tant qu'agent dispersif. 3 cycles d'extraction par fluide pressurisé ont été réalisés à 40°C avec une période statique de 5 min pour chaque cycle, un volume de fuite de 65% et une purge d'azote de 100 s après chaque cycle d'extraction. Un volume d'approximativement 60 mL d'extrait brut final a ainsi été récupéré.

#### **III. 2. 2. 1. 3. Extraction assistée par ultrasons (USAE)**

L'extraction a été conduite dans un Erlenmeyer de 500 mL à partir de 3 g d'échantillon et 60 mL de solvant. L'Erlenmeyer a été immergé dans 150 mL eau et positionné au centre d'un bac rectangulaire à ultrasons. Les extractions ont été réalisées à température ambiante durant 30 minutes.

#### **III. 2. 2. 1. 4. Extraction assistée par microondes (MWAE)**

L'extraction assistée par microondes a été réalisée en utilisant un système Milestone MicroSYNTH (Soriso, Italie) avec puissance et durée d'irradiation réglables et contrôlées à l'aide d'un logiciel « easyCONTROL ». La température a été suivie par un capteur capable de contrôler la température à l'extérieur du réacteur. 1 g de résidus de pommes séchés et 20 mL de solvant ont été introduits dans un réacteur de 50 mL et soumis à l'extraction selon 3 cycles de 30 s en utilisant une puissance de 1000 W. Après chaque cycle, le réacteur a été refroidi à température ambiante dans un bac à glace.

Quelque soit la méthode d'extraction utilisée, après l'étape d'extraction, toutes les solutions obtenues ont été centrifugées à 5000  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 5 minutes à 15°C et le surnageant a été évaporé sous vide à 40°C. Les quantités d'extraits secs ont été rapportées à celles du matériel végétal utilisé pour l'extraction afin de déterminer le rendement d'extraction. Les extraits secs ont été repris dans un volume de 5 mL de MeOH, centrifugés dans les mêmes conditions que les extraits bruts et filtrés à l'aide de filtres seringues (diamètre de pores 0,45  $\mu\text{m}$ ). Les filtrats ont été stockés à 4°C ; chaque filtrat a été dilué à la concentration adéquate juste avant l'analyse.

### III. 2. 2. Développement d'une méthode d'analyse par HPLC des extraits de résidus de pommes

Les extraits obtenus ont été analysés sur deux appareils HPLC différents pilotés par le logiciel EZChrome Elite pour le contrôle et la collecte des données :

- un appareil LaChrom Elite équipé avec une pompe quaternaire, un dégazeur, un injecteur automatique, un détecteur à barrette de diodes (DAD) et un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) type Sedex 85 de chez SEDERE ;
- un appareil Agilent 1100 couplé à un détecteur Kontron UV-VIS et à un détecteur DEDL type Sedex 55.

Les conditions chromatographiques ont été dans un premier temps optimisées. Comme nous l'avons vu précédemment, les résidus de pommes contiennent entre autres des composés phénoliques et des composés triterpéniques.

La séparation de ces composés moyennement polaires pouvant se réaliser en mode phase inverse, une colonne de silice greffée de type Pursuit XRs C18e (Varian) a été choisie. Ses caractéristiques sont présentées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Caractéristiques physico-chimiques de la colonne Pursuit XRs C18e

<i>L x Φ (mm)</i>	<i>Diamètre de particules (μm)</i>	<i>Taille des pores (Å)</i>	<i>Greffage</i>	<i>Surface spécifique (m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>)</i>
150 x 4,6	5	100	C18	440

En combinant une technique de greffage exclusive à une silice possédant une très grande surface spécifique (440 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> par rapport à environ 200 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> d'une façon générale pour les autres colonnes), ce type de colonne offre la possibilité d'obtenir une rétention optimale des analytes étudiés avec des pics très fins et bien résolus et une bonne reproductibilité d'analyses. Le fort taux de carbone (25%) et le end-capping de la phase Pursuit XRs C18e protège les analytes des interactions indésirables avec la silice de base (interaction avec les silanols résiduels et/ou interaction d'échange d'ions). La phase Pursuit XRs C18e est élaborée à partir de silice ultra pure, pratiquement exempte de contaminants métalliques. Cette colonne se caractérise par une surface de ligand extrêmement stable qui confère une excellente robustesse et une stabilité importante dans une gamme de pH allant de 1,5 à 10 [32].

La colonne a été utilisée à température ambiante avec une phase mobile à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> constituée d'eau (solvant A) et d'un solvant organique (méthanol ou acétonitrile). Des différences mineures ont été constatées lors de la comparaison des séparations réalisées avec le MeOH ou avec le MeCN ce qui nous a conduit à choisir le MeOH comme solvant B dans la suite de notre étude.

Dès le début, nous avons décidé de rajouter une proportion d'acide en phase mobile afin d'améliorer l'efficacité des pics chromatographiques en favorisant le recul d'ionisation des solutés acides (par exemple les acides phénoliques) et leur analyse sous forme moléculaire prédominante. Nous sommes arrivés à la conclusion que l'acide formique est le plus approprié. Cette conclusion est soutenue par le fait qu'un pourcentage de 0,1% de cet acide a conduit à des résultats similaires à ceux obtenus par l'ajout de 1% d'acide acétique. De plus, l'acide formique est plus volatil que l'acide acétique et donc plus compatible avec un couplage HPLC-MS.

Du fait de la complexité des extraits de résidus, une séparation acceptable de tous les composés n'a pas pu être obtenue par une élution en mode isocratique. Par conséquent, nous avons testé plusieurs gradients d'élution. Parmi ceux-ci, les conditions les plus appropriées sont reportées dans le Tableau III.3. La durée totale d'analyse est de 45 minutes et inclut une



période linéaire et un palier isocratique nécessaire pour éluer l'ensemble des composés même les moins polaires (les plus retenus) présents dans l'extrait. Même si, la durée totale de l'analyse aurait pu être diminuée en augmentant le pourcentage de MeOH jusqu'à 100%, pour des soucis de pureté du solvant nous avons décidé de ne pas dépasser la proportion de 90%

**Tableau III.3. Gradient d'élution HPLC**

<i>Temps (minutes)</i>	<i>Solvent A</i>	<i>Solvent B</i>
	<i>(H<sub>2</sub>O avec 0,1% HCOOH), %</i>	<i>(MeOH avec 0,1% HCOOH), %</i>
0	80	20
30	10	90
45	10	90

Une double détection a été réalisée :

1. par UV (à longueur d'onde fixe) ou par DAD à :
  - 210 nm – longueur d'onde à laquelle quasiment tous les composés absorbent ;
  - 254 nm – longueur d'onde à laquelle les composés possédant un noyau aromatique absorbent ;
  - 280 nm – longueur d'onde à laquelle les acide phénoliques, les flavanols et les chalcones absorbent ;
  - 360 nm – longueur d'onde à laquelle les flavonols absorbent.

Ces longueurs d'ondes ont été choisies selon l'étude bibliographique préliminaire concernant les composés bioactifs de résidus de pommes et leurs limites d'absorbance en UV.

2. par DEDL permettant de détecter tous les composés non volatils :
  - température de nébulisation : 52°C ;
  - pression du gaz de nébulisation : 2,2 bars ;
  - gain : 8.

Le volume d'injection a été de 20 µL.

Des chromatogrammes type sont présentés dans la Figure III.14.

### III. 2. 2. 3. Influence de la technique d'extraction

Généralement les méthodes conventionnelles d'extraction des composés naturels sont la macération [33] et l'extraction Soxhlet [34]. En dépit de leur efficacité, ces processus sont souvent longs et consomment d'importants volumes de solvant. Ces désavantages peuvent être évités en utilisant des techniques d'extraction alternatives telles que l'extraction par solvant pressurisé (ASE), l'extraction assistée par ultrasons (USAE) ou l'extraction assistée par micro ondes (MWAE).

Les extraits obtenus par ces 3 méthodes alternatives ont été comparés avec ceux obtenus par macération classique (M).

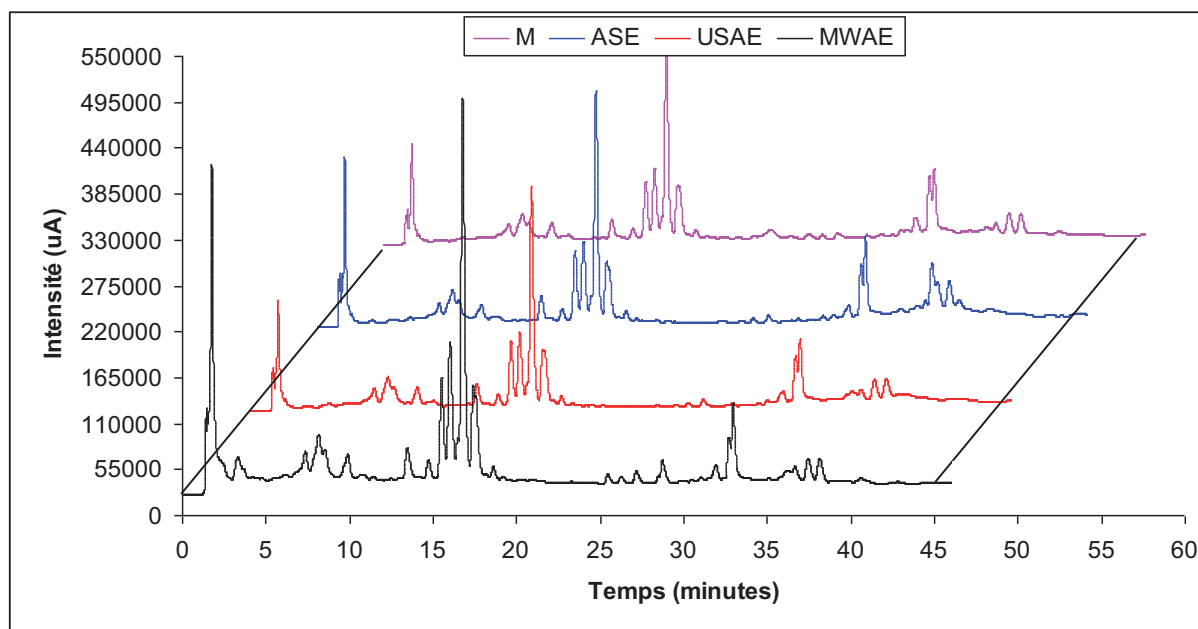
Les rendements globaux d'extraction sont présentés dans la Figure III.13.

La valeur de rendement la plus faible a été enregistrée avec la méthode ASE. Il peut paraître surprenant que la macération sous agitation à température ambiante et pression atmosphérique conduise à de meilleur rendement que l'ASE à 40°C. En effet du fait de la pressurisation du solvant d'extraction en ASE, on observe en général une amélioration du processus d'extraction par rapport à la macération. Nous pouvons conclure que dans les conditions que nous avons testées (faible écart de température entre les deux procédés), la durée de mise en contact de l'échantillon avec le solvant (1 heure pour la macération et environ 30 minutes pour l'ASE) apparaît comme un paramètre plus influent que celui de la surpression du solvant utilisé en ASE.

Un rendement d'extraction similaire à celui de la macération a été obtenu lors de l'utilisation des ultrasons (pour une période de 30 minutes) ce qui peut s'expliquer par le mécanisme d'action de ce type d'ondes sur les cellules végétales. Ainsi, comme nous avons vu dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, sous l'effet des ultrasons des bulles de cavitation peuvent être générées au voisinage immédiat de la surface du matériel végétal.

Le meilleur rendement d'extraction ( $\approx 54\%$ ) a été enregistré sous l'effet de l'irradiation électromagnétique. Cette valeur optimale peut être due d'une part à la capacité de micro ondes à détruire les parois cellulaires et ainsi d'améliorer le transfert de composés bioactifs de l'intérieur du matériel végétal vers le solvant environnant et d'autre part par, les températures élevées atteintes au cours de l'extraction (autour de  $120^{\circ}\text{C}$ ) engendrent une meilleure solubilisation des composés d'intérêt.

Les extraits à l'EtOH de résidus de pommes Granny Smith obtenus par les quatre techniques d'extraction ont été analysés par HPLC et les profils chromatographiques sont illustrés dans la Figure III.14.



**Figure III.14. Comparaison des profils chromatographiques des extraits éthanoliques obtenus à partir de résidus de pommes Granny Smith par différentes techniques d'extraction**

Colonne : Pursuit XRs C18 ( $L \times \Phi = 150 \times 4,6$  mm,  $5\mu\text{m}$ ); Détection : UV 280 nm;

Phase mobile : A.  $\text{H}_2\text{O}$ ; B. MeOH les deux acidifiées avec 0,1%  $\text{HCOOH}$ ; Débit :  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B; 30 - 45 min, 90% B

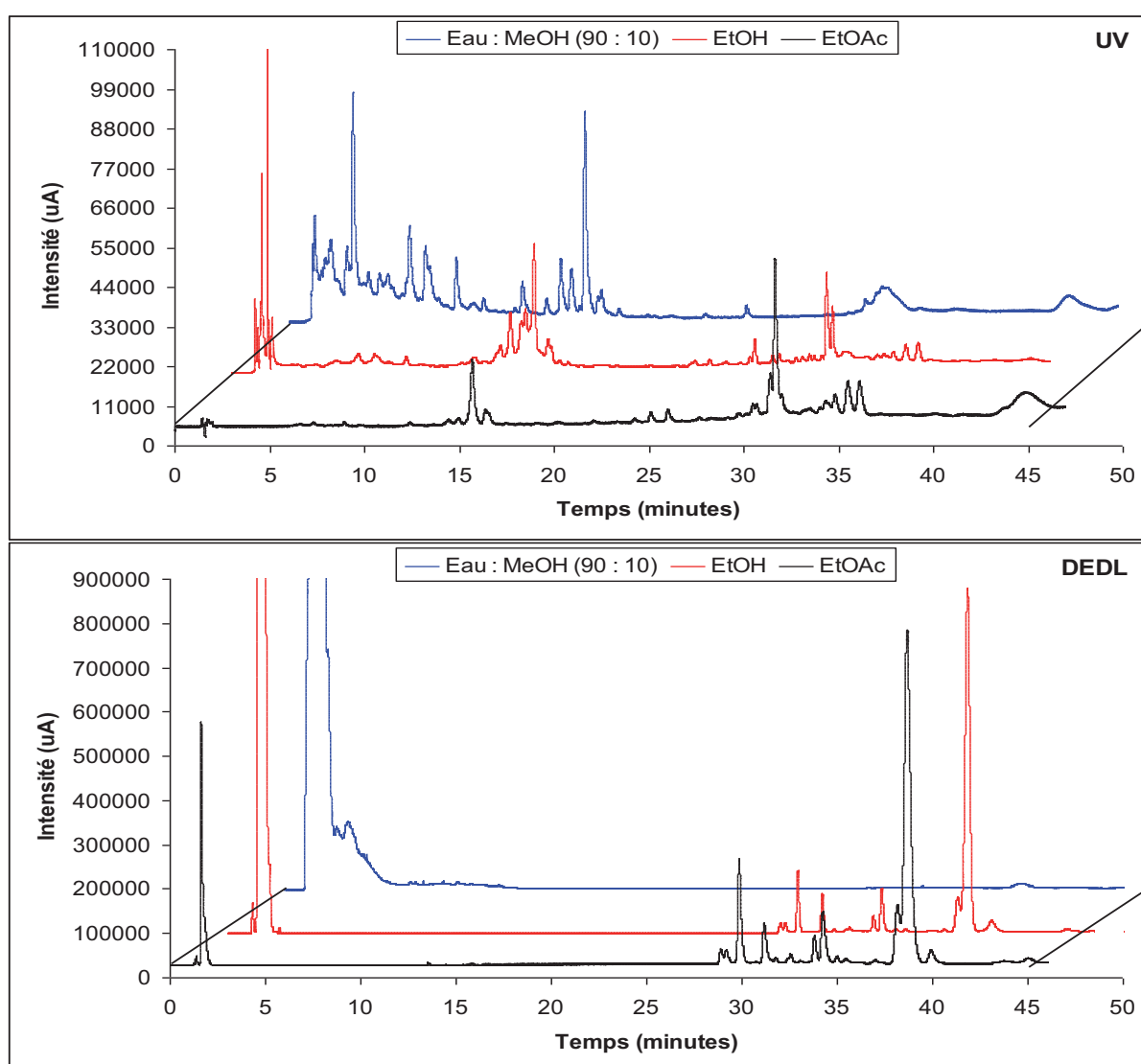
Nous pouvons constater que les techniques d'extraction n'induisent pas de sélectivité particulière. En effet, aucune différence majeure n'est observée aussi bien pour ce qui concerne les empreintes chromatographiques que pour les proportions relatives des composés. La similarité des résultats obtenus nous a permis de conclure que les quatre méthodes d'extraction conviennent pour extraire les composés bioactifs de résidus de pommes. Le choix d'extraire par l'un ou l'autre des procédés, pourra se faire en fonction du matériel disponible dans le laboratoire sans perte d'informations.

Par conséquent nous avons choisi comme méthode générique d'extraction celle mettant en jeu l'effet de l'irradiation électromagnétique car elle est la plus rapide et permet de consommer moins d'échantillon et de solvant que les trois autres techniques, ce qui est plus compatible avec une démarche « chimie verte ».

### III. 2. 2. 4. Influence du solvant d'extraction

Afin d'évaluer l'influence du solvant sur le processus d'extraction, 1 g de résidus de pommes Granny Smith a été mis en contact avec un volume de 20 mL de différents solvants (H<sub>2</sub>O : MeOH (90 : 10)), éthanol (EtOH) et acétate d'éthyle (EtOAc)). Le mélange obtenu a été soumis à l'extraction assistée par micro ondes. 3 cycles d'extraction de 30 s à une puissance de 1000 W ont été réalisés chaque fois. Après chaque cycle le réacteur micro ondes a été refroidi dans un bac à glace jusqu'à température ambiante. Lors de l'extraction nous avons constaté que lorsque le solvant d'extraction contenait de l'eau, un processus de réhydratation des résidus séchés avait lieu rendant très difficile la récupération de l'extrait. Ce processus est accéléré par la température élevée atteinte sous l'action de micro ondes. Par conséquent nous n'avons pas réalisé, pour la suite de notre étude, d'extraction dans l'eau pure.

La Figure III.15 illustre les empreintes chromatographiques obtenues lors de l'analyse de 20 µL de chacun des extraits de résidus de pommes.



**Figure III.15. Comparaison des extraits de résidus de pommes Granny Smith obtenus à l'aide de différents solvants sous l'action de microondes**

Colonne : Pursuit XRs C18 (LxΦ = 150x4.6 mm, 5µm) ; Détection : UV 280 nm ;  
 DEDL : température de nébulisation, 52°C; pression du gaz de nébulisation, 2 bars; gain, 8  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O; B. MeOH les deux acidifiées avec 0,1% HCOOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>  
 Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B

En regardant les profils UV et DEDL des extraits nous pouvons remarquer que :

- le mélange H<sub>2</sub>O : MeOH (90 : 10) extrait préférentiellement les composés les plus polaires correspondant aux solutés élués avec les temps de rétention les plus faibles ;
- EtOH et EtOAc sont capables de solubiliser des composés ayant une plus large gamme de polarités ;
- EtOH solvant de polarité intermédiaire extrait toutes les familles de composés des composés les plus polaires élués à t<sub>0</sub> aux composés les moins polaires élués à 40 min.

L'intensité du premier massif de pics correspondant aux composés les plus polaires diminue une fois que la polarité des solvants utilisés pour l'extraction est plus faible. Nous pouvons également remarquer que les composés les moins polaires (massif avec des temps de rétention d'environ 40 minutes) qui n'absorbent pas en UV à 280 nm ne sont extraits que dans l'EtOAc ou l'EtOH.

### **III. 2. 2. 5. Optimisation de l'extraction des composés apolaires de résidus de pommes**

#### **III. 2. 2. 5. 1. Extraction par macération**

Au cours de nos recherches nous avons constaté que les extraits obtenus par macération à l'EtOAc sont plus riches en composés de polarité plus faible (solutés avec des temps de rétention entre 35 et 40 min, visible en UV à 210 nm et détectables par DEDL) que ceux obtenus à l'EtOH par extraction assistée par microondes. En revanche les composés élués avant 25 minutes (qui absorbent en UV à 280 nm) sont toujours mieux extraits par microondes que par macération. Afin d'expliquer ces phénomènes deux explications peuvent être proposées : soit l'extraction assistée par microondes ne permet pas une bonne extraction de ces composés moins polaires qui restent dans la matrice végétale, soit elle les dégrade.

Afin de mieux comprendre quels facteurs influent sur l'extraction de ces composés, différentes conditions d'extraction par macération ont été étudiées en partant de 1 g de résidus de pommes et de 20 mL de solvant.

Dans le but de conserver un temps de contact entre le matériel végétal et le solvant d'extraction identique à celui de l'extraction assistée par microondes, nous avons réalisé des extractions par macération de 30 min à l'EtOAc. Ces extractions ont été réalisées avec et sans agitation vu qu'au cours de la MWAE l'agitation a lieu juste pendant les 3 cycles de 30 s utilisés et non pas pendant les étapes de refroidissement (environ 10 min entre chaque cycle).

Ensuite, en pensant que le chauffage pouvait influencer sur le processus, nous avons réalisé une extraction à 60°C sans agitation. Cette température a été choisie du fait qu'elle est similaire à celle atteinte au cours des extractions assistées par microondes dans EtOAc.

Tous les extraits obtenus ont été évaporés à sec puis remis en solution à une concentration de 8000 ppm et ont été analysés ensuite par HPLC sur la colonne Pursuit XRs C18e dans les conditions développées antérieurement.

En partant des empreintes chromatographiques obtenues par DEDL nous avons récupéré et comparé les aires du pic d'intérêt.

En regardant les résultats obtenus (Figure III.16) nous pouvons remarquer que :

- l'échauffement du solvant modifie peu l'extraction des composés d'intérêt ;
- l'agitation favorise l'extraction des composés d'intérêt.

Les recherches effectuées nous ont permis de conclure que les conditions optimales d'extraction des composés apolaires de résidus de pommes par macération sont les suivantes :

- matériel végétal : sec ;
- solvant d'extraction : EtOAc ;
- température : ambiante ;
- sous agitation.

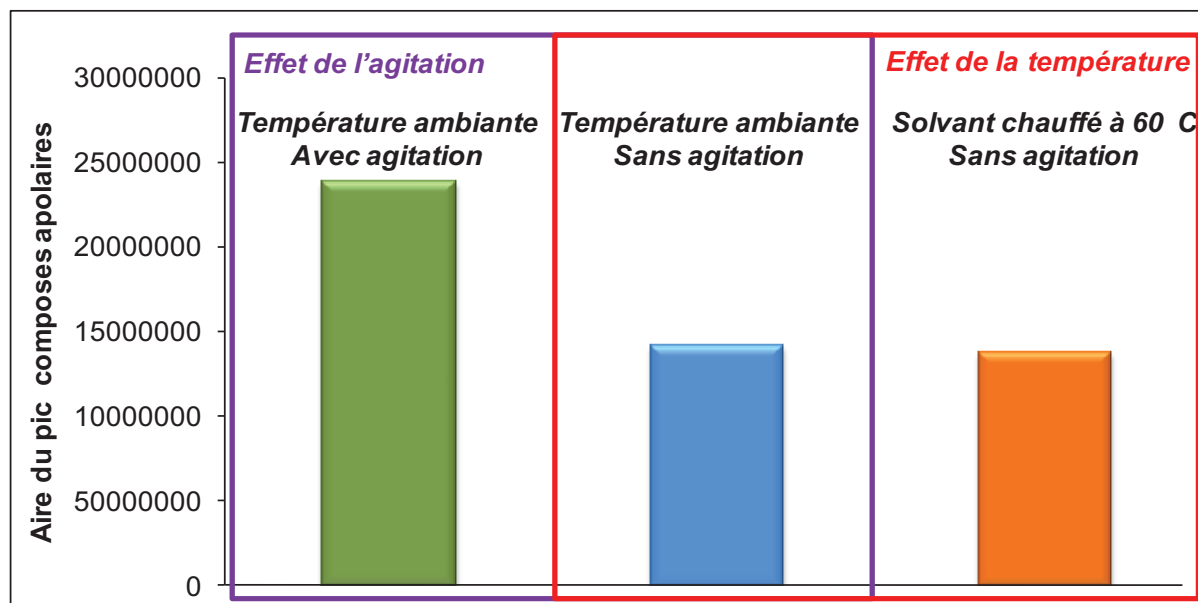


Figure III.16. Influence de différents paramètres sur l'extraction par macération de composés apolaires ( $t_r \approx 40$  min) de résidus de pommes Pink Lady

### III. 2. 2. 5. 2. Extraction assistée par microondes

Le plus souvent cette technique est utilisée pour la récupération de molécules polaires telles que les composés phénoliques. Les solvants d'extraction couramment impliqués alors, sont eux aussi polaires (eau, MeOH, EtOH) et donc capables de s'échauffer sous l'effet de l'irradiation électromagnétique. En revanche, un faible nombre d'études concerne l'extraction assistée par microondes de composés moins polaires et ces études impliquent surtout l'utilisation de solvants polaires tels que MeOH [35] ou EtOH [36-37] plutôt que celle de solvant moins polaires tels que EtOAc.

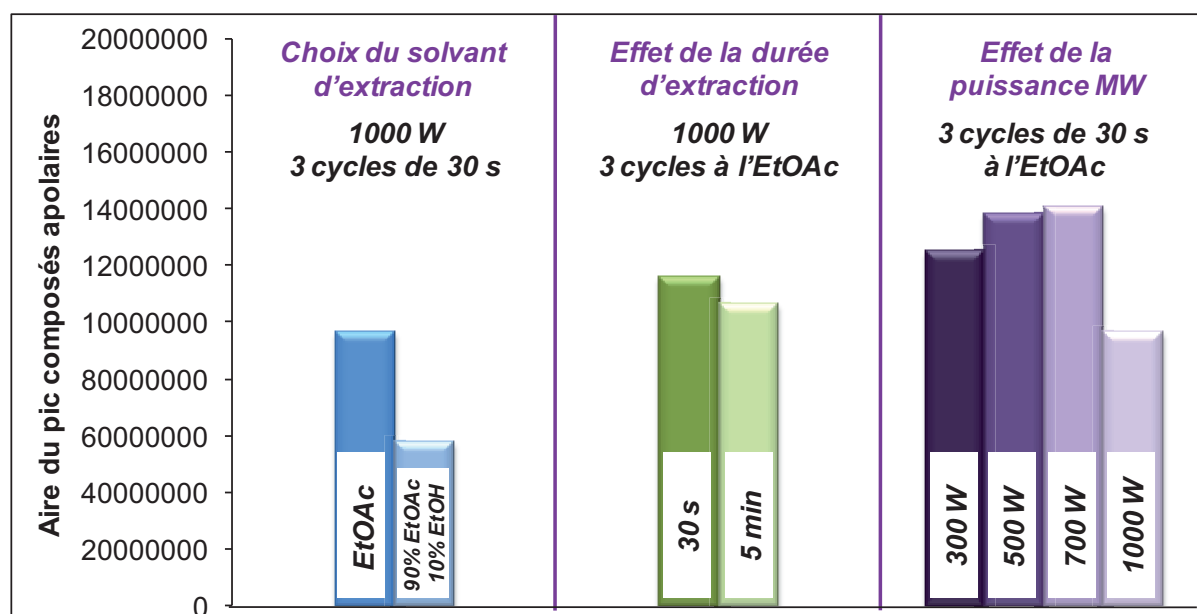
Afin d'évaluer l'influence de différents paramètres (temps d'irradiation, puissance et nature du solvant d'extraction) pour améliorer l'extraction assistée par microondes des composés apolaires nous avons maintenu constant le rapport matériel végétal sur solvant d'extraction (1 g pour 20 mL) et nous avons essayé d'optimiser les paramètres utilisés. Un barreau aimanté en Weflon® capable d'absorber les microondes a été utilisé pour assurer l'agitation de l'échantillon et l'absorption des microondes au cœur du réacteur. Cet ajout s'avère nécessaire lors de l'utilisation de solvants peu polaires absorbant de façon insuffisante les ondes électromagnétiques. Les différentes conditions testées sont présentées dans le Tableau III.4.

**Tableau III.4. Paramètres utilisés lors de l'extraction assistée par microondes de composés de résidus de pommes Royal Gala**

<i>Solvant d'extraction</i>	<i>Nombre de cycles</i>	<i>Durée d'un cycle</i>	<i>Puissance microondes (W)</i>
EtOAc	3	30 s	1000
EtOAc / EtOH (90 % / 10%)	3	30 s	1000
EtOAc	3	5 min	1000
EtOAc	3	30 s	300
EtOAc	3	30 s	500
EtOAc	3	30 s	700

Initialement nous avons repris avec EtOAc les mêmes conditions que celles employées lors de l'extraction EtOH (3 cycles de 30 s à une puissance microondes de 1000 W). Le temps total nécessaire pour une extraction dans ces conditions est autour de 30 min ce qui nous permet de conserver la même durée de contact entre le matériel végétal et le solvant d'extraction que celle utilisée pour la macération.

La représentation graphique des aires récupérées pour les pics des composés apolaires extraits est illustrée dans la Figure III.17.


**Figure III.17. Influence de différents paramètres sur l'extraction assistée par microondes de composés apolaires ( $t_r \approx 40$  min) de résidus de pommes Gala**

En regardant les résultats obtenus nous pouvons remarquer plusieurs aspects.

Ainsi, nous pouvons observer que la durée d'irradiation n'influe pas beaucoup sur le rendement d'extraction des composés apolaires de résidus de pommes. Ainsi, afin de réduire le temps total du processus nous avons considéré approprié de conserver comme durée de cycle, la valeur de 30 s. De plus le refroidissement du réacteur microondes entre les cycles peut se réaliser plus facilement étant donné que la température atteinte pendant l'extraction ne dépasse pas 100°C alors que pour un cycle de 5 min elle atteint la valeur de 130°C.

Les puissances d'irradiation optimales sont comprises entre 500 et 700 W. A plus faible puissance (300W) les composés sont moins extraits et à une puissance de 1000 W on observe également une diminution de la quantité de composés apolaires peut être due à une dégradation. Nos résultats concordent avec ceux présentés par d'autres études [35-37] qui stipulent une puissance microondes optimale située entre 500 W et 800 W.

En ce qui concerne la nature du solvant d'extraction, nous avons vu dans le deuxième chapitre de ce manuscrit que l'EtOAc n'absorbe pas très bien les ondes électromagnétiques sa constante diélectrique n'étant que de 6,5 Debye alors que celle de l'EtOH est beaucoup plus importante (24,3 Debye). En revanche EtOAc solubilise mieux les composés apolaires d'intérêt que EtOH. De ce fait, nous avons utilisé un mélange EtOAc : EtOH (90 : 10%) afin de conserver la bonne solubilité dans EtOAc tout en améliorant la capacité du solvant à absorber les micro-ondes afin d'obtenir un chauffage plus homogène.

L'étude réalisée nous a permis de constater que la présence d'EtOH ne conduit pas à une meilleure extraction des analytes d'intérêt bien que la température atteinte à l'intérieur du réacteur micro ondes ait augmenté au-delà de 100°C. De plus EtOH est capable de solubiliser une partie des sucres présents dans les résidus de pommes ce qui peut contribuer à la diminution de l'extraction des composés d'intérêt.

Quelles que soient les conditions testées pour l'extraction assistée par micro ondes, la comparaison des aires des pics des composés apolaires extraits révèle que l'extraction assistée par microondes est toujours moins efficace que la macération même sans agitation.

Au cours de nos recherches bibliographiques nous avons remarqué que certaines études dont celle réalisée par Lucchesi *et al.* [38] ont montré que l'extraction assistée par microondes se réalise mieux si le matériel végétal sec utilisé est hydraté avant l'extraction. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons réalisé deux extractions. Pour la première nous avons mis en contact 1 g de résidus de pommes Pink Lady lyophilisés avec 20 mL EtOAc. Ce mélange a été soumis à l'irradiation électromagnétique dans les meilleures conditions déterminées : 3 cycles de 30 s à 700 W. Dans le deuxième cas la même quantité de matériel végétal a été mise en contact avec un volume de 30 mL d'eau pendant 30 min. Le mélange obtenu a été ensuite centrifugé et les résidus de pommes humidifiés récupérés ont été soumis à l'extraction dans les mêmes conditions que celles des résidus secs. Les résultats obtenus confirment le fait que la présence de l'eau dans les cellules végétales améliore l'extraction. Les quantités récupérées ont été similaires à celles issues de la macération. Il est nécessaire de préciser que dans cette situation le matériel végétal hydraté contient toujours un certain volume d'eau non-miscible avec EtOAc ce qui peut conduire à des problèmes lors de l'extraction à une plus grande échelle. De plus les étapes supplémentaires impliquées (hydratation des résidus de pommes, centrifugation etc.) peuvent être responsables de l'augmentation de la durée totale de l'étape d'extraction.

Les recherches réalisées nous ont permis de conclure que les paramètres optimaux pour l'extraction assistée par microondes capables d'assurer une bonne récupération des composés apolaires de résidus de pommes sont les suivants :

- matériel végétal : hydraté ;
- agitation avec un barreau aimanté en weflon ® ;
- solvant d'extraction : EtOAc ;
- puissance microondes : 700 W ;
- nombre des cycles d'extraction : 3 ;
- durée d'un cycle : 30 s.

Un aliquote de 5 µL d'une solution à 8000 ppm de l'extrait obtenu dans les meilleures conditions de l'extraction assistée par microondes a été analysé par HPLC sur la colonne Pursuit XRs C18e dans les conditions chromatographiques développées antérieurement. L'aire du pic des composés apolaires peut être estimée comme équivalente à celle du pic obtenu pour une solution d'acide ursolique à 1000 ppm. L'acide ursolique est en effet décrit comme étant l'acide triterpénique le plus abondant dans les pommes [39-40]. C'est une molécule apolaire faisant partie de la famille de composés triterpéniques [31]. Injecté dans les mêmes conditions chromatographiques que l'extrait de résidus de pommes, son temps de rétention est d'environ 40 min.

## **III. 2. 3. Identification de principales familles de composés bioactifs de résidus de pommes**

### **III. 2. 3. 1. Analyse des extraits de résidus de pommes par HPTLC**

L'analyse HPTLC offre des informations sur la présence des grandes familles de composés présents dans les extraits de résidus de différentes variétés de pommes. La présence et/ou l'absence de familles caractéristiques telles que les acides aminés, les sucres, les composés phénoliques, les composés terpéniques etc. peut être déterminée par la comparaison des couleurs de spots avec celles de standards après dérivatisation.

#### **III. 2. 3. 1. 1. Appareillage et conditions opératoires**

Un système HPTLC de Camag (Muttens, Suisse) équipé avec un déposeur automatique (Linomat 4) et une chambre de développement horizontale ont été utilisés pour l'analyse HPTLC. Les plaques HPTLC et les systèmes de solvants ont été choisis en concordance avec les familles de composés étudiées. Après développement, les plaques ont été séchées, pulvérisées avec des réactifs appropriés pour la révélation et les spots ont été visualisés en visible et sous UV (à 254 et 366 nm).

#### **III. 2. 3. 1. 2. Acides aminés et sucres**

##### **Conditions opératoires**

Le développement des acides aminés et des sucres a été réalisé sur des plaques HPTLC de silice type 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm) (Merck, Allemagne).

Des volumes de 10 µL de solutions standards et d'extraits de résidus de quatre variétés de pommes (Gala, Golden, Granny Smith, Pink Lady) obtenus par extraction assistée par microondes et par macération ont été déposés sur la plaque en bandes de 8 mm. Une distance de 4 mm entre chaque dépôt a été respectée. La ligne de dépôt a été fixée à 1 cm du bas de la plaque et les premiers et derniers dépôts ont été réalisés à 12 mm des bords latéraux.

L'élution des composés a été réalisée avec un mélange H<sub>2</sub>O : MeCN (75 : 25).

Le traitement des plaques a nécessité l'utilisation de deux révélateurs différents : un pour les acides aminés dans un premier temps et un autre pour les sucres dans un second temps. Cet ordre est imposé par le fait que le révélateur des sucres une fois appliqué ne permet plus la révélation des acides aminés.

L'utilisation d'une solution de ninhydrine (0,1% dans EtOH) a conduit, après un chauffage de 5 minutes à 120°C, à des spots roses caractéristiques des acides aminés.

Les sucres ont été ensuite détectés avec le révélateur Molich en deux étapes. Pour cela les plaques ont été pulvérisées avec une solution d' $\alpha$ -naphthol (2 g dans 100 mL EtOH (v / v)), séchées et pulvérisées de nouveau avec une solution d'acide sulfurique (5% en EtOH v / v). Les plaques ont été placées dans une étuve à 120°C pendant 5 minutes ce qui a permis la révélation des spots violets spécifiques des sucres.

Les acides aminés L-serine, L-valine, phénylalanine et les sucres glucose, fructose, saccharose et raffinose ont été utilisés comme standards.



## Résultats

En regardant la Figure III.18A nous pouvons remarquer qu'aucune trace d'acides aminés n'a été détectée dans les extraits de résidus de pommes (dépôts 4 à 11) ce qui n'exclut cependant pas totalement leur présence. Leurs teneurs dans les échantillons déposés pourraient être trop faibles pour être révélées dans ces conditions.

En ce qui concerne la présence des sucres, l'analyse HPTLC indique la présence du fructose et du saccharose dans tous les extraits (Figure III.18B, dépôts 4 – 11). Les concentrations plus importantes dans le cas de l'extraction assistée par microondes (dépôts 4 à 7) peuvent s'expliquer par l'action plus intense de l'irradiation électromagnétique sur le matériel végétal et par le chauffage implicite du mélange ce qui contribuerait à la solubilisation des sucres mais aussi à un rendement d'extraction plus important de ces sucres dans les extraits MWAE déposés. Une bande plus intense est constatée pour l'extrait microondes de résidus de pommes de la variété Granny Smith (dépôt 6). Une tâche avec un rapport frontal plus élevé (Figure III.18B, dépôt 11) est visible pour l'extrait obtenu par macération à partir de résidus de pommes de la variété Pink Lady ce qui peut suggérer la présence d'un sucre moins polaire ou ayant une taille plus faible.

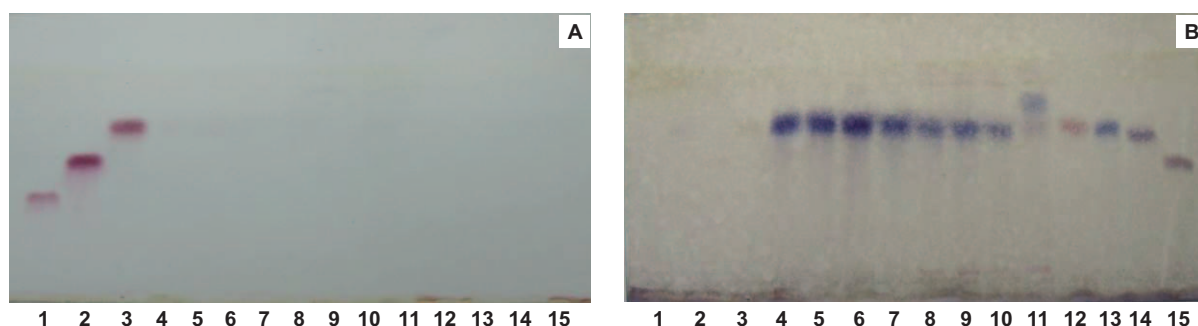


Figure III.18. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de sucres et des acides aminés (VIS)

**A. après révélation à la ninhydrine (acides aminés) ; B. après révélation avec le réactif de Molich (sucres)**  
 Plaque : silice 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm); Bandes : 8 mm; Espace entre dépôts : 4 mm ; Elution : H<sub>2</sub>O/MeCN (75:25) ;  
 Volume déposé : 10 µL (standards : 1 g.L<sup>-1</sup>, extraits MWAE 10 g.L<sup>-1</sup>, extraits M : 8 g.L<sup>-1</sup>) ;  
 Dépôts : 1. L- Ser ; 2. L-Val ; 3. Phe ; 4. Extrait MWAE GALA ; 5. Extrait MWAE GOLDEN ;  
 6. Extrait MWAE GRANNY ; 7. Extrait MWAE PINK ; 8. Extrait M GALA ; 9. Extrait M GOLDEN ;  
 10. Extrait M GRANNY ; 11. Extrait M PINK LADY ; 12. Glu ; 13. Fru ; 14. Sacch ; 15. Raff

### III. 2. 3. 1. 3. Polyphénols

#### Conditions opératoires

Deux types de plaques HPTLC ont été utilisées pour la détection des polyphénols : des plaques de silice type 60 F<sub>254</sub> (5 x 10 cm) et des plaques de silice greffée C18 (10 x 20 cm) (Merck, Allemagne).

Différents systèmes d'éluion ont été testés en utilisant différentes phases mobiles (CH<sub>3</sub>Cl : MeOH : H<sub>2</sub>O) ; (EtOAc : MeOH : HCOOH) et (H<sub>2</sub>O : MeCN : HCOOH) en différentes proportions.

Après développement, les plaques ont été dans un premier temps pulvérisées avec le réactif NEU (1 g de diphenyl boric acid ethylamino ester pour 100 mL MeOH) et ensuite avec le réactif PEG (polyéthylène glycol 4000 5% dans EtOH). La fluorescence des composés phénoliques a été étudiée sous UV ( $\lambda = 366$  nm).

L'acide chlorogénique, la phloridzine, la catéchine, la rutine, la cyanidine-3-chloride, la cyanidine-3-glucoside et la cyanidine-3-rutinoside ont été utilisés comme standards.

## Résultats

La Figure III.19 présente les composés phénoliques des extraits de résidus de pommes détectés en utilisant une plaque de silice greffée C18.

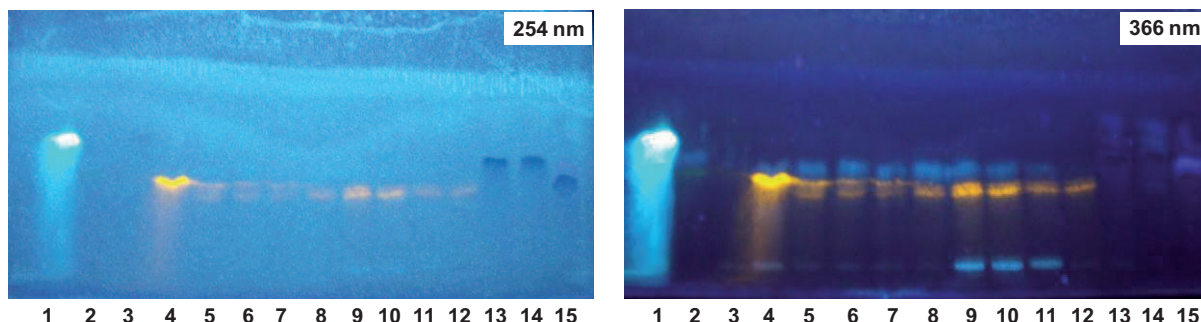


Figure III.19. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de polyphénols standards (à 254 et 366 nm)

Plaque : silice RP C18 (10 x 20 cm) ; Bandes : 8 mm ; Espace entre dépôts : 4 mm ;  
 Volume déposé : standards : 5  $\mu\text{L}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), extraits : 10  $\mu\text{L}$  (MWAE  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , M :  $8 \text{ g.L}^{-1}$ );  
 Elution :  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{MeCN}$  /  $\text{HCOOH}$  (60 : 40 : 2) ; Révélation : NEU et PEG ;  
 Dépôts : 1. AC ; 2. PH ; 3. CAT ; 4. RUT ; 5. Extrait MWAE GALA ; 6. Extrait MWAE GOLDEN ;  
 7. Extrait MWAE GRANNY ; 8. Extrait MWAE PINK ; 9. Extrait M GALA ; 10. Extrait M GOLDEN ;  
 11. Extrait M GRANNY ; 12. Extrait M PINK LADY ; 13. Cy-3-Rut ; 14. Cy-3-Glu ; 15. Cy-3-Ch

L'analyse révèle l'existence de la phloridzine (dépôt 2) et de la rutine (dépôt 3) (séparation non satisfaisante) qui sont respectivement responsables de la fluorescence bleu et jaune visibles en UV à 366 nm, mais n'indique pas la présence de l'acide chlorogénique même si de nombreuses études [25, 27, 41] le citent parmi les composés majoritaires. Des concentrations plus importantes en ces composés ont été constatées dans les extraits obtenus par macération (dépôts 9 – 12) et surtout dans ceux obtenus à partir de résidus de pommes Gala (dépôt 9) et Golden (dépôt 10). Ces extraits, comparés à celui de résidus de pommes Granny, contiennent également davantage de composés moins polaires ( $R_f = 0$ ).

Vu que les pommes Gala et Pink Lady ont une couleur rouge nous avons déposé également sur cette plaque trois standards d'anthocyanines (Cy-3-Rut, Cy-3-Glu et Cy-3-Ch) afin de déterminer si ces composés se retrouvent dans les extraits de résidus de pommes mais nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse les traits rouges en visible et violet à 254 nm spécifiques de ces pigments n'étant pas visibles dans nos échantillons.

### III. 2. 3. 1. 4. Lipides, triterpènes et phytostérols

#### Conditions opératoires

Pour la séparation des terpénoïdes des plaques HPTLC de silice type 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm) (Merck, Allemagne) ont été utilisées avec un éluant constitué de  $\text{CH}_3\text{Cl}$  :  $\text{MeOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (90 : 20 : 1,5).

La révélation de lipides a été réalisée avec une solution de primuline (5 mg primuline dans 100 mL mélange acétone : eau (8 : 2)). La plaque a été lue dans le visible.

Le réactif Liebermann-Buchard (0,5 mL acide acétique anhydre et 0,5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré en 50 mL  $\text{EtOH}$  refroidi dans un bac à glace) a été utilisé pour la révélation de triterpènes et de phytostérols. La plaque a été ensuite chauffée à  $120^\circ\text{C}$  pendant 5 – 10 minutes et visualisée en visible et UV ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ).

L'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'érythrodiol, l'uvaol, l'acide palmitique, le  $\beta$ -sitostérol, le squalène et la rutine ont été utilisés comme standards.

## Résultats

Les résultats obtenus ne confirment ni la présence de lipides et ni celle de phytostérols dans les extraits de résidus de pommes analysés. Par contre, les acides et les alcools triterpéniques ont été détectés dans des quantités plus ou moins importantes dans tous les échantillons (Figure III.20B : traces roses visibles à 366 nm). Les bandes de couleur brun foncé près de la ligne de dépôt peuvent être attribuées aux composés phénoliques qui dans les conditions utilisées (plaque de silice non greffée et éluant non polaire) ne sont pas élués.

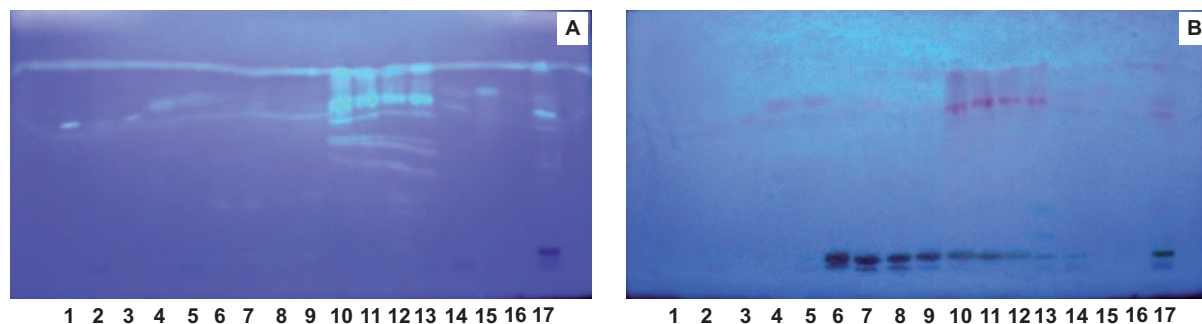


Figure III.20. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de lipides et triterpènes (à 366 nm)

**A.** après révélation à primuline (lipides) ; **B.** après révélation avec réactif Liebermann-Buchard (triterpènes)

Plaque : silice 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm) ; Bandes : 7 mm ; Espace entre dépôts : 4 mm ;

Volume déposé : standards : 5 µL (1 g.L<sup>-1</sup>), extraits : 10 µL (MWAE 10 g.L<sup>-1</sup>, M : 8 g.L<sup>-1</sup>) ;

Elution : CH<sub>3</sub>Cl : MeOH : H<sub>2</sub>O = 90 : 20 : 1,5 ;

Dépôts : 1. AB ; 2. AO ; 3. AU ; 4. ER ; 5. Uv ; 6. Extrait MWAE GALA ; 7. Extrait MWAE GOLDEN ; 8. Extrait MWAE GRANNY ; 9. Extrait MWAE PINK ; 10. Extrait M GALA ; 11. Extrait M GOLDEN ; 12. Extrait M GRANNY ; 13. Extrait M PINK LADY ; 14. AP ; 15. β-Sts ; 16. SQU ; 17. RUT

### III. 2. 3. 1. 5. Triterpènes

#### Conditions opératoires

Afin de réaliser la séparation de triterpènes différents, des essais ont été menés sur des plaques HPTLC de silice type 60 F<sub>254</sub> (10 x 20 cm) et sur des plaques de silice greffée C18 (10 x 20 cm) (Merck, Allemagne) en utilisant différents systèmes d'élution (CH<sub>3</sub>Cl : MeOH : H<sub>2</sub>O ; acétone : MeCN) en différentes proportions.

Les plaques séchées ont été révélées avec une solution d'anisaldéhyde (constituée de 0,5 mL d'anisaldéhyde, 10 mL d'acide acétique glacial, 85 mL MeOH et 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré), séchées, chauffées à 100°C pendant 5 – 10 minutes et visualisées en visible et en UV ( $\lambda = 366$  nm).

L'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'érythrodiol, l'uvaol ont été utilisés comme standards.

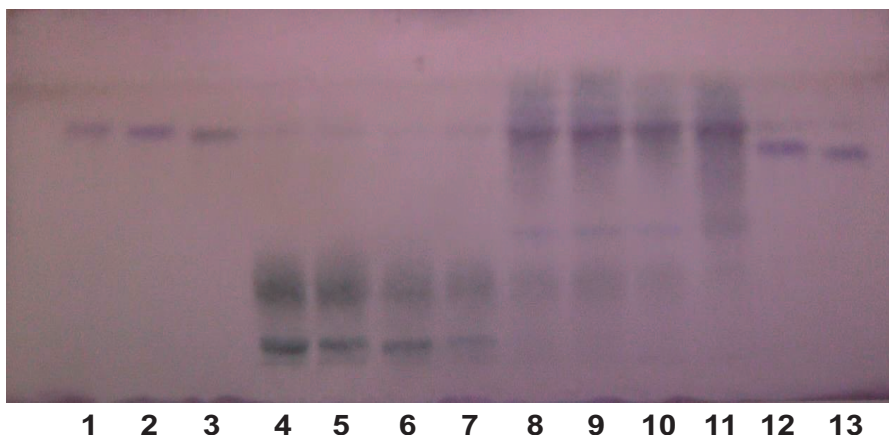
#### Résultats

Parmi les plaques testées, les meilleurs résultats (similaires à ceux de Martelanc *et al.* [42]) ont été obtenus sur celles de silice greffée C18.

Malgré les différents changements de polarité de l'éluant, nous avons constaté que l'acide bétulinique, l'acide oléanolique et l'acide ursolique (Figure III.21 : dépôts 1 – 3) n'ont pas été séparés. L'absence de la séparation peut être expliquée par le fait que ces composés, isomères entre eux, présentent une haute similarité au niveau de leur structure. Une légère séparation peut s'observer dans le cas de l'érythrodiol et de l'uvaol (Figure III.21, dépôts 12 et 13).

En revanche, aucune séparation de ces composés n'a été observée dans les extraits de résidus de pommes. L'analyse réalisée nous a permis juste de confirmer la présence dans nos échantillons de composés similaires aux triterpènes.

Parallèlement cette analyse met clairement en évidence la différence de sélectivité entre les 2 méthodes d'extraction par micro ondes (dépôts 4-7) et par macération (dépôt 8-11). En effet, les extraits effectués par micro ondes présentent des taches de faible intensité au niveau des composés triterpéniques alors que ces composés semblent majoritaires pour les extraits effectués par macération.



**Figure III.21. Chromatogramme HPTLC des extraits de résidus de pommes et de solutions de standards de terpènes (VIS)**

Plaque : silice RP C18 (10 x 20 cm) ; Bandes : 10 mm ; Espace entre dépôts : 4 mm ;  
 Volume déposé : standards : 5  $\mu\text{L}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), extraits : 10  $\mu\text{L}$  (MW  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , M :  $8 \text{ g.L}^{-1}$ ) ;  
 Elution : Acétone / MeCN (4 : 2) ; Révélation : Anysaldéhyde ;  
 Dépôts : 1. AB ; 2. AO ; 3. AU ; 4. Extrait MWAE GALA ; 5. Extrait MWAE GOLDEN ;  
 6. Extrait MWAE GRANNY ; 7. Extrait MWAE PINK ; 8. Extrait M GALA ; 9. Extrait M GOLDEN ;  
 10. Extrait M GRANNY ; 11. Extrait M PINK LADY ; 12. ER ; 13. Uv

Suite à l'analyse par HPTLC nous pouvons conclure que les extraits de résidus de différentes variétés de pommes contiennent des proportions importantes de sucres, de polyphénols et de triterpènes. Nos résultats ne confirment pas la présence d'acides aminés ou de lipides.

### **III. 2. 3. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes par Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC)**

Une étude plus avancée concernant la composition des extraits de résidus de pommes a été réalisée en utilisant la chromatographie liquide de haute performance couplée à différents types de détection.

#### **III. 2. 3. 2. 1. Analyse d'un mélange de composés standards**

L'essai d'identification des principales familles de composés présentes dans les extraits de résidus de différentes variétés de pommes est basé sur la comparaison des spectres d'absorption et des temps de rétention des composés extraits avec ceux de différents standards analysés dans les mêmes conditions.

6 standards de composés phénoliques et 5 standards de composés triterpéniques décrits dans la littérature comme présents dans les résidus de pommes ainsi qu'un acide gras ont été sélectionnés. Un mélange contenant  $0,083 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide gallique (AG), acide chlorogénique (AC), catéchine (CAT), rutine (RUT), phloridzine (PH), quercétine (QUE), acide bétulinique (AB), acide oléanolique (AO), acide ursolique (AU), érythrodiol (ER), uvaol (Uv), acide palmitique (AP) a été préparé (à partir de solutions mères ayant une concentration d' $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) puis analysé par HPLC-DAD-DEDL. Le DAD permet la détection des composés ayant des

groupements chromophores (le cas des composés phénoliques du mélange) alors que le DEDL assure la détection des composés non volatils tels que les composés triterpéniques qui absorbent peu en UV.

Les formules structurales des standards étudiés et les spectres d'absorption correspondants obtenus grâce au DAD lors de la séparation chromatographique sont présentés dans le Tableau III.5.

**Tableau III.5. Formules structurales et spectres d'absorption des standards étudiés**

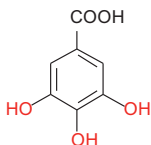
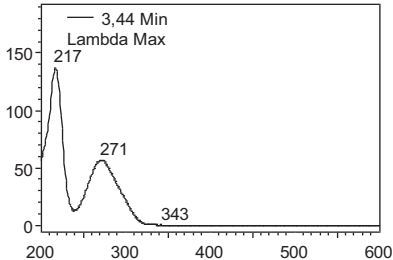
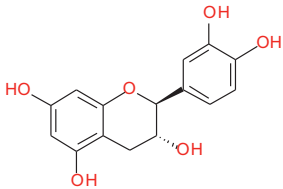
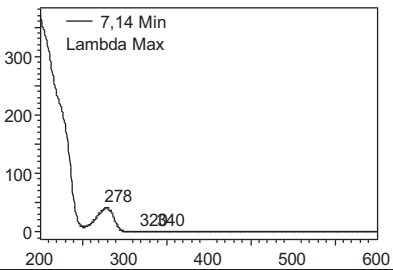
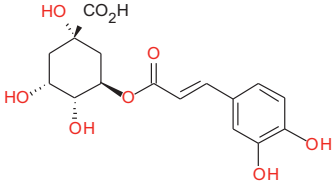
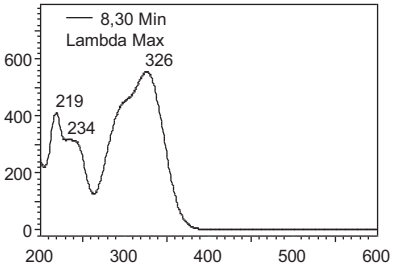
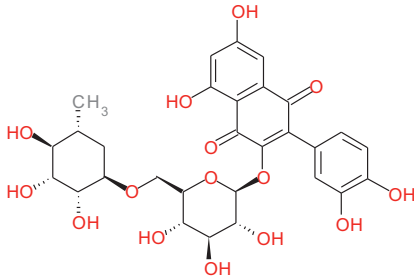
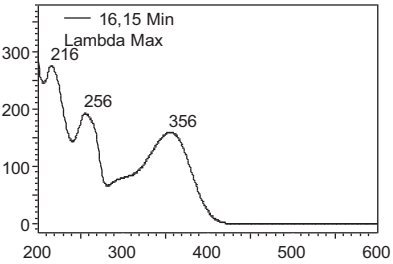
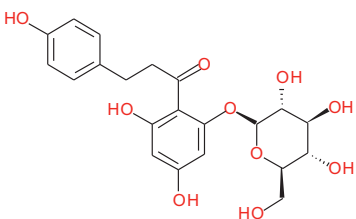
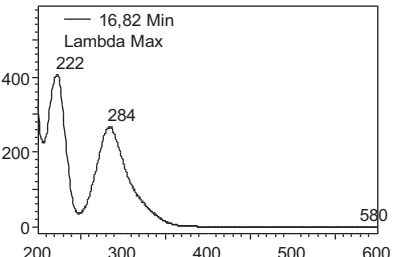
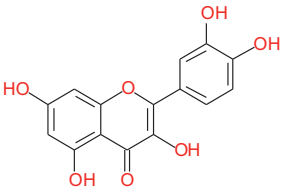
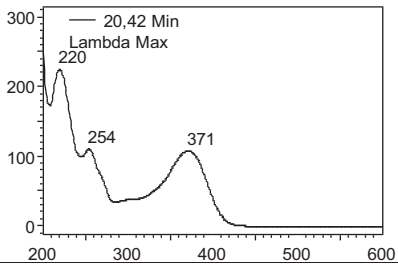
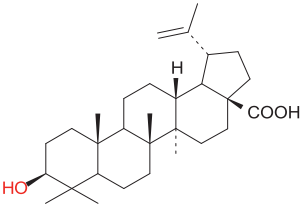
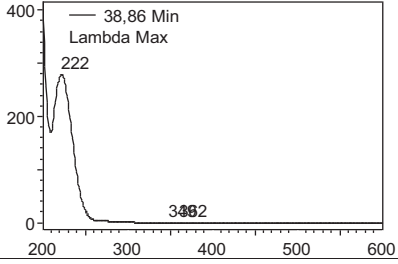
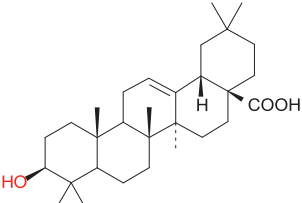
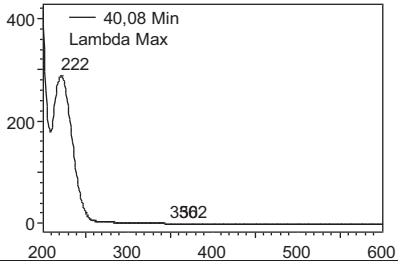
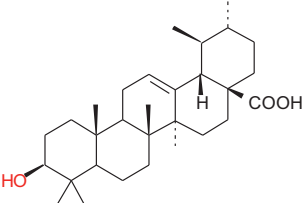
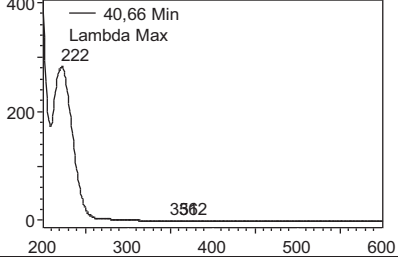
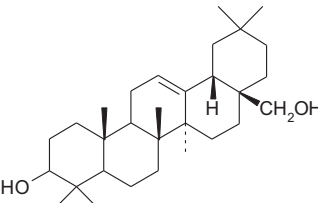
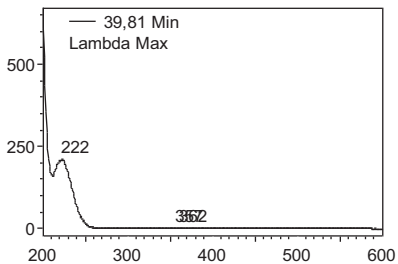
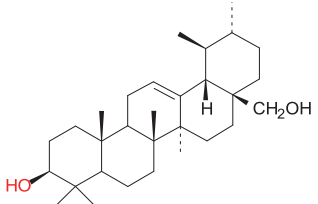
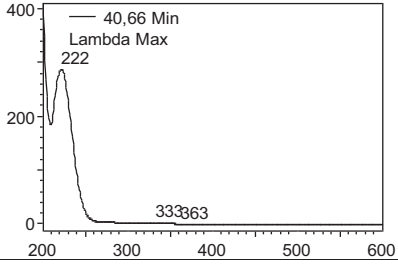
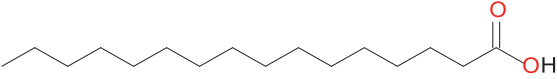
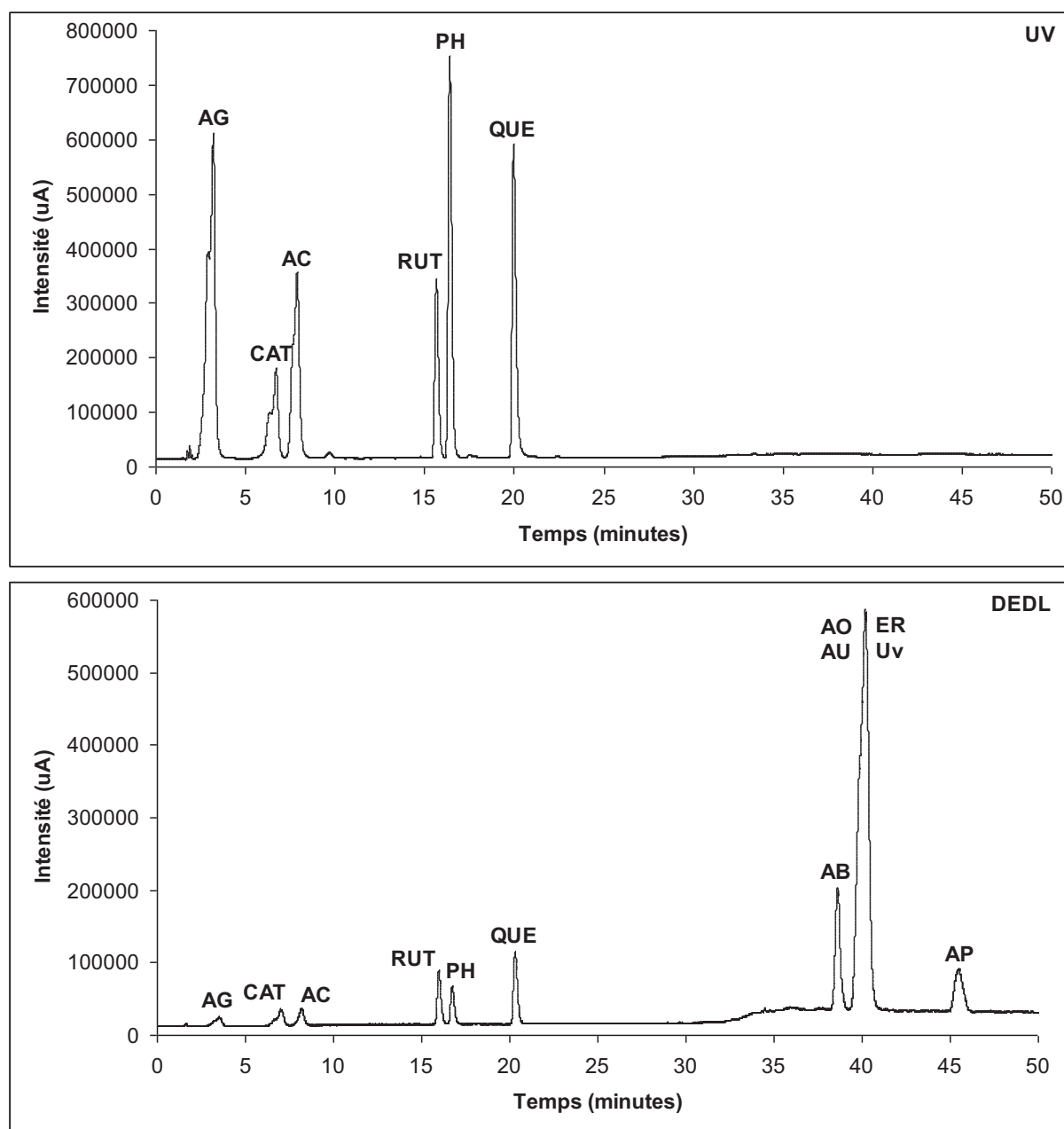
<i>Standards</i>	<i>Formule structurale</i>	<i>Spectre d'absorption en UV</i>
<p>Acide gallique (AG)</p> <p><math>t_r = 3,46</math> min</p>		
<p>Catéchine (CAT)</p> <p><math>t_r = 7,14</math> min</p>		
<p>Acide chlorogénique (AC)</p> <p><math>t_r = 8,36</math> min</p>		
<p>Rutine (RUT)</p> <p><math>t_r = 16,16</math> min</p>		
<p>Phloridzine (PH)</p> <p><math>t_r = 16,83</math> min</p>		

Tableau III.5. Formules structurales et spectres d'absorption des standards étudiés (suite)

Standards	Formule structurale	Spectre d'absorption en UV
<p>Quercétine (QUE)</p> <p>tr = 20,41 min</p>		
<p>Acide bétulinique (AB)</p> <p>t<sub>r</sub> = 38,86 min</p>		
<p>Acide oléanolique (AO)</p> <p>t<sub>r</sub> = 40,10 min</p>		
<p>Acide ursolique (AU)</p> <p>t<sub>r</sub> = 40,67 min</p>		
<p>Erythrodiol (ER)</p> <p>t<sub>r</sub> = 40,68</p>		
<p>Uvaol (Uv)</p> <p>t<sub>r</sub> = 40,68 min</p>		
<p>Acide palmitique (AP)</p> <p>tr = 46,12 min</p>		<p>Pas d'absorbance UV</p>

En regardant les temps de rétention et les profils chromatographiques (Figure III.22) nous pouvons constater que les standards de composés phénoliques ont été relativement bien séparés. Par contre, les composés triterpéniques, à cause de leur forte similarité (voir les formules structurales et les spectres d'absorption), sont, en partie, coélus.



**Figure III.22. Analyse HPLC des standards de composés phénoliques et de composés triterpéniques**  
 AG – acide gallique ; CAT – catéchine ; AC – acide chlorogénique ; RUT – rutine ; PH – phloridzine ;  
 QUE – quercétine ; AB – acide bétulinique ; AO – acide oléanolique ; AU – acide ursolique ;  
 ER – érythrodiol ; Uv – uvaol ; AP – acide palmitique

Colonne : Pursuit XRs C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5µm) ;

Détection : UV : 280 nm ; DEDL : 50°C, Gain 6, Pression 3 bar ;

Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)

Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B; 30 - 45 min, 90% B

Afin de mieux séparer les triterpènes coélus une série supplémentaire d'essais a été réalisée.

## Optimisation de la séparation des triterpènes

En nous basant sur leurs structures chimiques, sur leur solubilité et sur leurs propriétés acides, un mélange de cinq triterpènes (AB, AO, AU, ER, Uv) dont la présence dans les résidus de pommes a été citée par plusieurs études [39, 43-45], a été préparé et étudié afin d'optimiser la séparation chromatographique sur la colonne phase inverse Pursuit XRs C18e.

En dépit des caractéristiques de cette colonne, aucun des programmes d'élution testés (en mode isocratique ou en gradient d'élution) n'a conduit à une séparation satisfaisante, les triterpènes étant toujours coélus.

### Caractéristiques physico-chimiques des différentes colonnes testées

Différents phases stationnaires de silice greffée C18 ont alors été testées (Tableau III.6) pour optimiser la séparation chromatographique du mélange de triterpènes (AB, AO, AU, ER, Uv) en utilisant une phase mobile constituée d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B) les deux acidifiés avec 0,1% d'acide formique.

Nos essais ont été réalisés en mode isocratique (10% A : 90% B) et en gradient d'élution (0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B) à température ambiante sauf cas particuliers. La détection a été assurée par DEDL.

**Tableau III.6. Caractéristiques des colonnes utilisées pour la séparation de standards de triterpènes**

Colonnes (Fournisseur)	Caractéristiques colonnes				
	$L \times \Phi$ (mm)	Diamètre de particules ( $\mu\text{m}$ )	Taille des pores ( $\text{Å}$ )	Greffage	Surface spécifique ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )
Pursuit XRs C18 (Varian)	150 x 4,6	5	100	C18	440
Kromasil C18 (Hypersil)	250 x 4,6	5	120	C18	170
Hypersil ODS (Hypersil)	250 x 4,6	5	120	C18	170
Discovery HS C18 (Supelco)	150 x 2,1	3	120	C18	300
Atlantis C18 (Watters)	100 x 2,1	3	100	C18	330
Purosphere RP 18e (Merck)	125 x 3	5	90	C18	480
Purosphere STAR RP 18e (Merck)	125 x 4	5	120	C18	330
Uptisphere PLP (Interchim)	250 x 4,6	5	120	C18 à groupements polaires insérés	320
Supelcosil ABZ+ Plus (Supelco)	150 x 4,6	5	100	C18 à groupements alkyl-amide insérés	170
HyPURITY Advance (Hypersil)	100 x 3	5	190	C18 à groupements polaires insérés	
Zorbax Eclipse C8 (Agilent)	150 x 4,6	5	80	C8	180
Symetry C8 (Waters)	150 x 3	5	100	C8	335
PLRP – S (Varian)	250 x 4,6	5	100	Polymérique	
Pursuit PFP (Varian)	150 x 2	5	200	Pentafluorophényle	200

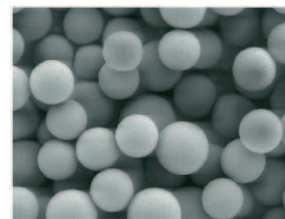


Nous allons discuter par la suite les différentes caractéristiques de ces colonnes ainsi que les résultats obtenus.

## Colonnes de silice greffée C18

### ***Kromasil C18***

La colonne Kromasil C18 est constituée de silice sphérique à surface lisse greffée C18 et ne présente pas de micro cavités (Figure III.23). Le volume optimisé des pores donne une haute surface spécifique sans affecter la résistance mécanique. Les groupements silanols de la surface sont uniformément répartis et relativement neutres. La colonne Kromasil C18 présente une forte stabilité chimique et assure une bonne reproductibilité des analyses. Elle se caractérise par une haute hydrophobicité ce qui conduit à une bonne séparation. La phase Kromasil C18 conduit à des pics symétriques pour des composés acides et basiques [46].



**Figure III.23. Image SEM de particules de silice Kromasil [46]**

### ***Hypersil ODS***

La colonne Hypersil ODS est appropriée pour l'analyse de composés non-polaires et moyennement polaires (composés acides, neutres et lipophiles). Constituée de silice greffée de façon covalente avec une couche d'octadecyle silane, la phase stationnaire Hypersil ODS est complètement endcappée afin de minimiser les interactions des analytes avec les groupements silanols résiduels [47].

### ***Discovery HS C18***

Cette colonne est réputée pour offrir une excellente symétrie de pics pour les composés acides et/ou basiques.

### ***Atlantis C18***

La colonne Atlantis dC18 est une colonne qui présente une bonne rétention pour les composés polaires et qui peut être utilisée avec une phase mobile 100% aqueuse [48].

### ***Purospher RP – 18e et Purospher STAR RP – 18e***

Ces colonnes sont utilisées pour la séparation de composés basiques, neutres et acides dans un temps court et avec une reproductibilité accrue. La silice haute pureté utilisée est complètement endcappée. Les deux colonnes sont très stables chimiquement et peuvent assurer une excellente symétrie des pics ainsi qu'une sélectivité et efficacité importantes. Des conditions d'éluion peuvent être développées pour des pH de 1,5 à 10,5 avec différentes phases mobiles et conditions de température.

## Colonnes de silice greffée C18 avec des groupements polaires insérés

### ***Uptisphere PLP***

La phase stationnaire Uptisphere PLP possède un groupement polaire inséré dans une longue chaîne hydrophobe. Cette modification lui confère des caractéristiques particulières telles que : la compatibilité avec les phases mobiles 100% aqueuses ; une excellente symétrie de pics avec les composés basiques et une très bonne rétention pour les composés polaires. Sa stabilité est assurée pour un pH entre 2,5 et 7,5 [49].

### Supelcosil ABZ+Plus

La colonne Supelcosil ABZ+Plus présente tous les avantages de colonnes HPLC phase inverse : efficacité élevée, stabilité, résistance mécanique et un mécanisme prédictible de séparation. Les groupements polaires insérés (Figure III.24) assurent une désactivation de silanols et une bonne sélectivité, différente de celle de la phase C18 conventionnelle. Cette sélectivité unique aide à la séparation de composés qui normalement ne sont pas séparés sur des colonnes C18.

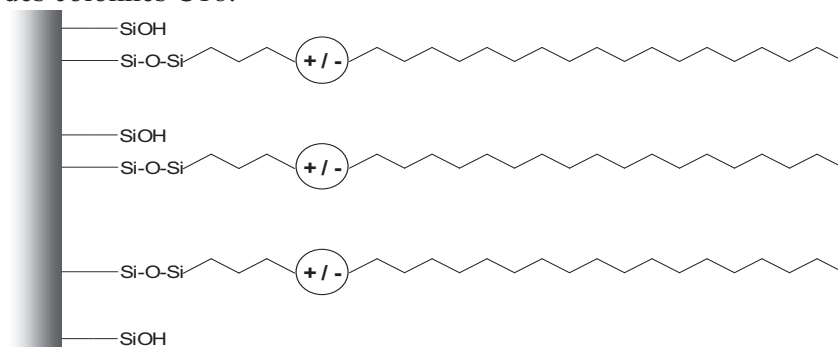


Figure III.24. Représentation schématique de la phase stationnaire Supelcosil ABZ+Plus [50]

Etant bien établi que les acides peuvent interagir avec les silanols par des liaisons hydrogène entraînant ainsi une augmentation des temps de rétention et des épaulements de pics, le groupement polaire de la colonne Supelcosil ABZ+Plus, inséré près de la surface de silice agit comme une barrière électrostatique en repoussant les molécules de même charge. De plus, cette phase stationnaire contient aussi une couche d'eau à proximité de la silice ce qui fait que les composés polaires sont plus solubles dans la phase stationnaire en devenant moins réactifs à cause de liaisons hydrogène avec les silanols du support de silice [50].

### Hypersil HyPURITY Advance

La phase stationnaire HyPURITY Advance est aussi avec des groupements polaires insérés près de la surface de silice. Ces groupements bloquent les interactions des analytes polaires avec la surface de silanols et fournissent une sélectivité alternative en comparaison avec celle de phases C18 et C8.

La colonne HyPURITY Advance offre des performances chromatographiques conduisant à l'obtention de pics symétriques.

De multiples interactions peuvent s'établir entre les analytes et la phase HyPURITY Advance. Le mécanisme de rétention d'une phase stationnaire HyPURITY Advance est illustré par la Figure III.25. La partie « alkyle » retient les analytes par des interactions hydrophobes typiques de la chromatographie phase inverse. Des interactions dipôle-dipôle peuvent avoir lieu entre les groupements polaires intégrés et les composés polaires.

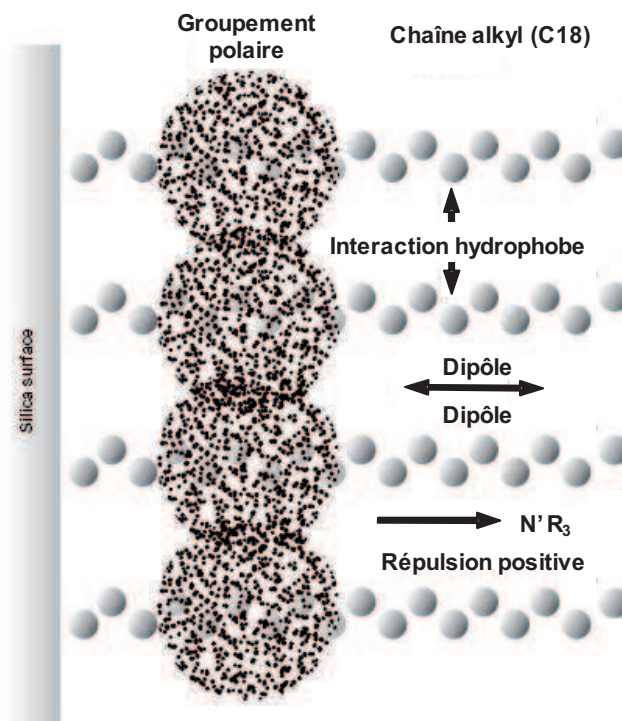


Figure III.25. Mécanisme de rétention des analytes sur la colonne Hypersil HyPURITY Advance [51]

La partie polaire de cette colonne peut également repousser les espèces basiques ionisées conduisant à des pics de forme excellente pour ces composés problématiques. Des

interactions supplémentaires peuvent conduire à un changement de l'ordre d'éluion par rapport à celui obtenu en utilisant des phases stationnaires traditionnelles de type C18 ou C8. Les groupements polaires intégrés dans la chaîne alkyle inhibent les interactions secondaires entre les analytes et les groupements silanols présents à la surface de la silice. Ceci conduit à une bonne symétrie de pics pour une grande variété de composés. Les groupements polaires empêchent les chaînes alkyle de se replier en présence des molécules d'eau ce qui permet d'éviter une baisse des performances chromatographiques de la colonne en présence des phases mobiles totalement aqueuses [51].

### Colonnes de silice greffée C8

#### **Zorbax Eclipse C8**

Cette phase stationnaire utilise une technologie spéciale pour un double endcapping afin d'éviter la dissolution du support de silice dans les phases mobiles à pH intermédiaire. Elle est utile pour la séparation des acides, des bases et des composés hautement polaires [52].

#### **Waters Symetry C8**

La colonne Waters Symetry C8 présente une importante densité de ligand et une activité de silanols résiduels réduite ce qui confère une grande reproductibilité des analyses. Elle assure une amélioration de la symétrie des pics dans un domaine de pH de 2 à 8 [53].

#### **Colonne polymérique PLRP-S**

Cette colonne est constituée d'une phase stationnaire de styrène / divinylbenzène macroporeux rigide. Avec une stabilité physico-chimique remarquable, elle est robuste et ne nécessite pas la présence d'une chaîne alkyl telle que C8 ou C18 pour acquérir sa haute hydrophobicité. La phase PLRP-S est utilisée souvent pour la séparation d'oligomères et polymères synthétiques, de biomolécules gigaporeuses, de protéines et d'oligonucléotides [54].

#### **Colonne Pursuit PFP**

La colonne Pursuit PFP est constituée d'un groupement pentafluoro phényle lié à la silice par une chaîne alkyle (le plus souvent propyle) (Figure III.26). Elle offre plusieurs types d'interactions pour la rétention de composés tels que: la reconnaissance stérique, les interactions électrostatiques liés aux doublets électroniques des atomes de fluor et les interactions  $\pi$ - $\pi$  liées à la présence des noyaux aromatiques [55]. La colonne Pursuit PFP assure une rétention, une discrimination et une séparation optimales de composés polaires et une haute sélectivité pour les isomères de position.

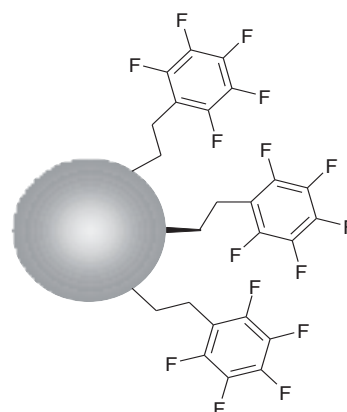


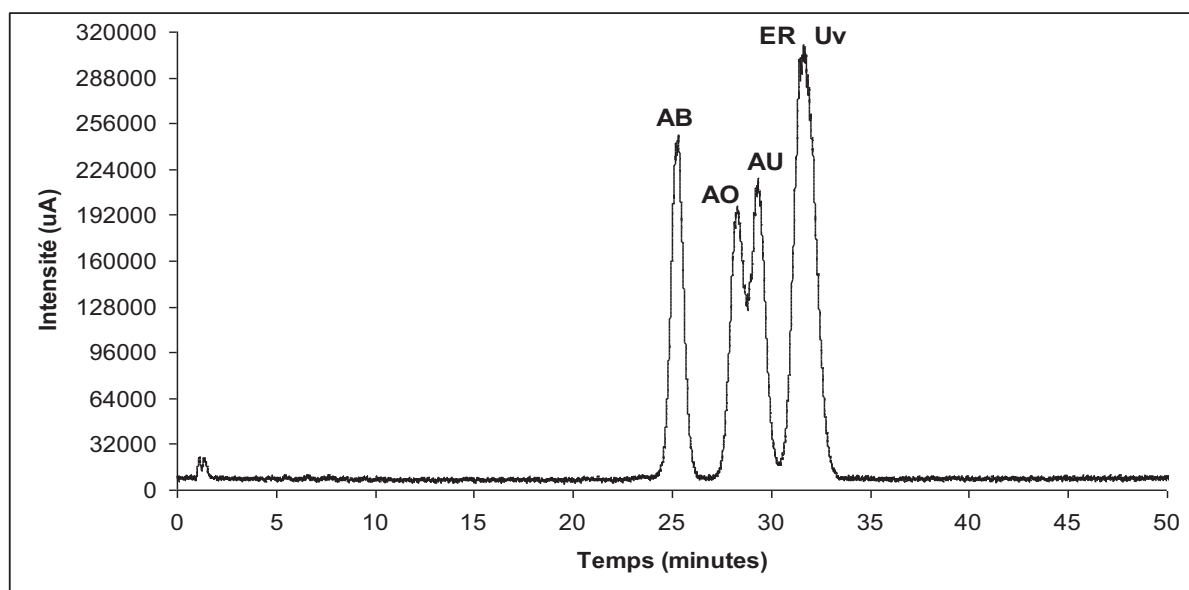
Figure III.26. Représentation schématique de la phase stationnaire PFP

Un large panel de phases stationnaires a ainsi été testé. Ces phases diffèrent principalement par leur surface spécifique et par leur greffage (avec ou sans groupement polaire inséré). Leur hydrophobie variable et l'accessibilité des silanols résiduels plus ou moins importantes doivent permettre d'envisager des sélectivités différentes de ces phases stationnaires vis-à-vis des composés triterpéniques.

### Séparation des composés triterpéniques sur les différents supports conventionnels C18 ; C8 ou fluorés

Les essais réalisés sur des phases stationnaires de silice greffée C8 ou C18 conventionnelles ou avec des groupements polaires insérés n'ont pas abouti à une séparation des 5 triterpènes étudiés. L'analyse en mode isocratique et celle en gradient d'élution ont conduit généralement à l'obtention d'un ou deux pics incluant les 5 composés. La non-résolution des analytes et dans certains cas (analyse HPLC sur la colonne PLRP-S) leur trainées rendent impossible le processus d'identification et de quantification.

Les meilleures conditions de séparation ont été observées sur la colonne Purospher STAR RP 18e (Figure III.27) en mode isocratique en ajustant le pourcentage de MeOH en phase mobile à 80% ce qui a conduit à une rétention des solutés entre 20 et 35 min et a une séparation en 4 pics non totalement résolus.



**Figure III.27. Analyse du mélange de 5 triterpènes sur colonne Purosphere STAR RP 18e**  
 AB – acide bétulinique ; AO – acide oléanolique ; AU – acide ursolique ; ER – érythrodiol ; Uv – uvaol  
 Colonne : Purosphere STAR RP 18e (LxΦ = 125 x 4 mm, 5μm);  
 Détection : DEDL : pression du gaz de nébulisation : 3 bars, température de nébulisation : 52°C, gain : 6 ;  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)  
 Elution isocratique : 20% A / 80% B

Sur cette colonne, différents essais tels que l'augmentation du pourcentage d'eau lors de l'élution en mode isocratique, l'augmentation de la température de la colonne à 45°C, le développement d'un système gradient avec deux ou trois solvants, la diminution du débit de la phase mobile, le couplage de deux colonnes de même type afin d'augmenter la quantité de phase stationnaire pour la séparation etc. ont été réalisés mais nous ne sommes pas arrivés à une séparation satisfaisante des 5 triterpènes.

Nous avons pu conclure qu'à cause de leur grande similarité de structures, la séparation par chromatographie en mode phase inverse des 5 triterpènes ciblés sur des colonnes conventionnelles de type silice greffée C18, C8, fluoré ou de type polymérique ne peut pas être réalisée de façon satisfaisante.

Nos résultats sont concordants avec ceux publiés par d'autres auteurs. Dans le cas des acides triterpéniques tels que l'acide oléanolique (AO) et l'acide ursolique (AU) qui ont des valeurs de log P très proches (6,32 et 6,46 respectivement), pour améliorer l'ébauche de

séparation sur phases de silice greffée, l'ajout de différents additifs tels que la triéthylamine [35] ou les cyclodextrines [56] dans la phase mobile s'est avéré prometteur mais non compatible avec une détection par DEDL et par spectrométrie de masse, détection nécessitant une phase mobile volatile. D'autres auteurs ont réalisé la séparation de triterpènes à un débit réduit de phase mobile dans un temps assez long [57] et même dans ces cas, les acides ursolique et oléanolique ne sont pas suffisamment séparés. En ce qui concerne les modes de détection utilisés le plus souvent les composés triterpéniques sont détectés en UV à une longueur d'onde comprise entre 205 et 215 nm [58-65] mais ce détecteur présente un désavantage majeur à cause de l'absorption UV possible des solvants organiques de la phase mobile dans cette plage de longueur d'onde.

### Essais de séparation sur colonne PGC (carbone graphitique poreux)

Selon certaines études [56], des conditions appropriées à la séparation de triterpènes peuvent être obtenues en utilisant une phase stationnaire type PGC.

Ce type de support repose sur des propriétés rétentives particulières. La surface du PGC est cristalline et hautement reproductible et ne contient pas de micropores. Au niveau moléculaire elle est constituée de feuille d'atomes de carbone arrangés en hexagone. Principalement il n'y pas de groupements fonctionnels à la surface puisque tous les atomes de carbone aromatique satisfont les valences à l'intérieur de feuilles de graphite. Ces feuillets sont maintenus enchevêtrés entre eux par des interactions dispersives de type London (interactions instantanées dipôle induit dipôle entre les atomes de carbone de feuillets adjacents). L'espace entre les couches de graphite est similaire à celui du graphite 3D mais contrairement à celui-ci, les atomes de carbone des différentes couches du PGC ne suivent pas un ordre précis. Cette conclusion est confirmée par l'analyse de diffraction par rayons X (XRD) qui établit un espace bien défini entre les couches et entre les atomes de carbone de la même couche mais n'indique pas de liaisons particulières entre les atomes de carbones d'une couche et d'une autre (Figure III.28A) comme c'est le cas pour le graphite 3D (Figure III.28B) [66].

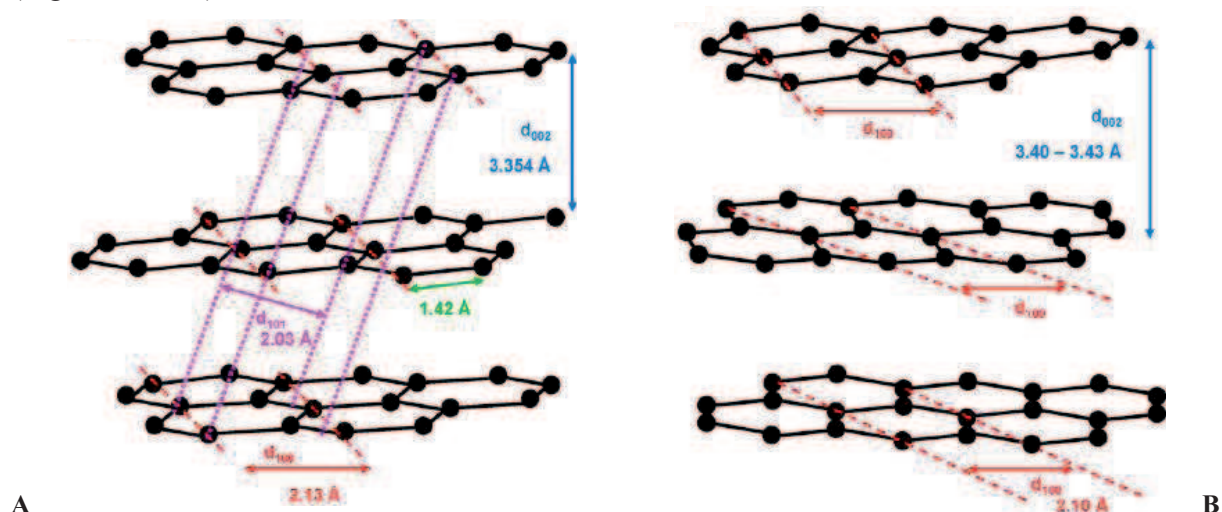


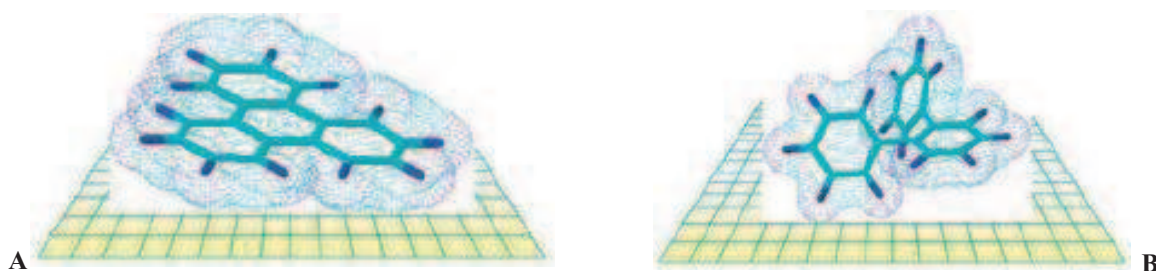
Figure III.28. Structure atomique de graphite [67]

A. graphite 2D PGC sans connexions entre les feuilles ; B. graphite 3D avec connexions entre les feuilles

La surface du graphite est plane et hautement cristalline en comparaison avec celle de la silice greffée alkyle tridimensionnelle et porteuse de groupements silanols résiduels.

La Figure III.29 illustre les possibilités d'interaction des molécules avec la surface du graphite. Plus l'analyte est plan, plus il peut s'approcher de la surface du graphite et avoir de

points d'interaction avec celle-ci ; il est alors mieux retenu. La rétention diminue dans le cas de molécules rigides et non planes car alors le contact avec la surface de graphite est réduit et se réalise plus difficilement.

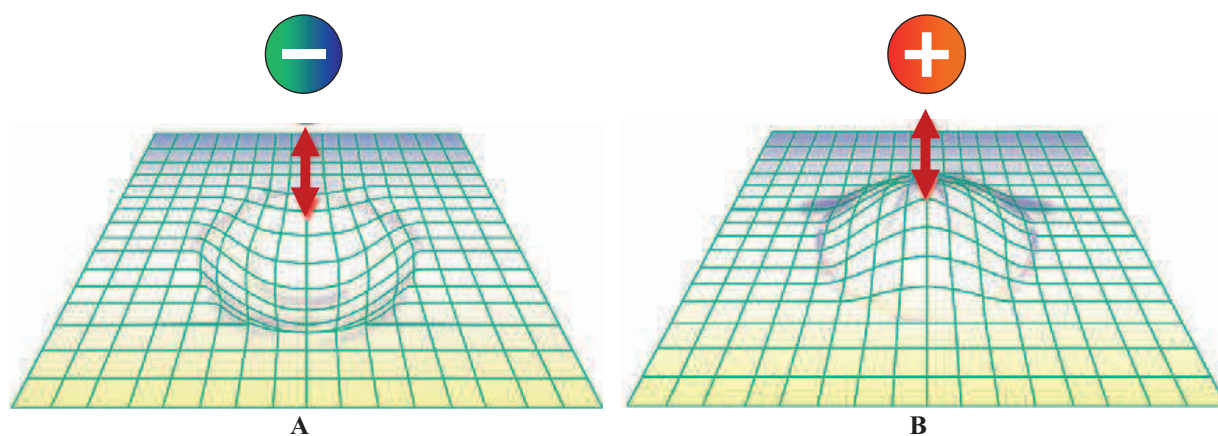


**Figure III.29. Alignement des molécules à la surface du graphite [68]**

*A. molécule plane ; B. molécule non plane*

La rétention des analytes sur la colonne PGC est affectée par plusieurs facteurs tels que :

- L'interaction éluant-analyte (de nature dispersive, dipôle-dipôle, liaisons hydrogène) qui se déroule dans l'éluant et qui ne favorise pas la rétention ;
- La répulsion hydrophobe éluant-analyte qui apparaît entre un éluant hydrophile et les segments non-polaires des analytes ce qui encourage la rétention ;
- Les interactions dispersives de type London entre la surface du graphite et les analytes qui sont contrebalancées par des interactions similaires qui ont lieu entre la surface du graphite et l'éluant et qui peuvent favoriser ou défavoriser la rétention tout en affectant la sélectivité ;
- Les interactions induites par la charge, qui peuvent avoir lieu entre l'analyte et la surface graphitique poreuse et qui interviennent lors de la rétention de molécules polaires (Figure III.30). Ces interactions sont compensées d'une certaine manière par les interactions polaires entre l'analyte et l'éluant ; elles sont plus fortes quand les groupements polaires de l'analyte sont forcés d'entrer en contact avec la surface du graphite à cause de la stéréochimie de la molécule. Dans ce cas, les interactions additionnelles dues à la substitution d'hydrogène par des groupements polaires peuvent fortement compenser les interactions analyte-solvant. Si la stéréochimie n'induit pas un contact direct de groupements polaires avec la surface graphitique poreuse l'effet reste significatif même s'il n'est pas si fort [66].



**Figure III.30. Représentation schématique des interactions dipôle-dipôle induites par une charge positive (A) ou négative (B) se trouvant à proximité de la surface du graphite [69]**

Une colonne de carbone graphitique poreux d'Hypercarb (50x4,6 mm; 5  $\mu$ m) nous a paru être la plus adéquate pour nos recherches.

### Analyse en mode isocratique

Nous avons réalisé les premiers tests en améliorant les conditions décrites par Rhourri *et al.* [70]. Le signal des solutés a été enregistré à l'aide du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière. Dans ces conditions (élution isocratique 75% MeCN / 25% iPrOH à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>) et contrairement aux résultats discutés précédemment, nous observons une séparation totale avec retour à la ligne de base entre chaque pic chromatographique pour les 5 solutés ciblés (Figure III.31). Néanmoins, on observe une traînée de pics importante pour les 2 composés les plus retenus.

L'ordre d'élution des composés est semblable à celui obtenu sur les colonnes de silice greffée C18. Une bonne rétention est notée pour les acides oléanolique et ursolique et pour les alcools : érythrodiol et uvaol (composés les moins polaires ayant les valeurs les plus élevées de log P). Le seul composé insuffisamment retenu a été l'acide bétulinique.

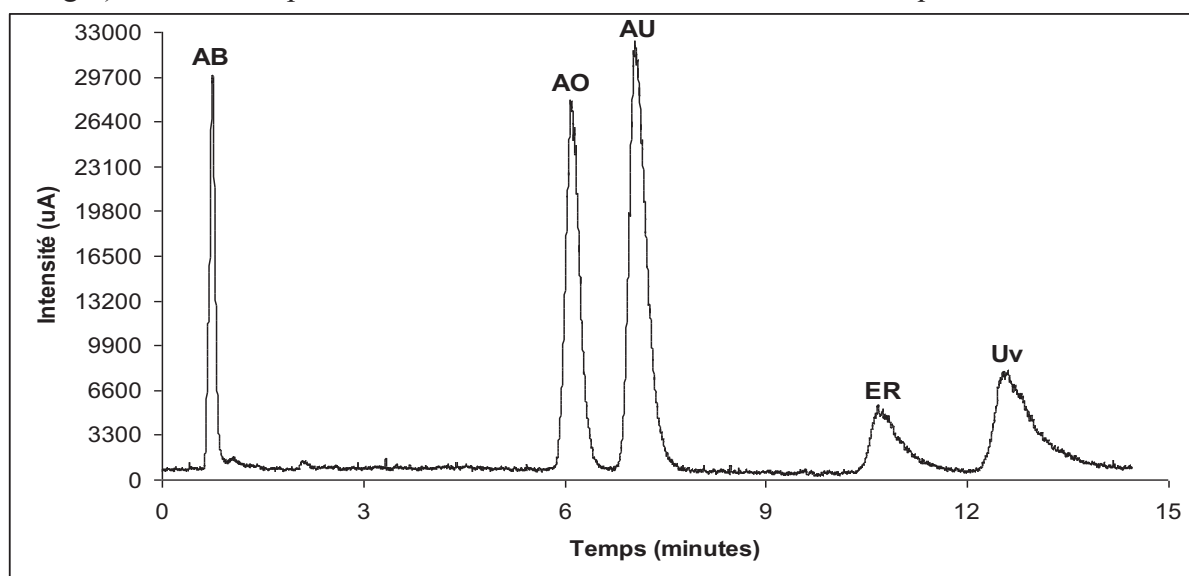


Figure III.31. Analyse du mélange de 5 triterpènes sur une colonne PGC

AB – acide bétulinique ; AO – acide oléanolique ; AU – acide ursolique ; ER – érythrodiol ; Uv – uvaol

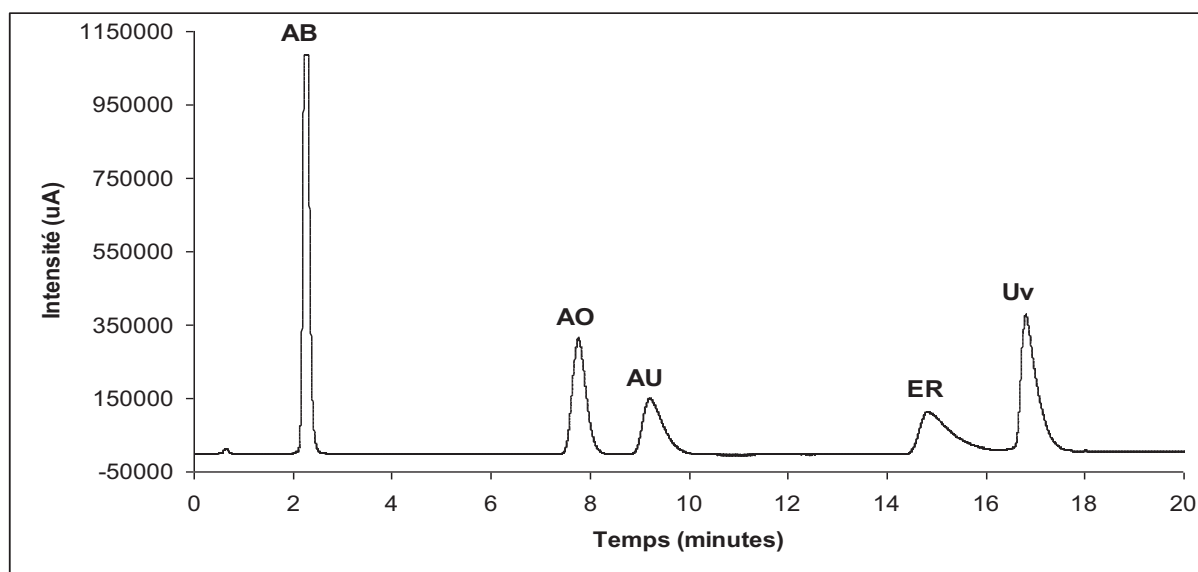
Colonne : Hypercarb (LxΦ = 50 x 4,6 mm ; 5μm);

Détection : DEDL : pression du gaz de nébulisation : 2,2 bars, température de nébulisation : 50°C, gain : 6 ;

Phase mobile : A. MeCN; B. iPrOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup> ; Elution isocratique : 75% A / 25% B

### Analyse en mode gradient

Pour mieux retenir sur la colonne l'acide bétulinique et pour améliorer l'efficacité de la séparation des composés les plus retenus, nous avons essayé plusieurs systèmes de gradients d'élution. Une phase mobile acidifiée avec 0,1% acide formique et composée de MeOH comme solvant A, de MeCN comme solvant B et d'isopropanol (iPrOH) comme solvant C a été utilisée en mode gradient d'élution : 0 min, 50% A, 50 % B ; 10 min, 100% B ; 15 min, 50% B, 50% C ; 20 min ; 50% B, 50% C. Le débit de la phase mobile a été de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La colonne a été utilisée à température ambiante. Le volume d'injection a été de 20 μL.



**Figure III.32. Analyse du mélange de standards de triterpènes sur la colonne PGC en gradient d'élution**  
*AB – acide bétulinique ; AO – acide oléanolique ; AU – acide ursolique ; ER – érythrodiol ; Uv – uvaol*  
 Colonne : Hypercarb (LxΦ = 50x4,6 mm ; 5μm)

Détection DEDL : température de nébulisation 52°C; pression du gaz de nébulisation 2,2 bars; gain 8  
 Phase mobile : A. MeOH; B. MeCN; C. iPrOH les trois acidifiés avec 0,1% HCOOH; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>  
 Gradient d'élution: 0 min, 50% A, 50% B; 10 min, 100% B; 15 min, 50% B, 50% C; 20 min, 50% B, 50% C

Dans ces conditions développées en gradient d'élution une amélioration de la séparation de tous les standards triterpéniques est notée. Les temps de rétention sont acceptables et une résolution suffisante entre chaque composé est observée (Figure III.32). Le temps d'analyse plus court qu'en mode isocratique est satisfaisant (20 minutes).

Cette étape préliminaire d'optimisation de méthodes chromatographiques nous a permis de déterminer les conditions nécessaires pour la mise en évidence de composés phénoliques et d'acides triterpéniques dans des échantillons standards.

Ainsi, nous allons retenir les conditions d'analyse développées sur la colonne Pursuit XRs C18 pour visualiser l'ensemble des familles de composés phénoliques et triterpéniques présents dans les extraits EtOH de résidus de pommes.

Pour avoir plus de détails sur la famille des triterpènes et plus particulièrement pour l'analyse des extraits EtOAc, nous allons utiliser les conditions chromatographiques développées sur la phase stationnaire PGC puisque celle-ci permet de séparer les composés qui restent coélus lors de l'analyse sur des supports de silice C18 indépendamment des conditions utilisées.

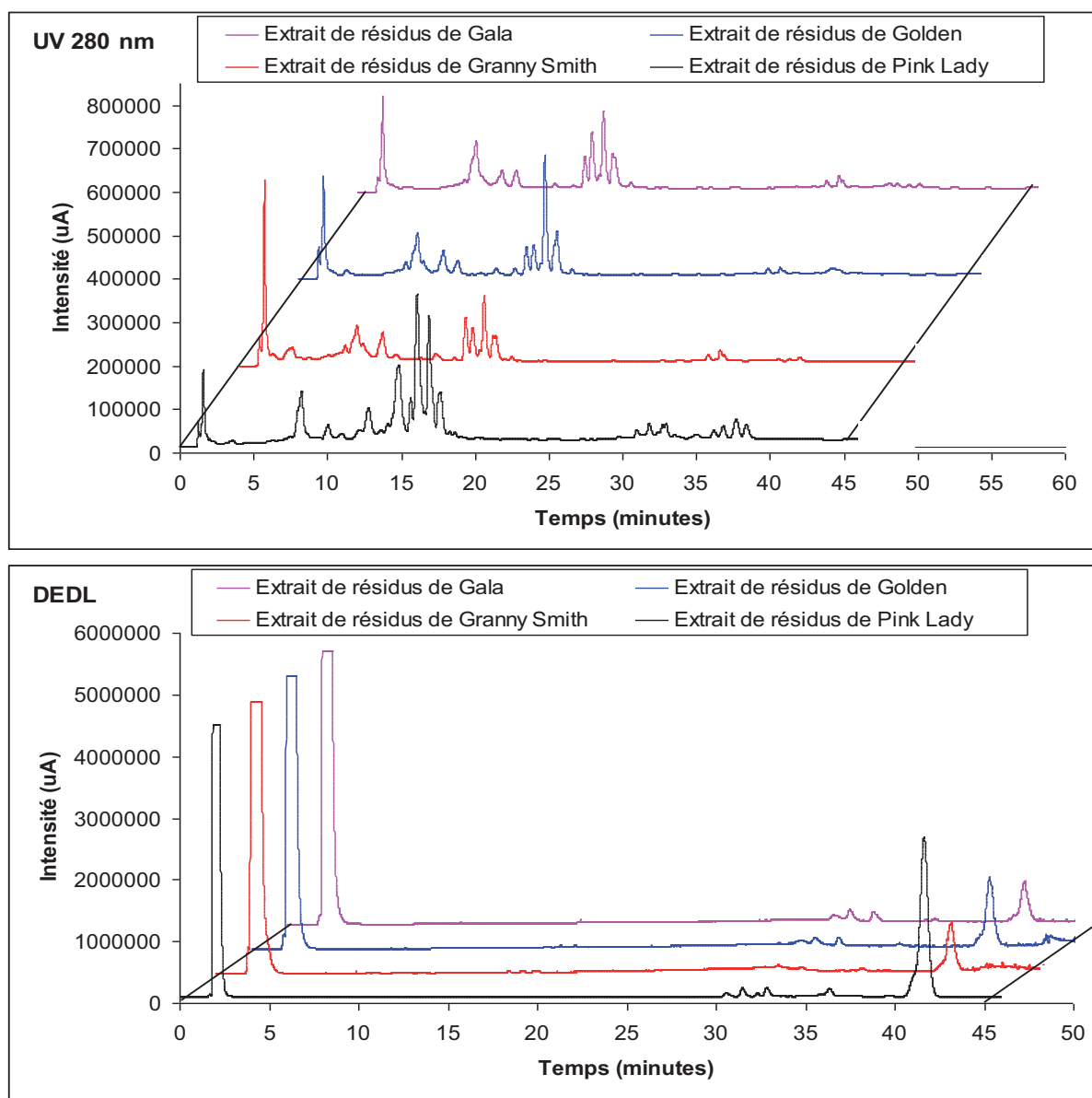
Nous allons présenter par la suite de ce chapitre les résultats obtenus lors des analyses des différents extraits de résidus de quatre variétés de pommes.

### III. 2. 3. 2. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes

#### Analyse des extraits EtOH

La Figure III.33 illustre le profil chromatographique de 4 extraits EtOH de résidus obtenus au laboratoire par la centrifugation de 4 variétés différentes de pommes. Ce profil a été réalisé sur la colonne Pursuit XRs C18 dans les conditions d'analyse décrites antérieurement.





**Figure III.33. Identification des principales familles de composés des extraits éthanoliques de résidus de pommes obtenus sous l'action des microondes**

Colonne : Pursuit XR8 C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5μm) à température ambiante ; Détection : UV 280 nm ;  
 DEDL : température de nébulisation : 52°C ; pression du gaz nébuliseur : 2,2 bars ; gain : 8  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)  
 Gradient d'éluion : 0 - 30 min, 20 - 90% B; 30 - 45 min, 90% B

Quatre groupes de composés se distinguent :

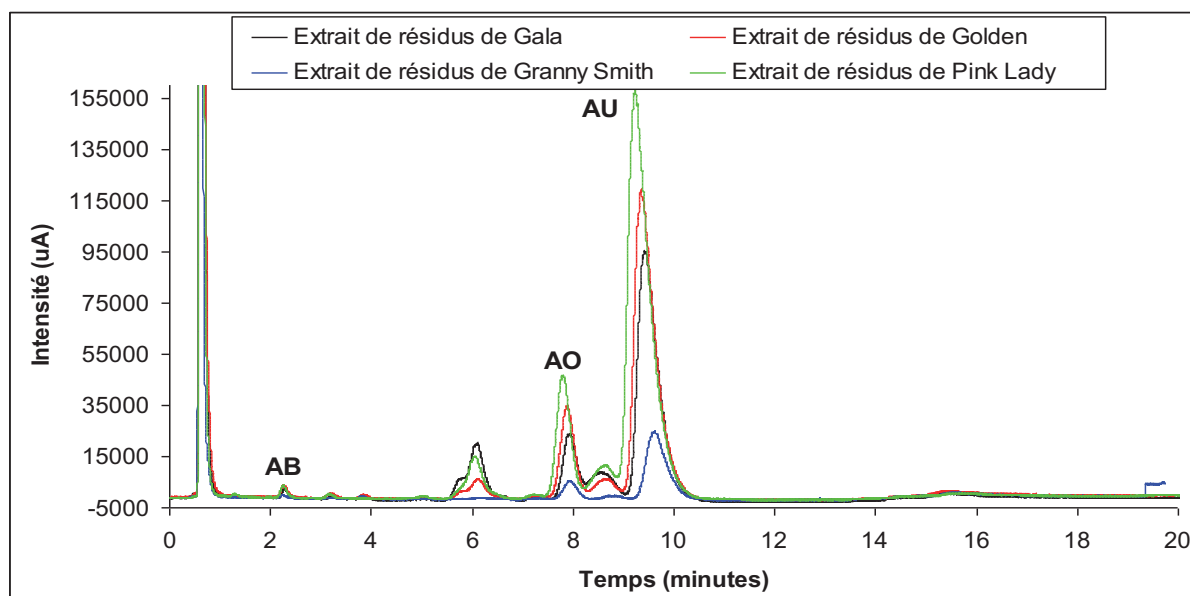
- le premier, dans la plage d'éluion comprise entre 3 et 10 minutes, correspond à des composés polaires tels que les acides benzoïques (acide gallique), les acides hydroxycinnamiques (acide chlorogénique) et les flavanols (catéchine) avec une absorbance maximale entre 280 et 330 nm.
- le deuxième groupe de composés dans la plage d'éluion comprise entre 10 et 20 minutes, correspond aux flavonols (rutine) avec une absorbance maximale à 360 nm et aux chalcones (phloridzine) avec un maximum d'absorbance à 280 nm.
- un troisième groupe de composés avec un maximum d'absorbance à 310 nm est élué entre 20 et 30 minutes (non détectés à 280 nm, Figure III.33).

- le quatrième groupe de composés moins polaires est élué dans la plage 40 à 45 minutes, absorbe très peu en UV même à faible longueur d'ondes (< 220 nm) mais est très bien détecté par DEDL. Il correspond à des triterpènes.

A l'exception des constituants de ce dernier groupe, tous les autres composés identifiés sont relativement bien séparés. Les mêmes composés sont observés pour tous les échantillons de résidus avec des différences relatives d'intensité de pics. On peut noter que l'extrait de résidus de pommes Pink Lady contient quelques composés supplémentaires ou davantage concentrés que les autres extraits. En ce qui concerne le contenu en composés triterpéniques, nos résultats ont montré clairement qu'il n'y a pas de différences majeures dans la composition en triterpènes des quatre variétés de pommes utilisées dans cette étude.

### Analyse des extraits EtOAc

Nous avons analysé ensuite les extraits de résidus de nos quatre variétés de pommes obtenus par macération à l'EtOAc en utilisant la colonne PGC dans les conditions chromatographiques développées. Cette analyse nous a permis de confirmer la présence de l'acide bétulinique, de l'acide oléanolique et de l'acide ursolique (Figure III.34) dans les 4 extraits.



**Figure III.34. Triterpènes de résidus de pommes**

*AB – acide bétulinique ; AO – acide oléanolique ; AU – acide ursolique*

Colonne : Hypercarb (LxΦ = 50x4,6 mm ; 5μm)

Détection DEDL : température de nébulisation 52°C; pression du gaz de nébulisation 2,2 bars; gain 8

Phase mobile : A. MeOH; B. MeCN; C. iPrOH les trois acidifiés avec 0,1% HCOOH; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>

Gradient d'élution: 0 min, 50% A, 50% B; 10 min, 100% B; 15 min, 50% B, 50% C; 20 min, 50% B, 50% C

Même si diverses recherches indiquent la présence de l'érythrodiol et de l'uvaol dans les variétés Golden, Granny Smith et Gala [45] nous n'avons pas réussi à les détecter dans les différents extraits que nous avons analysés.

Dans tous les échantillons, l'acide ursolique est le composé majoritaire des composés triterpéniques identifiés. Il est suivi par l'acide oléanolique et par l'acide bétulinique. Les résidus de Pink Lady v. Cripps Pink sont les plus riches en composés triterpéniques. Les résidus de Golden v. Golden et Gala v. Royal Gala Tenroy contiennent des proportions similaires d'acides triterpéniques tandis que les résidus de Granny Smith sont les moins riches.

### III. 2. 3. 3. Analyse des extraits de résidus de pommes par chromatographie en phase supercritique (SFC)

Afin d'améliorer encore la sélectivité entre les composés triterpéniques et de pouvoir éventuellement caractériser la présence de certains composés coélus ou mal séparés dans nos conditions sur PGC, nous avons voulu tester l'analyse de ces mêmes composés par chromatographie en phase supercritique – technique également disponible au laboratoire.

Nous avons vu dans le deuxième chapitre de ce manuscrit que la SFC présente le fort avantage de pouvoir utiliser le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en tant que phase mobile. Du fait de sa faible polarité, ce fluide est capable de solubiliser facilement des molécules apolaires telles que les composés triterpéniques dont nous avons remarqué la présence dans les extraits de résidus de pommes et peut constituer une méthode pour leur analyse prometteuse et alternative à celle que nous avons optimisée en chromatographie phase liquide sur le support PGC. De plus, l'ajout d'un faible pourcentage d'un modificateur organique (voir le MeOH, le MeCN etc.) dans le CO<sub>2</sub> supercritique en permettant d'augmenter la polarité de la phase mobile peut ouvrir aussi la perspective de séparer des composés plus polaires.

#### III. 2. 3. 3. 1. Analyse d'un mélange de composés standards

Avant d'essayer d'améliorer la séparation et l'identification des composés de nos extraits nous avons procédé à l'analyse d'un mélange standard de triterpènes ( $\beta$ -amyrine, bétuline, acide bétulinique, acide oléanolique, acide ursolique, érythrodiol, lupéol et uvaol) solubilisés dans le MeOH.

La phase stationnaire utilisée est une colonne Synergi Polar RP (Lx $\Phi$  = 250x4,6 ; 4  $\mu$ m ; taille des pores : 80Å ; surface spécifique : 475 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) de chez Phenomenex. Ce type de phase stationnaire est constitué de silice greffée avec des groupements phényle à liaison éther avec un endcapping hydrophile (Figure III.35). Conformément aux spécifications du fabricant cette colonne assure une bonne rétention et sélectivité des analytes polaires et aromatiques d'autant plus si la phase mobile employée contient du MeOH. Ce solvant facilite les interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les noyaux aromatiques des composés



Figure III.35. Représentation schématique de la phase stationnaire Synergi Polar RP [71]

à analyser et le groupement fonctionnel de type phényle inséré dans la phase stationnaire. Cela, à côté de la présence de la fonction éther, conduit à l'amélioration de la forme des pics et à une meilleure sélectivité. La colonne Synergi Polar-RP est utilisable sur une gamme de pH qui s'étend de 1,5 à 7 et assure des séparations reproductibles [71].

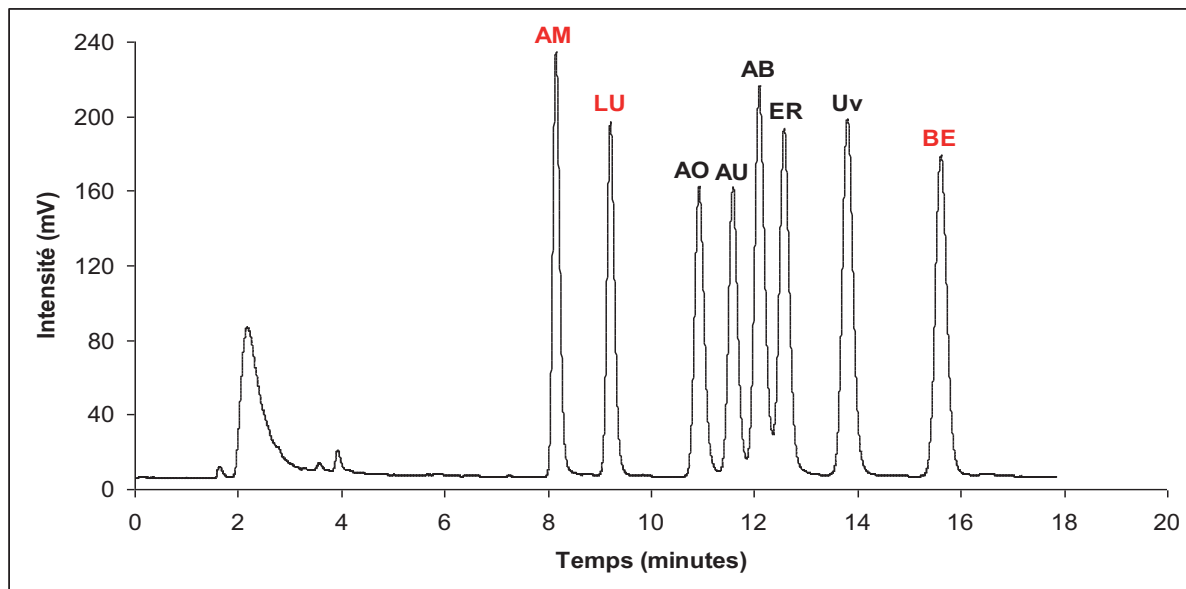
La phase mobile utilisée pour la séparation en SFC a été constituée de dioxyde de carbone avec 3% d'un mélange de modificateurs organiques : MeOH/MeCN (90/10). L'élution des composés a été réalisée en mode isocratique.

Un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (température de nébulisation 60°C ; pression du gaz de nébulisation 3 bars ; gain 7) a assuré la détection des composés élués.

La Figure III.36 illustre le profil chromatographique obtenu pour le mélange de standards de composés triterpéniques utilisé lors de la séparation sur colonne PGC. Ce mélange a été enrichi avec la  $\beta$ -amyrine, le lupéol et la bétuline (marqués en rouge sur le chromatogramme).

Comme nous pouvons constater, la SFC a conduit à une bonne séparation du mélange de standards triterpéniques avec une durée totale d'analyse n'excédant pas 18 minutes. La SFC apparaît plus résolutive que l'HPLC sur colonne PGC.

La rétention des composés se fait en fonction des groupements fonctionnels présents dans les structures de triterpènes, les composés les moins polaires ( $\beta$ -amyrine, lupéol) étant les moins retenus (Figure III.37).



**Figure III.36. Analyse du mélange de standards de triterpènes par SFC**

*AM* –  $\beta$ -amyrine ; *LU* – lupéol ; *AO* – acide oléanolique ;

*AU* – acide ursolique ; *AB* – acide bétulinique ; *ER* – érythrodiol ; *Uv* – uvaol ; *BE* – bétuline

Colonne : Synergi Polar RP (Lx $\Phi$  = 250x4,6 mm ; 4  $\mu$ m)

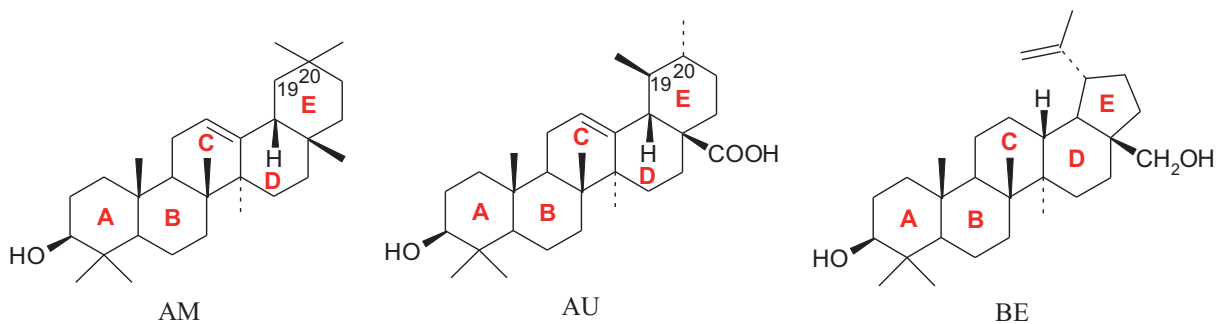
Détection DEDL : température de nébulisation 60°C ; pression du gaz de nébulisation 3 bars ; gain 7

Phase mobile : A. CO<sub>2</sub> ; B. MeOH/MeCN (90 : 10) ;

Débit : 3 mL.min<sup>-1</sup> ; Elution isocratique : 97% A / 3% B

Ils sont suivis par ceux contenant une fonction carboxyle (acide oléanolique, acide ursolique, acide bétulinique) alors que ceux qui contiennent une fonction hydroxyle (érythrodiol, uvaol, bétuline) sont les plus retenus.

A l'intérieur de chaque groupe de composés nous pouvons constater un certain ordre d'éluion. Les moins retenues sont les molécules de type oléanane qui se caractérisent par la présence de deux méthyles sur le carbone 20 du cycle E. Des temps de rétention supérieurs sont constatés pour les ursanes qui ont deux méthyles sur des atomes de carbone voisins (C<sub>19</sub> et C<sub>20</sub>). L'existence d'un cycle à 5 atomes de carbone dans la structure des molécules type lupanes peut être responsable du fait que celles-ci sont plus retenues sur la phase stationnaire.



**Figure III.37. Structures de certains standards analysés par SFC**

*AM* –  $\beta$ -amyrine ; *AU* – acide ursolique ; *BE* – bétuline

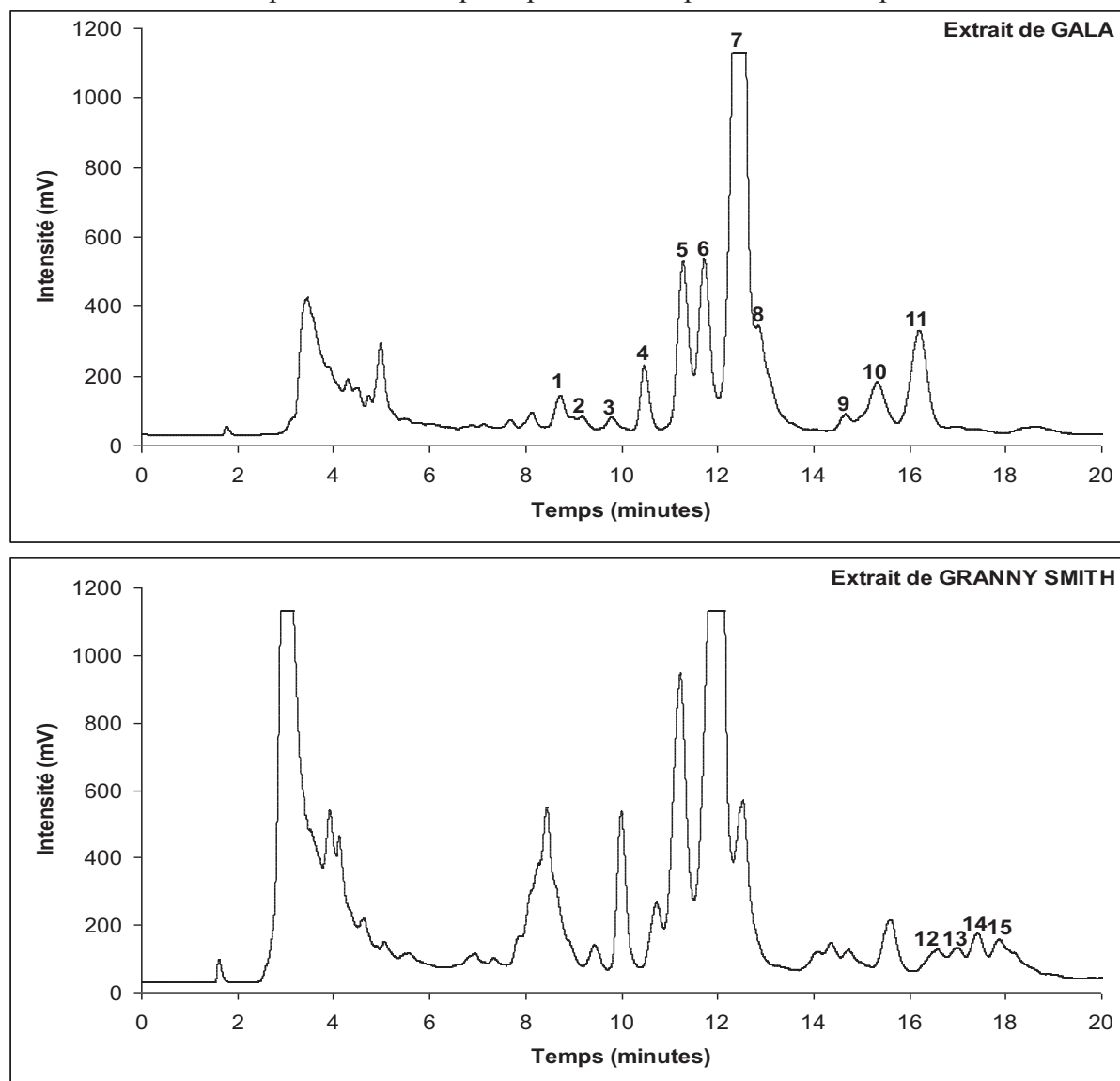
### III. 2. 3. 3. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes

La bonne séparation des composés constituant le mélange des standards nous a incités à analyser les extraits de résidus de pommes dans les mêmes conditions.

Nous avons remarqué au cours de nos recherches que les empreintes chromatographiques des extraits de résidus de Royal Gala, Golden et Pink Lady sont similaires (seul l'extrait de Royal Gala est présenté dans la Figure III.38). En revanche, les extraits de Granny Smith présentent quelques pics supplémentaires (pics 12 à 16) en fin d'élution.

Les chromatogrammes des extraits en SFC sont plus riches que ceux obtenus en HPLC sur PGC (Figure III.34) ce qui confirme le meilleur pouvoir résolutif de la SFC.

Pour analyser un mélange complexe inconnu (nombre de constituants inconnu) il est donc nécessaire de disposer de technique séparatives les plus résolutive possible.



**Figure III.38. Analyse des extraits de résidus de pommes Gala et Granny Smith par SFC**

*1-15 – fractions collectées en sortie de colonne*

Colonne : Sinergy Polar RP (LxΦ = 250x4,6 mm ; 4 μm)

Détection DEDL : température de nébulisation 60°C; pression du gaz de nébulisation 3 bars; gain 7

Phase mobile : A. CO<sub>2</sub>; B. MeOH/MeCN (90 : 10); Débit : 3 mL.min<sup>-1</sup>; Elution isocratique : 97% A / 3% B

Solutions injectées : extrait résidus de pommes Gala : 10 μL à 5 mg.L<sup>-1</sup>; extrait résidus de pommes Granny Smith : 10 μL à 1,5 mg.L<sup>-1</sup>

Après comparaison avec les temps de rétention des composés standards analysés antérieurement nous pouvons confirmer notamment la présence de certaines molécules triterpéniques telles que l'acide ursolique (le pic majoritaire des extraits avec un temps de rétention d'environ 12 min) (pic 7), l'acide oléanolique (pic 6) et l'acide bétulinique (pic 8) (Figure III.38).

Les deux extraits présentés n'ayant pas été injectés à la même concentration, il ne nous est donc pas possible de comparer et discuter de façon plus approfondie, l'abondance relative de chacun des composés des 2 extraits.

Afin de pouvoir mieux caractériser ces composés, nous avons réalisé 5 collectes successives des pics 1-11 de l'extrait de résidus de pommes Royal Gala et pics 12-15 de l'extrait de résidus de pommes Granny Smith. Ces collectes ont été ensuite dissoutes dans un faible volume de MeOH et analysées ensuite par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus seront présentés lors de la discussion suivante concernant l'étude des extraits par spectrométrie de masse (sous-chapitre III. 2. 3. 4. 3).

### **III. 2. 3. 4. Analyse des extraits de résidus de pommes par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (HPLC-MS) en vue d'une identification des composés présents**

#### **III. 2. 3. 4. 1. Analyse d'un mélange de composés standards**

##### **Conditions opératoires**

Afin d'obtenir des informations supplémentaires concernant les molécules extraites nous avons utilisé un couplage HPLC-MS.

Un appareil Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) équipé d'une pompe binaire, d'un four et d'un détecteur à barrettes de diodes a été couplé à un spectromètre de masse (API 3000 triple quadripôle de ABI Sciex, Forster City, CA, USA). Une source TurboIonSpray (électrospray ESI) et une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) reconnues comme étant appropriées pour la détection des composés phénoliques et triterpéniques [72-76] ont été employées en mode positif et en mode négatif (Tableau III.7). L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et gaz rideau.

L'acquisition et le traitement des données enregistrées ont été réalisés par le logiciel Analyst v. 1.4.2.

**Tableau III.7. Paramètres des sources d'ionisation utilisées**

<i>Paramètres MS</i>	<i>ESI +</i>	<i>ESI -</i>	<i>APCI +</i>	<i>APCI -</i>
Débit de gaz de nébulisation (NEB = 8), L.min <sup>-1</sup>	1,2	1,2	1,2	1,2
Débit du gaz rideau (CUR = 8), L.min <sup>-1</sup>	1,2	1,2	1,2	1,2
Tension de spray (IS), V	4200	- 4000	4200	- 4000
Température de la source (Tem), °C	100	200	400	400
Tension de l'orifice (DP), V	70	- 100	70	- 100
Tension de l'anneau (FP), V	300	- 400	300	- 400
Tension du quadripôle Q0 (EP), V	10	- 10	10	- 10
Courant électrique, µA			4	- 4

Les colonnes chromatographiques Pursuit XR<sub>s</sub> C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5µ) de Varian et PGC (LxΦ = 30x4,6 mm ; 5µ) de ThermoHypersil ont été utilisées thermostatées à

20°C pour la séparation chromatographique. Les phases mobiles (1 mL.min<sup>-1</sup>) et les conditions de gradients d'éluion ont été identiques à celles développées lors des analyses par HPLC-UV-DEDL.

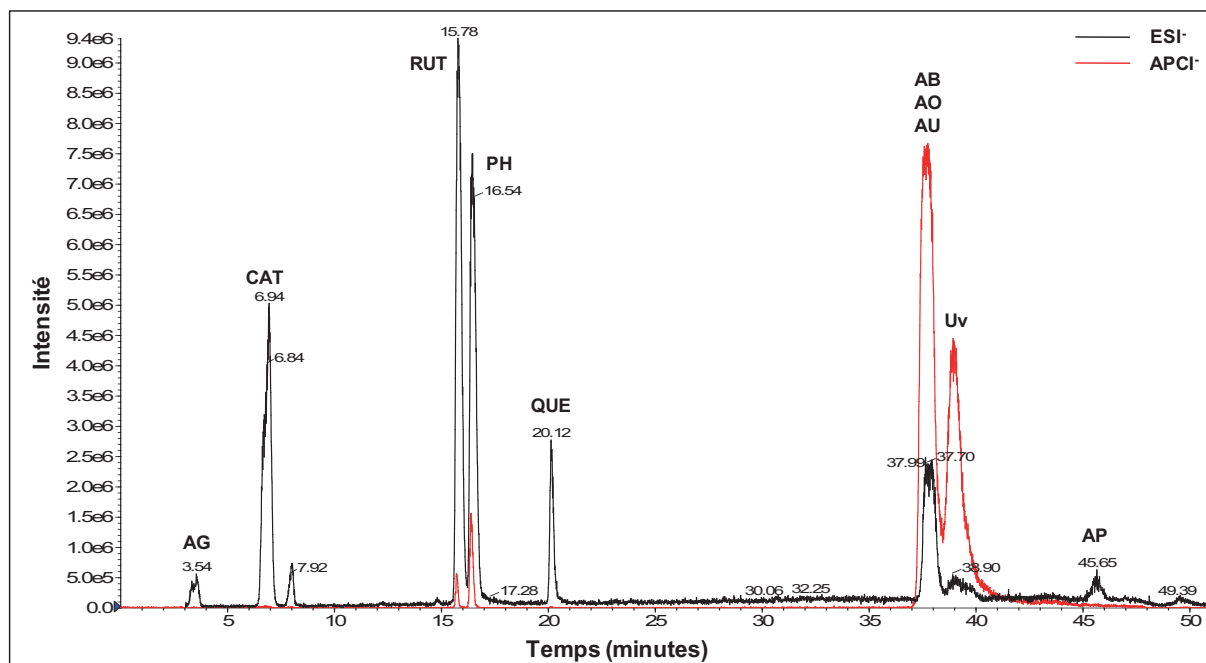
Lors du couplage HPLC-ESI-MS, le débit d'effluent de la colonne chromatographique a été réduit par un split d'1/3 entre le DAD et le MS. L'analyse a été effectuée en mode full scan. Le courant ionique total (TIC) a été mesuré entre 100 et 1000 uma par incrément de 0,5 uma.

Pour augmenter la précision des formules brutes obtenues par HPLC-MS basse résolution un autre couplage HPLC-MS a été utilisé, cette fois-ci en haute résolution. Ainsi un spectromètre de masse UHR-QToF maXis (Bruker, Bremen, Allemagne), équipé avec une source ESI a été couplé à une chaîne UHPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Germering, Allemagne). L'enregistrement et le traitement des données ont été assurés par le logiciel Data Analysis v. 4.0 (Bruker Daltonik). Ce logiciel est capable (à l'aide d'une base de données spécifique appelé SmartFormula™ Editor) de proposer plusieurs formules brutes pour une masse moléculaire donnée.

### Analyse d'un mélange de composés standards

Des aliquotes de 20 µL du mélange de 12 composés standards (6 composés phénoliques, 5 composés triterpéniques, 1 acide gras) à une concentration de 0,083 g.L<sup>-1</sup> étudié précédemment par HPLC-UV ont été injectés en HPLC-MS.

La Figure III.39 illustre les résultats obtenus après l'analyse avec les deux sources d'ionisation (ESI et APCI) en mode négatif. L'enregistrement est fait en mode full scan. Les rapports *m/z* suivis sont ceux des ions pseudomoléculaires [M-H]<sup>-</sup> des 12 solutés standards.



**Figure III.39.** Analyse HPLC-MS ESI XIC des standards de composés phénoliques et triterpéniques  
 AG – acide gallique (*m/z* = 169); CAT – catéchine (*m/z* = 289); AC – acide chlorogénique (*m/z* = 353);  
 RUT – rutine (*m/z* = 609); PH – phloridzine (*m/z* = 273); QUE – quercétine (*m/z* = 301); AB – acide  
 bétulinique (*m/z* = 455); AO – acide oléanolique (*m/z* = 455); AU – acide ursolique (*m/z* = 455);  
 Uv – uvaol (*m/z* = 455); AP – acide palmitique (*m/z* = 255)

Colonne : Pursuit XRs C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5µm) ; Détection : MS ;

Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup> ; Split : 1/3

Gradient d'éluion : 0 - 30 min, 20 - 90% B; 30 - 45 min, 90% B

A travers ces analyses nous avons constaté que l'utilisation de la source d'ionisation par électrospray est bien adaptée à la détection des composés phénoliques car elle permet une bonne ionisation de ces solutés d'où une intensité de signal suffisante pour avoir une sensibilité de détection satisfaisante. En revanche les composés terpéniques sont plus faiblement ionisés avec une source de type ESI. Pour ces solutés, l'ionisation par une source de type APCI apparaît nettement plus favorable pour une détection plus sensible.

Le Tableau III.8, regroupe pour chacun des solutés standards en fonction du mode d'ionisation choisi, les rapports  $m/z$  caractéristiques de leur ion pseudomoléculaire (en gras dans le tableau) et de leurs principaux ions fragments.

En regardant les résultats obtenus nous pouvons remarquer que, généralement, les composés phénoliques présentent en mode positif un adduit de sodium  $[M+H+Na]^+$  (rutine :  $m/z$  633,5 ; phloridzine :  $m/z$  459,5 ; quercitrine :  $m/z$  471,5).

En mode négatif, le plus souvent nous pouvons constater la perte d'eau ( $[M-H-H_2O]^-$  perte de  $m/z$  18) ou la perte d'un groupement CO ( $[M-H-CO]^-$ , perte de  $m/z$  28) pour l'ion pseudomoléculaire. Les composés phénoliques glycosylés tels que la rutine ou la phloridzine perdent les motifs de sucre. Ainsi, la rutine perd le rutinose ( $m/z$  309) et la phloridzine perd le glucose ( $m/z$  162). Cette perte a été aussi présentée par d'autres études [76-77]. Des adduits de la molécule analysée elle-même peuvent être aussi présents comme c'est le cas de la catéchine ( $m/z$  580), de la phloridzine ( $m/z$  872) et de l'acide chlorogénique :  $m/z$  707,5.

Certains composés phénoliques se fragmentent très peu et juste dans un des modes d'ionisation utilisés. Ainsi, l'acide gallique et la quercétine ne présentent de fragmentations qu'en mode d'ionisation par électrospray négatif.

En ce qui concerne les molécules triterpéniques nous avons observé qu'en mode négatif elles perdent juste une molécule d'eau. En revanche, en mode positif elles subissent une fragmentation plus accentuée. Ainsi, elles perdent aussi des fragments de  $m/z$  18 (eau) et de  $m/z$  46 (HCOOH). De plus un clivage de type retro-Diels-Alder (RDA) au niveau du cycle C (Figure III.40) a été remarqué. Cette fragmentation a été rapportée par d'autres chercheurs également [78-79]. Différentes études [73, 80-81] indiquent aussi la possibilité d'un clivage retro-Diels-Alder pour les composés phénoliques. Au cours de nos analyses, nous l'avons constaté dans le cas de la quercétine ( $m/z$  151 et 179).

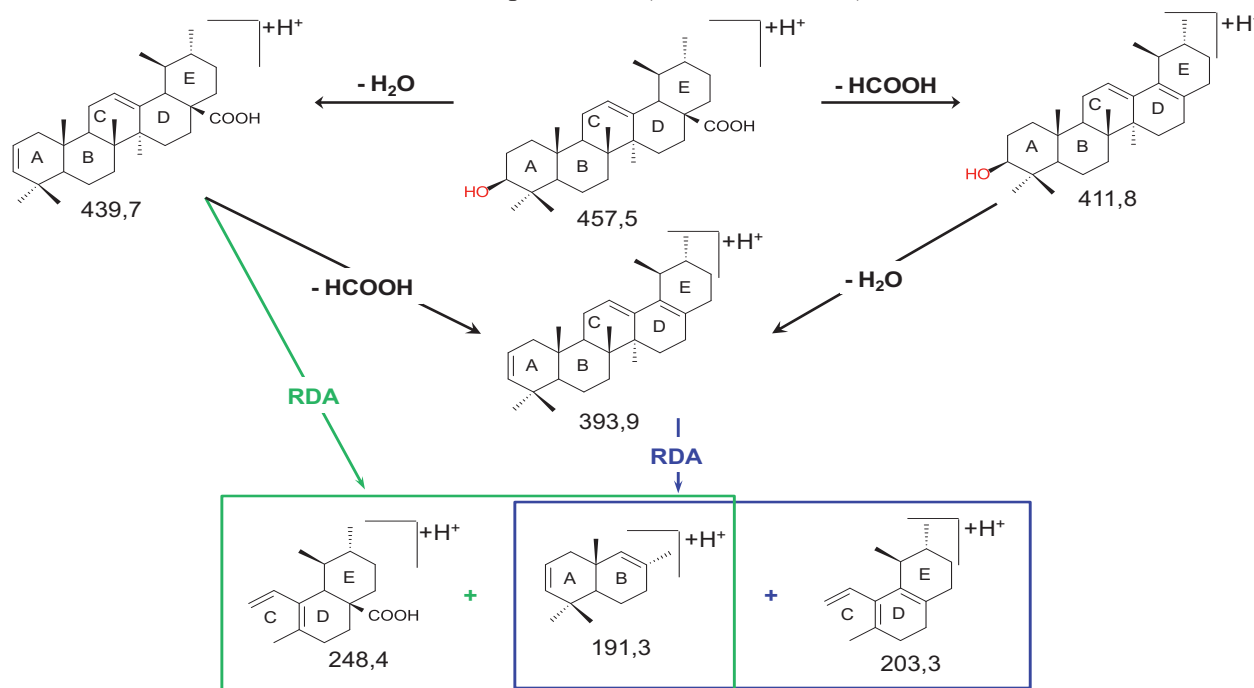


Figure III.40. Fragmentation de l'acide ursolique en mode positif (adapté d'après [78, 82])



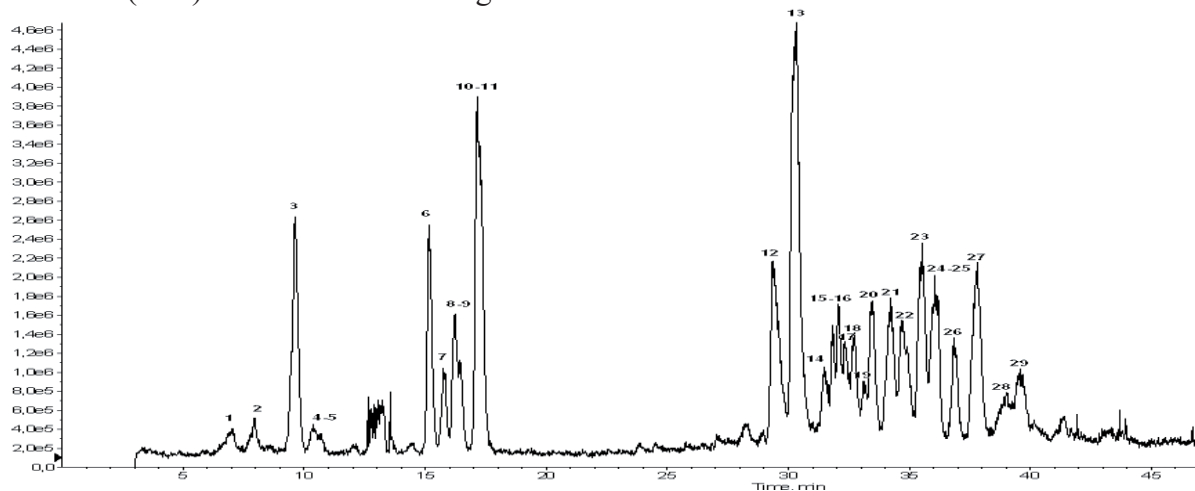
**Tableau III.8. Valeurs des rapports  $m/z$  des différents ions observés dans le spectre de masse des 12 standards. Sources ESI et APCI en mode négatif et positif**

<i>Composé</i>	<i>t<sub>r</sub></i> (min)	<i>Masse molaire</i> (g.mol <sup>-1</sup> )	<i>Mode de détection</i>			
			<i>ESI négatif</i> ( <i>m/z</i> )	<i>APCI négatif</i> ( <i>m/z</i> )	<i>ESI positif</i> ( <i>m/z</i> )	<i>APCI positif</i> ( <i>m/z</i> )
Acide gallique (AG)	3,1	170,1	339,5 ; <b>169</b> ; 125 ;			
Catéchine (CAT)	6,4	290,2	580 ; <b>289</b> ; 245,5 ;		<b>291</b>	
Acide chlorogénique (AC)	7,5	354,3	730 ; 707,5 ; 375 ; <b>353,5</b> ; 191,5		731,5 ; 377 ; <b>355</b> ; 163,5	
Rutine (RUT)	15,3	610,7	<b>609,5</b> ; 300,5 ; 271,5	<b>609,5</b> ; 300,5 ; 271,5	633,5 ; <b>611</b> ; 465,5 ; 303	
Phloridzine (PH)	16	436,4	894 ; 872 ; <b>435,5</b> ; 273,5 ; 167	<b>435,5</b> ; 273,5 ; 167	459,5 ; 275	
Quercitrine	17	448,3	<b>447,5</b> ; 300,5 ; 271,5 ; 255,5		471,5 ; 303,5	
Quercétine (QUE)	19,6	302,2	<b>301,5</b> ; 151 ; 179		<b>303</b>	
Acide bétulinique (AB)	37,8	456,7	934 ; 912 ; <b>455,5</b>	472 ; <b>455</b> ; 438	439,5	<b>457,5</b> ; 439,5 ; 411,5 ; 393,5 ; 203,5 ; 137,5 ; 191,5 ; 149,5
Acide oléanolique (AO)	38,9	456,7	934 ; 912 ; <b>455,5</b>	472 ; <b>455</b> ; 438	913,5 ; 936 ; 479,5 ; 439,5 ; 411,5 ; 249,5 ; 203,5 ; 191,5	439,5 ; 411,5 ; 393,5 ; 249,5 ; 203,5 ; 191,5 ; 149,5
Acide ursolique (AU)	39,5	456,7	934 ; 912 ; <b>455,5</b>	472 ; <b>455</b> ; 438	443,5 ; 425,5 ; 191,5	443,5 ; 439,5 ; 425,5 ; 407,5 ; 411,5 ; 235 ; 217,5 ; 203,5 ; 191,5 ; 149
Uvaol (Uv)	39,9	442,7			<b>443,5</b> ; 425,5 ; 191	
Acide palmitique (AP)	45	256,4			<b>256,5</b>	

\*en gras – l'ion pseudo moléculaire [M-H]<sup>-</sup> (ionisation négative) ou [M+H]<sup>+</sup> (ionisation positive)

### III. 2. 3. 4. 2. Analyse des extraits de résidus de pommes (Colonne Pursuit XRs C18)

Vu la grande similarité de composition chimique des différentes variétés de pommes nous avons limité l'identification moléculaire de ces composés à l'extrait de résidus de pommes Gala obtenu par extraction assistée par microondes (3 cycles de 30 s à 1000 W) à l'EtOH. Le chromatogramme reconstruit à partir des courants ioniques extraits les plus abondants (XIC) est illustré dans la Figure III.41.



**Figure III.41. Analyse HPLC-MS ESI XIC de l'extrait de résidus de pommes Gala 1-29 ions [M-H] des Tableaux III.9 et III.10 ;  $m/z$  recherchés : 577 ; 353 ; 289 ; 517 ; 351 ; 337 ; 567 ; 609 ; 433 ; 435 ; 447 ; 487 ; 485 ; 471 ; 633 ; 469 ; 617 ; 605 ; 455**

Colonne : Pursuit XRs C18 (Lx $\Phi$  = 150x4,6 mm ; 5 $\mu$ m) ; Détection : MS en mode ESI négatif ;  
Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH ; Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup> ; Split : 1/3 ;  
Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B

Après l'analyse des temps de rétention, des fragmentations acquises par MS basse résolution et des séries de formules brutes obtenues par HRMS grâce à Smart Formula Editor nous pouvons proposer des noms ou des formules brutes pour les 29 composés différents détectés. Les données spectrales enregistrées par MS sont présentées dans le Tableau III.8 et Tableau III.9. Comme nous avons supposé ces molécules sont des composés phénoliques et des composés triterpéniques. Les analyses effectuées nous ont permis d'indiquer la similarité entre certains ions et certains standards testés tels que l'acide chlorogénique (2), la rutine (7), la phloridzine (9), la quercitrine (11), l'acide bétulinique (27), l'acide oléanolique (28) et l'acide ursolique (29). La comparaison avec les résultats rapportés dans la littérature [83-86] nous a aidé à déterminer l'existence d'autres molécules tels que : l'acide 3-digitalose-quinique (4), l'acide coumaroylquinique (5), la phloretin-2'-xyloside (6). A part les trois acides triterpéniques mentionnés antérieurement, différents autres composés appartenant au même groupe ont été également détectés dans nos extraits. Parmi ceux-ci nous pouvons citer l'acide annurcoïque (13), l'acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc (17). Une masse moléculaire pouvant correspondre à l'acide pomolique a été détectée au niveau de différents pics (14, 19-22). Ne possédant pas de standard d'acide pomolique nous ne pouvons pas établir avec certitude une relation entre un pic chromatographique et cette molécule. Toutefois l'acide pomolique et des isomères de cette molécule sont certainement présents dans cet échantillon. Nos suppositions concordent avec celles rapportées par d'autres études [44, 87-88]. Pour certains ions moléculaires (1, 3, 4, 5, 11) on observe en plus aux ions moléculaires des fragments en mode d'ionisation négatif alors que pour d'autres (15, 16, 23, 25) aucune fragmentation n'a été observée dans les conditions utilisées. Nous avons remarqué aussi que pour plusieurs composés les ions pseudo moléculaires ont été détecté seulement en mode positif (4, 5, 9, 11, 24, 29). De plus, pour les composés 3, 23 et 25, nous pouvons proposer plusieurs formules brutes sans être capables de savoir laquelle correspond exactement au composé.

**Tableau III.9. Ions caractéristiques des composés phénoliques de l'extrait de résidus de pommes Gala**

Ions	$t_r$ (min)	Mode positif		Mode négatif		Formule brute	Propositions des structures
		$[M+H]^+$ (m/z)	Ions fragment (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragment (m/z)		
1	6,6	579,14893		577,135	451 ; 425 ; 407 ; 289 ; 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	Procyanidine dimer ou autre
2	7,5	355,10236	163	353,08772	191	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Acide chlorogénique*
		291,08627		289,07204	245 ; 205 ; 187 ; 109 ; 203 ; 151 ; 125	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Epicatéchine
3	9,2	519,24316		517,22863	385 ; 293 ; 233 ; 223 ; 205 ; 191 ; 153 ; 149	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>12</sub>	/
4	9,7			351,0932	101 ; 113	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Acide 3-digitalose-quinique ou autre
5	10,1			337,09297	173	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Acide coumaroylquinique ou autre
6	14,7	569,18648	437 ; 275	567,17191	273	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	Phloretin xyloglucoside ou autre
7	15,3	611,16066	465 ; 303	609,145921	463	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Rutine*
8	15,8	435,09219	303	433,07782	301	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Quercétin pentoside ou autre
9	16		275	435,12955	273 ; 167	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Phloridzine *
10	16,8	435,09219	303	433,07764	301	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Quercétin pentoside ou autre
11	17			447,09307	301	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Quercitrin*

\* Standards injectés

**Tableau III.10. Ions caractéristiques des composés triterpéniques de l'extrait de résidus de pommes Gala**

Ions	$t_r$ (min)	Mode positif		Mode négatif		Formule brute	Proposition des structures
		$[M+H]^+$ (m/z)	Ions fragment (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragment (m/z)		
12	29	489,35804	407 ; 425 ; 453 ; 471	487,34281	469 ; 426	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	Acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,13 $\beta$ -trihydroxyurs-11-en-28-oic ou autre
13	29,9	487,34196	423 ; 469 ; 405 ; 451	485,32724	468 ; 423 ; 406	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	Acide annurcoïque ou autre
14	31,2	473,36262	455 ; 437 ; 409 ; 391 ; 191 ; 201	471,34787	454 ; 410 ; 407 ;	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ou autre
15	31,4	635,3945		633,37981		C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	Acide 3 $\beta$ -trans-p-coumaroyloxy-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,13 $\beta$ -trihydroxy-urs-11-en-28-oic ou autre
16	31,8	635,395		633,38007		C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	Acide 3 $\beta$ -cis-p-coumaroyloxy-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,13 $\beta$ -trihydroxy-urs-11-en-28-oic ou autre

Tableau III.10. Ions caractéristiques des composés triterpéniques de l'extrait de résidus de pommes Gala (suite)

Ions	$t_r$ (min)	Mode positif		Mode négatif		Formule brute	Proposition des structures
		$[M+H]^+$ (m/z)	Ions fragment (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragment (m/z)		
17	32,1	471,34662	453 ; 425 ; 407 ; 219 ; 201	469,33292	451 ; 423 ; 407	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc ou autre
19	33	473,3623	455	471,34819	342	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ou autre
20	33,4	473,3624	455	471,34846	342 ; 212	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ou autre
21	34,3	473,3625	455	471,34864	241	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ou autre
22	34,8	473,36235		471,3485		C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ou autre
23	35,8	471,34653		469,33291		C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc ou autre
		619,39882		617,38475		C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	3β-trans-p-coumaroyloxy-2α-hydroxyurs-12-en-28-oïc ou autre
24	36,4			469,33291		C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc ou autre
				605,30666		C <sub>43</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	/
25	36,8	619,39899		617,38501		C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	Acide 3β-cis-p-coumaroyloxy-2α-hydroxyolean-12-en-28-oïc ou autre
		605,40187					
26	37,8			617,38495		C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	Acide 3β-cis-p-coumaroyloxy-2α-hydroxyolean-12-en-28-oïc ou autre
27	37,8		439 ; 411 ; 203 ; 191	455,35364	325	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide bétulinique*
28	38,9	457,36749	439 ; 411	455,35383	407 ; 325	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide oléanolique*
29	39,5		439 ; 411	455,35359	407	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide ursolique*

\* Standards injectés

### III. 2. 3. 4. 3. Analyse des extraits de résidus de pommes (Colonne PGC)

Vu qu'au cours de nos analyses nous avons remarqué que les composés triterpéniques sont mieux séparés sur une phase stationnaire de type PGC et que la source d'ionisation APCI est plus appropriée pour la détection de ces composés nous avons décidé de réaliser un couplage complémentaire HPLC-MS-APCI pour confirmer l'identification des molécules triterpéniques faites à partir du couplage HPLC-MS-ESI précédent.

Par conséquent, nous avons analysé le même extrait de résidus de pommes Gala obtenu par extraction assistée par microondes (3 cycles de 30 s à 1000 W) à l'EtOH.

Le chromatogramme reconstruit à partir des XIC les plus abondants est illustré dans la Figure III.42.

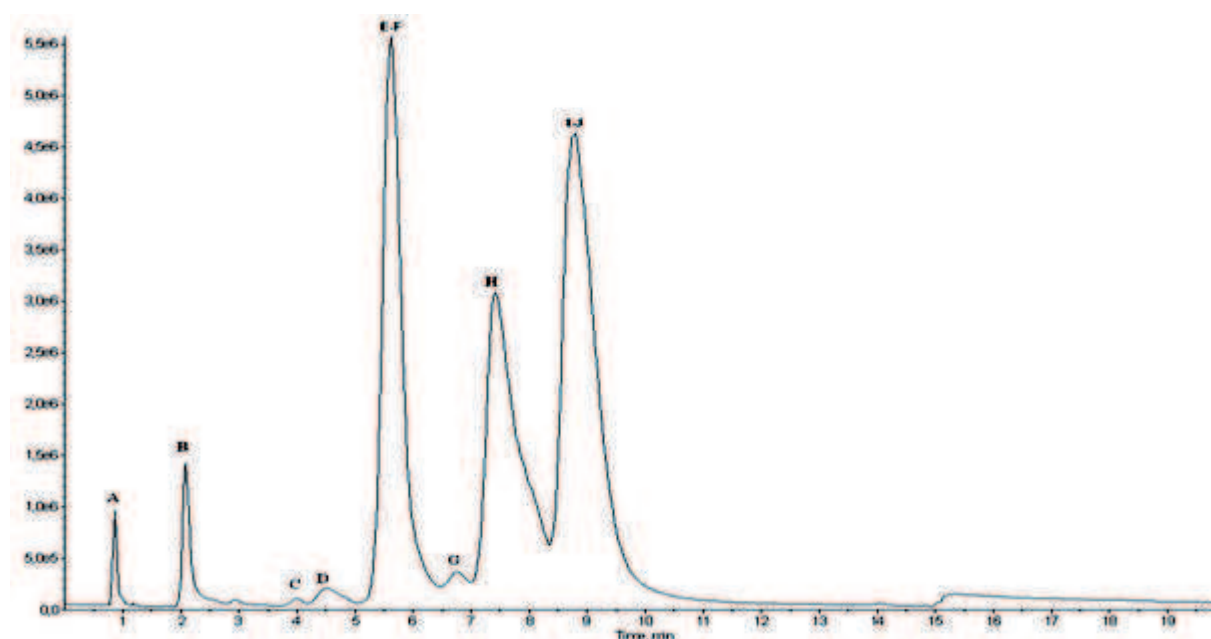


Figure III.42. Analyse HPLC-MS APCI SIM de l'extrait de résidus de pommes Gala sur colonne PGC

A-J ions du Tableau III.11 ;  $m/z$  recherchés : 205,5 ; 453 ; 455 ; 46,5 ; 472 ; 474 ; 486 ; 51,5

Colonne : Hypercarb (LxΦ = 30x4,6 mm ; 5μm) ; Détection : MS en mode APCI négatif ;

Phase mobile : A. MeOH ; B. MeCN ; C. iPrOH les trois acidifiés avec 0,1% HCOOH ;

Débit : 1 mL.min<sup>-1</sup> ; Split : 1/3

Gradient d'élution: 0 min, 50% A, 50% B ; 10 min, 100% B ; 15 min, 50% B, 50% C ; 20 min, 50% B, 50% C

L'acide bétulinique, l'acide oléanolique et l'acide ursolique ont été identifiés respectivement comme les pics **B**, **H** et **J** (Tableau III.11), après avoir injecté le mélange de standards et comparer les temps de rétention et les spectres de masse. Pour les autres pics nous pouvons proposer les structures suivantes: **E** – acide 2α, 3β, 13β-trihydroxyurs-11-en-28-oïc ou acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc ; **F** – acide annurcoïque ; **G** – acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oïc ; **I** – acide pomolique. Ces pics ont un schéma de fragmentation identique à celui présenté dans le paragraphe précédent (III.2.3.4.2.). Ainsi, ils présentent une perte d'eau, une perte de HCOOH, suivi d'un clivage de type retro Diels-Alder. Nos analyses n'ont pas conduit à des propositions de structures pour les pics **A**, **C** et **D**. Puisque les résultats existant dans la littérature ne concernent pas ces composés des analyses supplémentaires sont nécessaires pour leur identification.

Les résultats obtenus grâce au couplage HPLC-MS-APCI sur la colonne PGC :

- présente l'avantage de pouvoir permettre une détection plus spécifique des composés triterpéniques ;
- confirment les hypothèses dégagées lors de l'utilisation du couplage HPLC-MS-ESI.

**Tableau III.11. Ions caractéristiques des composés triterpéniques de l'extrait de résidus de pommes Gala (analyse par HPLC-MS-APCI sur une colonne PGC)**

Ions	$t_r$ (min)	Mode positif		Mode négatif		Proposition des structures
		$[M+H]^+$ (m/z)	Ions fragment (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Ions fragment (m/z)	
<b>A</b>	0,3	520	517,5 ; 205,5 ; 191,5 ; 153 ; 147 ; 133	519	281 ; 207	
<b>B</b>	2	457	439,5 ; 393,5	455,5	455,5 ; 472	Acide bétulinique*
<b>C</b>	4	475	595,5 ; 472 ; 457,5 ; 439,5 ; 425,5 ; 411,5 ; 343 ; 307	473	474	
<b>D</b>	4,4	475	457 ; 439,5 ; 411,5	473	474	
<b>E</b>	5,7	489 et 471,5	489,5 ; 471,5 ; 453,5 ; 425,5 ; 407,5 ; 205,5 201,5 ;	487,5 et 469,5	488 ; 472 ; 470	Acide 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 13 $\beta$ - trihydroxyurs-11-en- 28-oïc ou Acide 1- hydroxy-3-oxours- 12-en-28-oïc
<b>F</b>	5,9	487,5	487,5 ; 469,5 ; 441,5 ; 423,5 ; 405,5	485,5	486 ; 467,5	Acide annurcoïque ou autre
<b>G</b>	6,7	471	425,5 ; 407,5	469	469,5	Acide 1-hydroxy-3- oxours-12-en-28-oïc ou autre
<b>H</b>	7,3	457	439,5 ; 425,5 ; 411,5 ; 393,5 ; 249,5 ; 203,5 ; 191,5 ; 149,5	455	472 ; 455,5	Acide oléanolique*
<b>I</b>	8,1	473	474 ; 455 ; 437,5 ; 409,5 ; 201,5	471	472 ; 453	Acide pomolique ou autre
<b>J</b>	8,8	457	457,5 ; 439,5 ; 411,5 ; 393,5 ; 249 ; 203,5 ; 191,5	455	472 ; 455,5	Acide ursolique*

\*Standards injectés

### Analyse des fractions collectées par SFC

Le couplage HPLC-MS-APCI en utilisant la colonne PGC a été réalisé pour caractériser les pics collectés en sortie de colonne lors de la séparation par chromatographie en phase supercritique des molécules des extraits de résidus de pommes Gala et Granny Smith obtenus par macération à l'acétate d'éthyle. La décision d'utiliser ce système s'est basée sur le fait que ce couplage est plus approprié pour l'analyse des composés triterpéniques extraits.

Les résultats enregistrés (Tableau III.12 et Tableau III.13) nous ont permis de proposer à nouveau des formules brutes et des structures de molécules. Ces propositions sont similaires à celles retrouvées lors des études présentés antérieurement dans ce manuscrit. Par contre nous n'avons pas détecté d'ions lors de l'analyse des pics **3** et **4** collectés de l'extrait de résidus de pommes Gala ce qui peut être du à la trop faible quantité de composés collectés. En revanche, nous avons remarqué que certains des pics collectés lors de l'analyse en SFC englobent plusieurs molécules. Ainsi les pics **8**, **9** et **10** de l'extrait de Gala contiennent d'autres composés (**a**, **b** ; **c** et **d** respectivement). Une situation similaire a été constatée pour les pics **1** et **2** de l'extrait de pommes Granny Smith qui englobent les composés **a** et respectivement **b**. Vu les masses des ions moléculaires de ces composés nous pouvons supposer qu'ils peuvent faire partie de la famille de triterpènes également.

**Tableau III.12. Propositions de formules brutes et de structures pour les pics collectés en SFC à partir de l'extrait de résidus de pommes Gala**

<i>Pics</i>	<i>t<sub>r</sub></i> (min)	<i>[M-H]<sup>-</sup></i> (m/z)	<i>Formules brutes supposées</i>	<i>Proposition des structures</i>
<b>1</b>	8,73	469,5	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oic ou autre
<b>2</b>	9,17	427,5	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O	
<b>3</b>	9,77			
<b>4</b>	10,46			
<b>5</b>	11,27	485,5	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	Acide annurcoïque ou autre
<b>6</b>	11,70	455	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide oléanolique*
<b>7</b>	12,31	455	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide ursolique*
<b>8a</b>	12,83	486	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	Acide annurcoïque ou autre
<b>8b</b>		472	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ; Acide hydroxyursolique ou autre
<b>8c</b>		455	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Acide bétulinique*
<b>9a</b>	14,65	455	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	
<b>9b</b>		472	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ; Acide hydroxyursolique ou autre
<b>10a</b>	15,31	488	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	Acide euscaphique ; Acide trihydroxyursenoïque ou autre
<b>10b</b>		455	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	
<b>11</b>	16,18	472	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ; Acide hydroxyursolique ou autre

\* Standards injectés

**Tableau III.13. Propositions de formules brutes et de structures pour les pics collectés en SFC à partir de l'extrait de résidus de pommes Granny Smith**

<i>Pics</i>	<i>t<sub>r</sub></i> (min)	<i>[M-H]<sup>-</sup></i> (m/z)	<i>Formules brutes supposées</i>	<i>Proposition des structures</i>
<b>1a</b>	16,58	472	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Acide pomolique ; Acide hydroxyursolique ou autre
<b>1b</b>		488	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	Acide euscaphique ; Acide trihydroxyursenoïque ou autre
<b>2a</b>	16,97	488	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	Acide euscaphique ; Acide trihydroxyursenoïque ou autre
<b>2b</b>		474	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	
<b>3</b>	17,4			
<b>4</b>	17,95			

\* Standards injectés

Les analyses effectuées par couplage HPLC-MS avec différentes sources d'ionisation (ESI et APCI) sur deux types de phases stationnaires (silice greffée C18 et PGC) nous ont permis d'attribuer des masses moléculaires correspondants aux pics majoritaires. Les deux méthodes ont donné les mêmes informations sur les molécules des extraits.

Parmi les molécules identifiées dans les extraits de résidus de pommes on retrouve des composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique, la rutine, la phloridzine, la quercitrine, l'acide 3-digitalose-quinique, l'acide coumaroylquinique, la phloretin-2'-xyloside dont les trois derniers sont mentionnés plus rarement dans la littérature [83-86].

Nos analyses montrent que les extraits de résidus de pommes contiennent également des composés triterpéniques – un groupe de molécules moins étudiées mais reconnus notamment pour leurs effets anti-inflammatoires. Parmi ceux-ci nous pouvons citer l'acide ursolique (composé triterpénique majoritaire), l'acide oléanolique et l'acide bétulinique. Par comparaison avec les données présentées par différents chercheurs [44, 87-88] nous avons pu proposer des structures de molécules telles que l'acide annurcoïque, l'acide 1-hydroxy-3-oxours-12-en-28-oic, l'acide pomolique.

Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les composés nouveaux qu'on a détecté mais qui ne sont pas décrits dans la littérature.

Nos résultats montrent que les extraits de résidus de différentes variétés de pommes sont riches en différents composés phénoliques et triterpéniques se trouvant surtout sous forme de nombreux isomères. Par conséquent, le processus d'attribution des formules brutes et la proposition des structures restent assez difficile. Afin de pouvoir identifier toutes les molécules extraites des travaux de recherches supplémentaires incluant une purification des composés des extraits et des analyses structurales complémentaires par spectroscopie à l'infrarouge (IR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) etc. sont nécessaires.

### III. 2. 4. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de résidus de pommes

Lors de la caractérisation du matériel végétal utilisé au cours de nos recherches, c'est-à-dire les cerises et les résidus de pommes, nous avons mis en évidence la présence de deux grandes familles de molécules bioactives : les composés phénoliques et les composés triterpéniques. Le premier groupe est présent dans les deux matrices végétales et il est bien connu pour ses propriétés antioxydantes tandis que le deuxième groupe a été identifié surtout dans les résidus de pommes et est reconnu notamment pour ses activités anti-inflammatoires.

Conformément à la documentation bibliographique, les études réalisées jusqu'à maintenant sur la détermination du caractère antioxydant des extraits de composés phénoliques de cerises et de résidus de pommes sont nombreuses [12, 89-97]. En revanche, juste un nombre réduit de recherches [40, 98] ont visé l'effet antioxydant de composés triterpéniques et la synergie pouvant résider de la présence des deux familles de principes actifs (composés phénoliques et triterpènes) dans un même extrait.

Par conséquent, nous avons décidé d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de résidus de pommes à l'acétate d'éthyle (EtOAc). Nous avons choisi ces extraits puisque nous avons démontré que l'utilisation de l'acétate d'éthyle (EtOAc) conduit à une extraction plus sélective ce qui fait que les extraits obtenus sont plus riches en composés phénoliques et triterpéniques que ceux obtenus à l'EtOH.

Les extraits de résidus de pommes ont été soumis à 4 tests *in vitro* différents afin d'évaluer leurs possibles activités antioxydantes :

- le test de Folin-Ciocalteu pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux ;
- le traitement des extraits avec une solution de chlorure d'aluminium en vue de la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux ;
- le test du 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) approprié pour évaluer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres ;
- le test FRAP à travers lequel le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) des extraits peut être mis en évidence.

Afin d'associer les activités antioxydantes potentielles aux différents familles de composés présentes dans les extraits, nous avons soumis simultanément à ces tests les molécules standards suivantes ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) :

- sucres : glucose (GLU) ;
- composés phénoliques : acide gallique (AG), acide *p*-coumarique (ApC), catéchine (CAT), phloridzine (PH), quercétine (QUE), rutine (RUT) ;
- composés triterpéniques : acide oléanolique (AO), acide ursolique (AU), uvaol (Uv) ;
- acides gras : acide palmitique (AP).

Nous allons voir par la suite les résultats des tests effectués.



### III. 2. 4. 1. Fractionnement des extraits de résidus de pommes

Nous avons vu précédemment que les extraits de résidus de pommes sont complexes. Afin de faciliter l'interprétation des résultats nous avons fractionné les différents extraits bruts par extraction liquide-liquide pour obtenir des fractions simplifiées et ainsi pouvoir comparer les activités des extraits bruts à celles des fractions.

Les extraits bruts à l'acétate d'éthyle de résidus de quatre variétés de pommes (Gala, Golden, Granny Smith et Pink Lady) obtenus par extraction assistée par microondes (conditions : 3 cycles de 30 s à une puissance de 700 W) ont été évaporé à sec et ensuite soumis au fractionnement par traitements successifs avec des solvants de polarité croissante. La méthode employée est illustrée de façon schématique dans la Figure III.43.

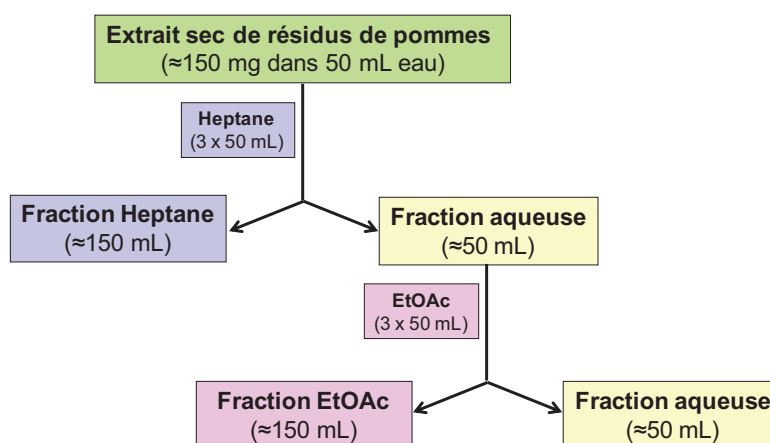


Figure III.43. Représentation schématique du fractionnement des extraits de résidus de pommes par extraction liquide-liquide

Pour cela approximativement 150 mg d'extrait brut EtOAc sec de résidus de chaque variété de pommes ont été repris dans 2 mL d'un mélange eau / heptane (50 : 50). Ces deux solvants ont été choisis puisqu'ils permettent la solubilisation des composés polaires et moyennement polaires voire apolaires dans le même temps. Ces deux solvants couvrent toute la gamme de polarité des solutés. La solution ainsi obtenue a été diluée dans 50 mL d'eau puis extraite successivement avec des volumes d'heptane puis d'acétate d'éthyle.

Les fractions organiques et aqueuses récupérées ont été évaporées à sec.

Des solutions de chaque fraction à une concentration de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  ont été préparées dans MeOH et des aliquotes de  $20 \mu\text{L}$  de ces solutions ont été analysées par HPLC. Les empreintes chromatographiques sont présentées dans l'Annexe 2. Comme nous pouvons remarquer sur les Figures A et B de cette annexe, les composés phénoliques ( $t_r < 30 \text{ min}$ ) et triterpéniques ( $t_r$  de 30 à 40 min) se partagent entre l'heptane et l'EtOAc. Cette dernière fraction contient la quantité la plus importante de composés triterpéniques des extraits de résidus de pommes tandis que dans les fractions aqueuses (Figure C de l'Annexe 2) nous pouvons constater juste la présence des sucres. Pour ces molécules ( $t_r \leq 3 \text{ minutes}$ ) aucun signal n'a été enregistré en UV. En revanche, un fort signal a été acquis par DEDL.

L'analyse des résultats obtenus montrent que le système d'extraction liquide-liquide est approprié pour le fractionnement des extraits de résidus de pommes assurant le partage des solutés selon leur affinité vers l'un ou l'autre des solvants utilisés.

Les extraits bruts EtOAc et les 3 fractions obtenues par fractionnement ont été soumis ensuite aux tests antioxydants.

### III. 2. 4. 2. Evaluation des activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions a été réalisée à travers quatre tests différents qui ont permis la détermination :

- de la teneur en composés phénoliques totaux - Test de Folin-Ciocalteu ;
- de la teneur en flavonoïdes totaux – Test avec chlorure d'aluminium ;
- de l'activité anti radicalaire – Test DPPH<sup>•</sup> ;
- du pouvoir réducteur antioxydant – Test FRAP.

Dans ce but, des solutions de composés standards (1 mg.L<sup>-1</sup>), d'extraits bruts et des fractions heptane, EtOAc et aqueuse préparées dans du MeOH (5 mg.mL<sup>-1</sup>) ont été déposées dans des plaques stériles à 96 puits (NUNC microplate, Fisher Bioblock).

Nous avons vu lors de la description des tests chimiques utilisables pour la détermination des activités antioxydantes que le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur. Ce changement a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques. Les échantillons ont été analysés au moins quatre fois à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques type  $\mu$ Quant Universal Microplate Spectrophotometre de Bio tek Kronton Instruments (Montigny le Bretonneux, France) piloté par le logiciel KC4.

Les résultats ont été exprimés soit en ppm d'équivalents d'un composé standard spécifique (cas de la détermination de la teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes totaux et du pouvoir réducteur des échantillons) soit en pourcentage d'inhibition (test du DPPH<sup>•</sup>).

Dans le premier cas, les absorbances des solutions standard à différentes concentrations ont été déterminées.

La représentation graphique des absorbances en fonction des concentrations des solutions analysées a conduit à l'obtention d'une droite d'étalonnage avec une équation de type «  $y = ax + b$  » spécifique.

Les absorbances des échantillons à analyser (solutions standards, extraits bruts de résidus de pommes et leurs fractions) ont été lues ensuite au spectrophotomètre. Elles ont été introduites dans l'équation de la droite d'étalonnage ce qui nous a permis de déterminer les concentrations afférentes.

Afin d'avoir des résultats fiables, les absorbances de chaque échantillon ont été déterminées au moins quatre fois. Pour cela, les échantillons ont été divisés sur trois microplaques :

- microplaque 1 – solutions de sucres, composés phénoliques, composés triterpéniques, acides gras ;
- microplaque 2 – extraits bruts de résidus de pommes Gala et Golden et leurs fractions ;
- microplaque 3 – extraits bruts de résidus de pommes Granny Smith et Pink Lady et leurs fractions.

Sur chaque microplaque nous avons déposé également les solutions d'acide gallique de la gamme étalon. Par conséquent, trois droites d'étalonnage ont été obtenues pour chaque test indiqué.

Dans le cas de l'étude de l'activité anti radicalaire les échantillons ont été également divisés sur trois microplaques différentes. Les résultats de ce test ont été exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>. Ainsi, la différence entre l'absorbance du radical et celles des échantillons à analyser a été rapportée à l'absorbance du radical et les résultats ont été multipliés par cent.

### III. 2. 4. 2. 1. Composés phénoliques totaux (Test Folin – Ciocâlțeu)

#### Conditions opératoires

Le test avec le réactif Folin – Ciocâlțeu (FC) constitue une des méthodes les plus répandues pour la quantification de composés phénoliques. Il implique l'oxydation en solution alcaline de phénols par le réactif FC de couleur jaune et la détermination colorimétrique de l'intensité du molybdotungstophosphate bleu formé. Ces pigments bleus ont un maximum d'absorption dépendant du pH de la solution (usuellement contrôlé à l'aide de carbonate de sodium) et de la composition qualitative et / ou quantitative de composés phénoliques [99].

Une méthode miniaturisée a été développée d'après celle proposée par Singleton [101]. Ainsi, pour un volume final de 200  $\mu\text{L}$  dans chaque puits nous avons mélangé :

- 10  $\mu\text{L}$  de solutions standards ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), d'extrait ou de fraction ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ou d'eau ultra pure (blanc) ;
- 10  $\mu\text{L}$  de réactif Folin-Ciocâlțeu ;
- 30  $\mu\text{L}$  de solution aqueuse de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%) – après une période de 1 à 8 minutes ;
- 150  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure.

Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 2 h et l'absorbance a été lue à 760 nm.

Les résultats ont été exprimés en ppm d'équivalents d'acide gallique (EAG) à partir des droites d'étalonnage d'acide gallique (5 à 1000 ppm) (Annexe 3).

#### Analyse d'un mélange de composés standards

En regardant la Figure III.44 qui illustre les résultats enregistrés lors de l'étude de composés standards nous pouvons remarquer que presque tous les composés utilisés donnent des réponses assez importantes.

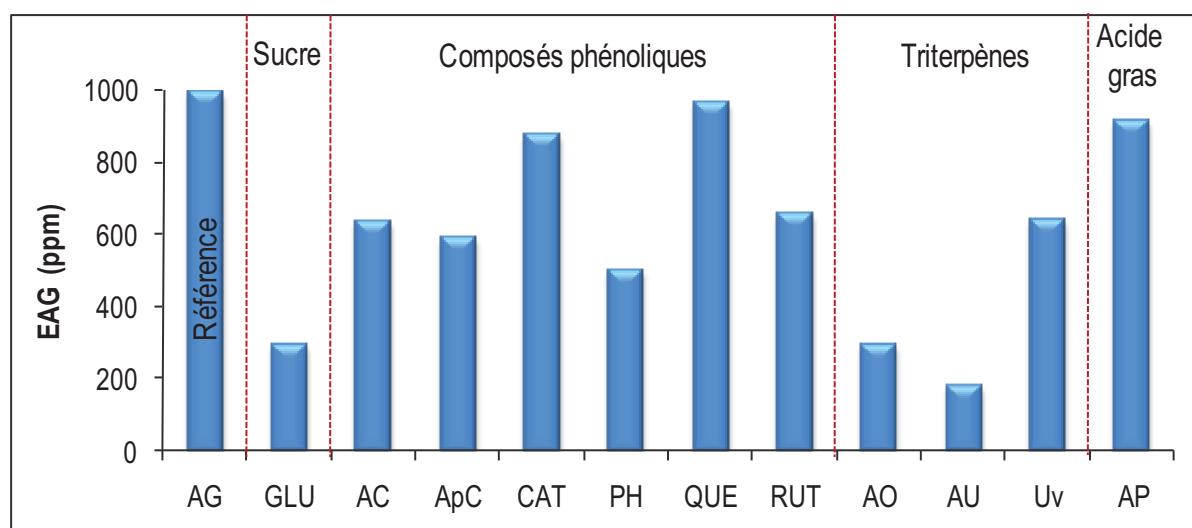


Figure III.44. Test Folin-Ciocalteu standards (équivalents acide gallique)

AG : acide gallique ; GLU : glucose ; AC : acide chlorogénique ; ApC : acide *p*-coumarique ; CAT : catéchine ; PH : phloridzine ; QUE : quercétine ; RUT : rutine ; AO : acide oléanolique ; AU : acide ursolique ; Uv : uvaol ; AP : acide palmitique

La réponse de la quercétine (965 ppm EAG), par exemple, est similaire à celle d'une solution d'acide gallique d'une concentration de 1000 ppm tandis que la phloridzine répond comme une solution d'acide gallique d'une concentration de 500 ppm. Les autres composés phénoliques ont donné de bonnes réponses également (catéchine : 873 ppm EAG, rutine : 654 ppm EAG, acide chlorogénique : 634 ppm EAG, acide *p*-coumarique : 590 ppm EAG).

Par rapport aux composés phénoliques l'analyse des triterpènes a conduit à des réponses plus faibles. Ainsi, les deux acides étudiés (l'acide oléanolique et l'acide ursolique) ont donné des réponses correspondant à 290 ppm EAG et 175 ppm EAG respectivement. Une réponse plus importante a été remarquée pour l'uvaol qui a donné une réponse similaire à celle de l'acide chlorogénique (635 ppm EAG) similaires.

Le glucose a conduit à 289,5 ppm EAG alors que le représentant des acides gras (l'acide palmitique) a donné une réponse de plus de 900 ppm EAG.

Les résultats obtenus nous amène à conclure que ce type de test n'est pas spécifique aux composés phénoliques et que la réaction de réduction avec le réactif Folin – Ciocâlțeu peut se dérouler sur d'autres types de molécules également. La même conclusion a été révélée aussi par d'autres études. Ainsi, Prior *et al.* [101] ont remarqué que certains composés dont notamment les sucres, les amines aromatiques, les enediols et les réductones peuvent interférer lors de ce test. Shahidi *et al.* [102] stipulent que ce test est capable de détecter tous les groupes phénols y compris ceux des protéines.

### Analyse des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions

Nos essais réalisés sur les extraits bruts EtOAc de résidus de pommes et les fractions obtenues par extraction liquide-liquide mettent en évidence une réponse positive pour tous au test de Folin-Ciocâlțeu et la Figure III.45 reporte les différentes valeurs de teneurs en composés phénoliques totaux calculées et exprimées en équivalent d'acide gallique.

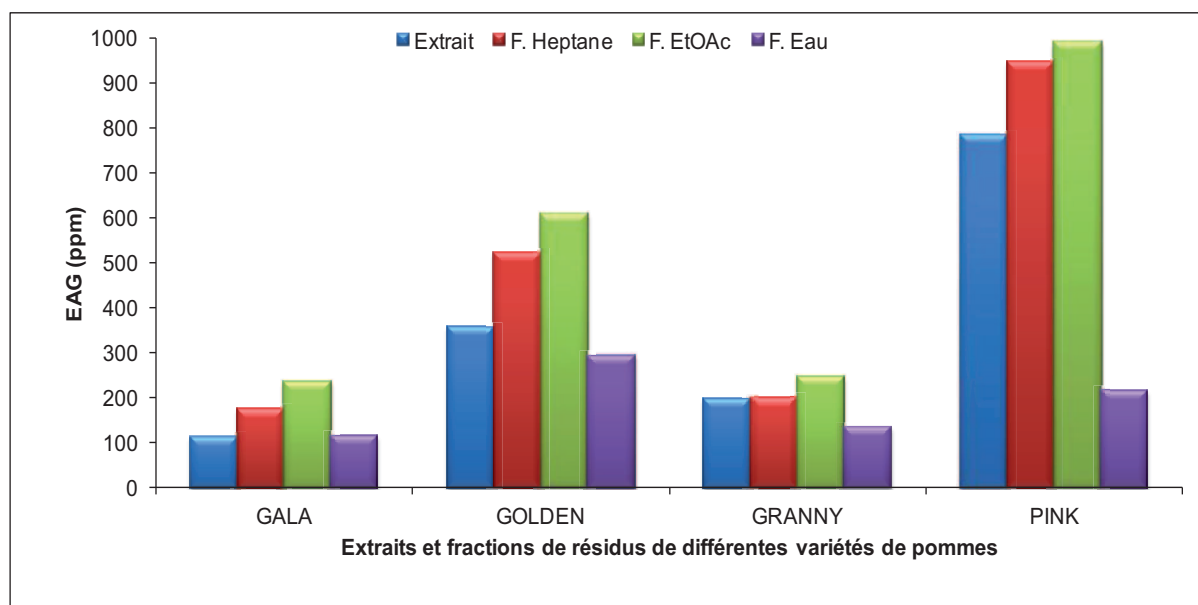


Figure III.45. Teneur en composés phénoliques totaux des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions d'après le test de Folin-Ciocâlțeu

Les fractions Heptane (en rouge) et EtOAc (en vert) pour toutes les variétés de pommes semblent être les plus riches alors que les fractions aqueuses présentent une teneur plus faible en composés phénoliques ce qui est en concordance avec les profils HPLC des fractions qui montrent aussi que les deux premières fractions contiennent les quantités les plus importantes de composés phénoliques et triterpéniques. Les fractions aqueuses contiennent essentiellement des sucres mais au vue de l'analyse du standard de glucose il n'est pas étonnant d'observer également une réponse au test de Folin-Ciocâlțeu pour ces fractions. L'extrait de pommes Pink Lady et ses fractions sont les plus riches en composés phénoliques totaux. Ils sont suivis en ordre décroissant par les variétés Golden, Granny Smith et Gala.

### III. 2. 4. 2. 2. Contenu en flavonoïdes totaux

#### Conditions opératoires

100  $\mu$ L d'extrait brut, de fraction ou de solution de rutine (standard) ont été mélangés avec 100  $\mu$ L de solution de chlorure d'aluminium (2%) [103]. L'absorbance des échantillons a été déterminée à 435 nm. Des droites d'étalonnage (Annexe 4) ont été réalisées à partir de solutions de rutine de concentration comprise entre 5 et 150 ppm et les résultats ont été exprimés en ppm d'équivalents de rutine (ER).

#### Analyse d'un mélange de composés standards

Les résultats obtenus lors de l'analyse des solutions de composés standards (Figure III.46) montre que seule la quercétine et dans une moindre mesure l'uvaol répondent à ce test.

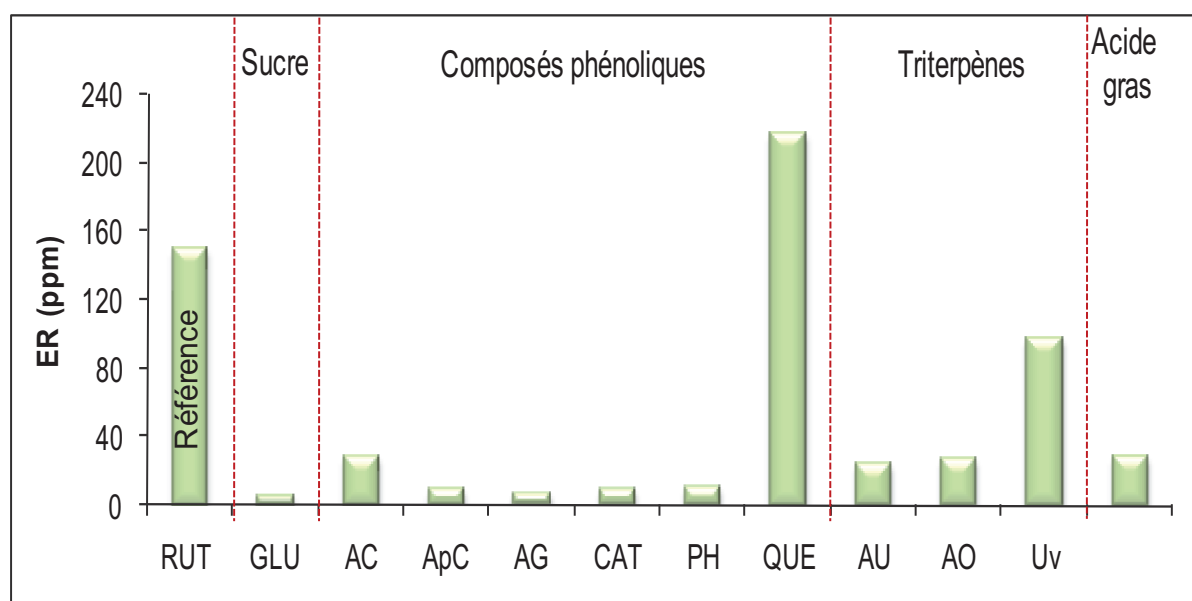


Figure III.46. Test des flavonoïdes totaux standards (équivalents de rutine)

RUT : rutine ; GLU : glucose ; AC : acide chlorogénique ; ApC : acide p-coumarique ; AG : acide gallique ; CAT : catéchine ; PH : phloridzine ; RUT : rutine ; AO : acide oléanolique ; AU : acide ursolique ; Uv : uvaol ; AP : acide palmitique

La réponse de la quercétine ainsi que l'absence de réponse des autres molécules étaient attendues puisque parmi les standards choisis seule la quercétine est un flavonoïde. Ceci peut être expliqué par la présence de trois sites différents de complexation de l'aluminium: 3-hydroxy-4-keto, 5-hydroxy-4-keto, 3'4'-*o*-diphénolique que nous avons présentés au cours du deuxième chapitre de ce manuscrit. La réponse de l'uvaol est en revanche plus surprenante puisqu'il s'agit d'un triterpène qui ne devrait pas présenter la propriété de complexer l'aluminium. Toutefois la répétition de l'expérience nous a donné les mêmes résultats.

#### Analyse des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions

Le contenu en flavonoïdes totaux (Figure III.47) des extraits bruts étudiés varie entre 28,46 ppm ER pour les extraits de résidus de pommes Gala et 93 ppm ER pour ceux de Golden.

En ce qui concerne les fractions des extraits bruts celles récupérées dans l'EtOAc et dans l'heptane sont les plus riches en flavonoïdes ce qui concorde avec l'analyse

chromatographique qui indique la présence des composés phénoliques et triterpéniques dans ces mêmes fractions.

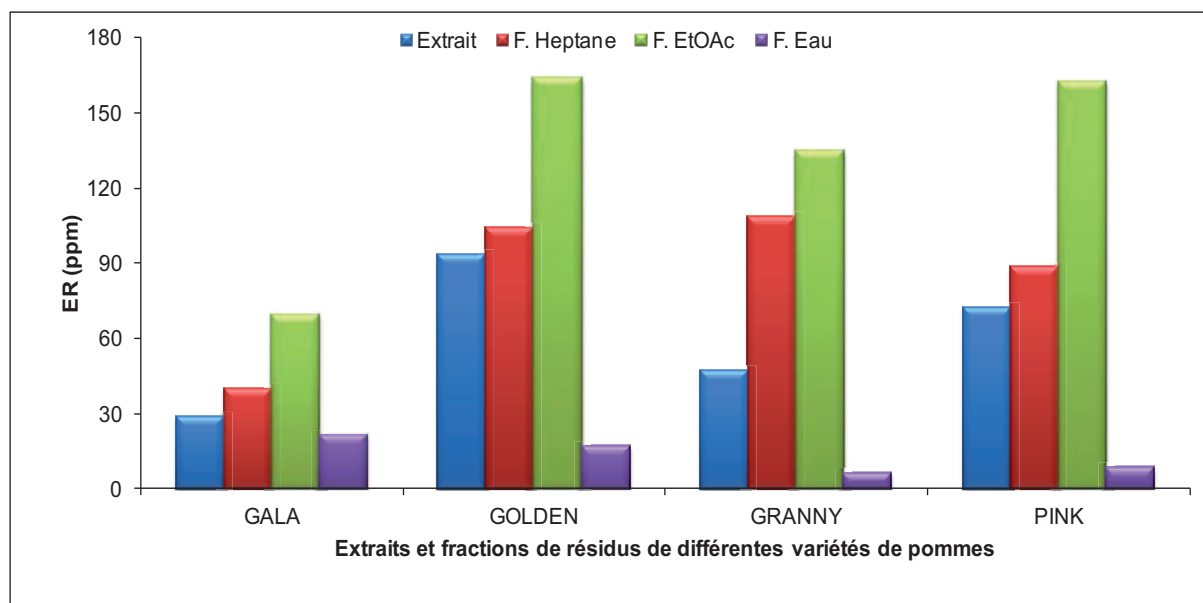


Figure III.47. Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions

### III. 2. 4. 2. 3. Activité anti radicalaire (Test DPPH·)

#### Conditions opératoires

Le radical libre DPPH· absorbe à 515 nm. Par réduction en présence d'une molécule présentant une activité de réducteur l'absorbance disparaît. Plus le pouvoir anti radicalaire est important plus l'antioxydant est considéré comme efficace.

Cette activité anti radicalaire a été déterminée en utilisant la méthode décrite par Blois [104]. Ainsi, un aliquote de 10 µL de solutions de composés standards, d'extrait brut ou de chaque fraction a été mélangé avec 190 µL de solution de DPPH de concentration 75 µM dans MeOH. La décoloration de la solution du radical libre DPPH· a été mesurée à 517 nm après 30 minutes d'incubation dans un endroit sombre à température ambiante.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition selon la relation suivante :

$$I\% = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}^\cdot \text{ à } t=30\text{min}} - \text{Abs}_{\text{E} \text{ à } t=30\text{min}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}^\cdot \text{ à } t=30\text{min}}} \quad (\text{III.1}) \quad \text{où :}$$

$\text{Abs}_{\text{DPPH}^\cdot \text{ à } t=30\text{min}}$  – absorbance du DPPH· après 30 minutes d'incubation

$\text{Abs}_{\text{E} \text{ à } t=30\text{min}}$  – absorbance des échantillons après 30 minutes d'incubation

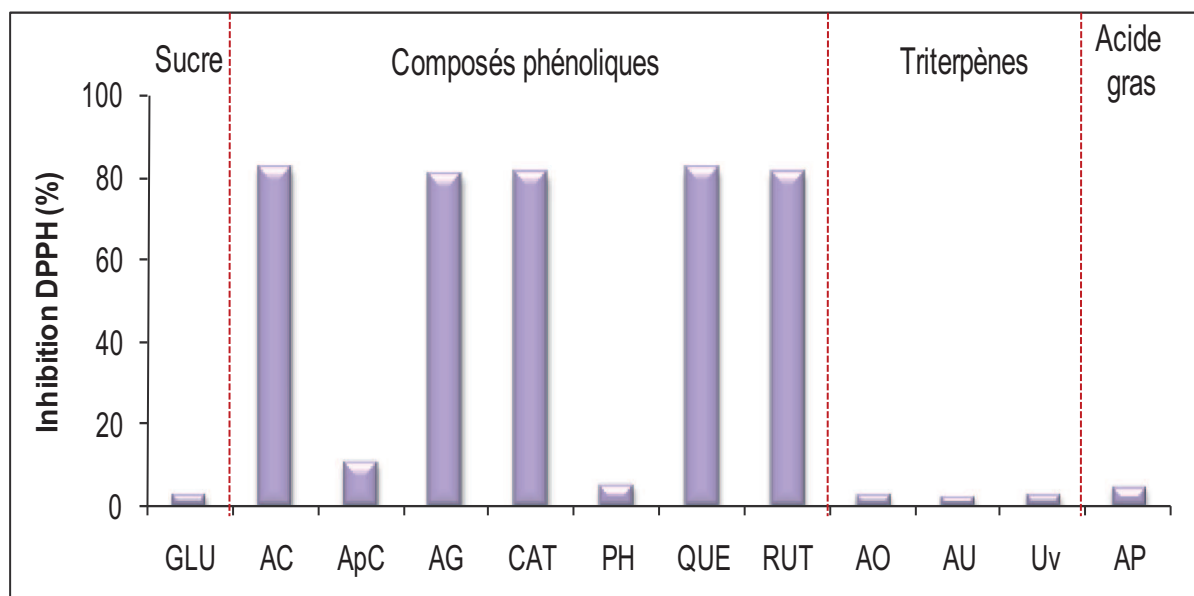
#### Analyse d'un mélange de composés standards

Les composés phénoliques sont des inhibiteurs reconnus des radicaux libres. L'activité de ces molécules est liée à leur structure. Ainsi elle dépend de l'énergie de dissociation des liaisons O – H, de la délocalisation électronique du radical phénol et de l'encombrement stérique des groupements substituant des atomes d'hydrogène du noyau aromatique [105].

En regardant les résultats reportés dans la Figure III.48, nous pouvons remarquer que seuls les composés phénoliques ont eu la capacité d'inhiber le radical DPPH·.

Ainsi, pour l'acide coumarique, l'acide gallique, la catéchine, la quercétine et la rutine le pourcentage d'inhibition du DPPH· a été autour de 80%. Par contre l'activité anti radicalaire des composés triterpéniques est très faible. Nous avons vu antérieurement que plus

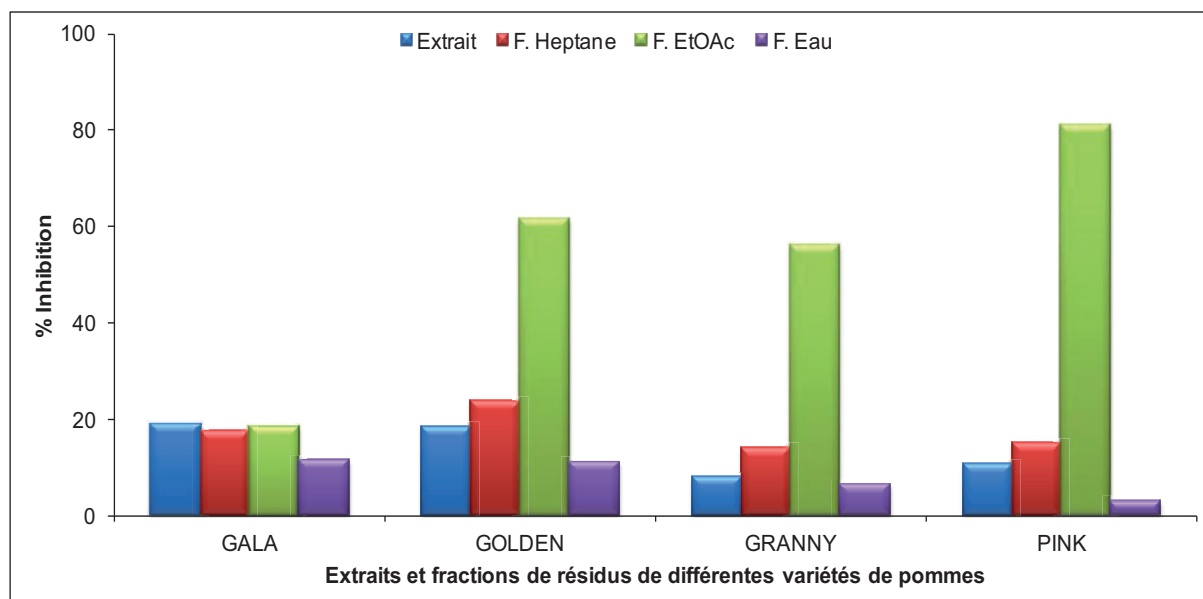
la présence des hydroxyles est importante plus les composés qui contiennent ce type de groupements fonctionnels vont pouvoir inhiber le DPPH. Ce fait peut expliquer la différence entre l'activité antioxydante des deux classes majoritaires de molécules standards étudiées puisque les composés triterpéniques possèdent un nombre réduit de groupements hydroxyle.



**Figure III.48.** Activité antioxydante des standards exprimée en % d'inhibition du radical libre DPPH :  
 GLU : glucose ; AC : acide chlorogénique ; ApC : acide p-coumarique ; AG : acide gallique ;  
 CAT : catéchine ; PH : phloridzine ; QUE : quercétine ; RUT : rutine ; AO : acide oléanolique ;  
 AU : acide ursolique ; Uv : uvaol ; AP : acide palmitique

### Analyse des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions

En regardant les résultats illustrés dans la Figure III.49 nous pouvons remarquer que les extraits bruts EtOAc de résidus de pommes des variétés Gala et Golden sont ceux qui inhibent le plus le radical libre DPPH. En ce qui concerne l'activité de leurs fractions l'ordre décroissant suivant peut être constaté : F. AcOEt > F. Heptane > F. Eau.



**Figure III.49.** Activité antioxydante des extraits de résidus de pommes et leurs fractions

Ces résultats concordent avec l'analyse HPLC des fractions qui a révélé le fait que les composés phénoliques de résidus de pommes sont récupérés en AcOEt et que les composés triterpéniques se partagent entre l'heptane et l'AcOEt alors que dans l'eau nous avons séparé globalement les sucres qui conformément à l'analyse des molécules standards ne présentent pas une activité inhibitrice pour le DPPH:

#### III. 2. 4. 2. 4. Pouvoir réducteur (Test FRAP)

##### Conditions opératoires

Le test FRAP est souvent utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur de solution associé à la présence de polyphénols. Cette méthode dépend de la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique en tripyridyltriazine ferreux par un antioxydant à un pH de 3,6.

Le test FRAP a été conduit conformément à la méthode proposée par Benzie et Strain [106] avec certaines modifications. Le réactif FRAP a été préparé chaque jour à partir de tampon acétate 300 mM (pH 3,6), de chlorure ferrique hexahydraté 20 mM et de TPTZ 10 mM dans HCl 40 mM. Ces solutions ont été mélangées en proportion respective : 10/1/1 (v / v / v) et le mélange a été chauffé à une température de 37°C. 10 µL d'extrait, de fraction ou de standard ont été mélangés avec 20 µL d'eau ultra pure et ensuite avec 170 µL de réactif FRAP. Le changement de couleur du bleu au rouge a été suivi à 593 nm après 10 minutes d'incubation.

Les résultats ont été exprimés en ppm d'équivalents trolox (ET) à partir des droites d'étalonnage réalisées avec des solutions de trolox ayant des concentrations de 50 à 1000 ppm et qui sont présentées dans l'Annexe 5.

##### Analyse d'un mélange de composés standards

En regardant la Figure III.50 qui présente l'étude réalisée pour déterminer le pouvoir réducteur des composés standards nous pouvons constater que seules les composés phénoliques dont notamment l'acide chlorogénique, l'acide gallique, la catéchine, la quercétine et la rutine sont capables de réagir avec le tripyridyltriazine ferrique.

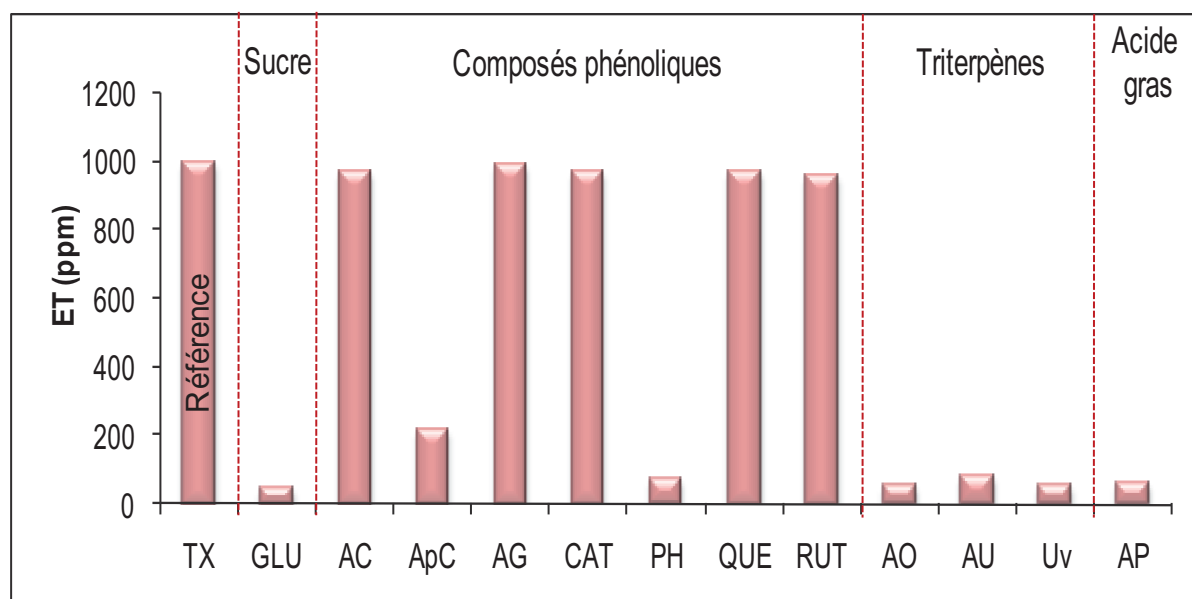


Figure III.50. Pouvoir réducteur des standards (équivalents trolox)

*TX : trolox ; GLU : glucose ; AC : acide chlorogénique ; ApC : acide p-coumarique ; AG : acide gallique ; CAT : catéchine ; PH : phloridzine ; QUE : quercétine ; RUT : rutine ; AO : acide oléanolique ; AU : acide ursolique ; Uv : uvaol ; AP : acide palmitique*



### Analyse des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions

Nos résultats montrent que le pouvoir réducteur des extraits de résidus de pommes et de fractions (Figure III.51) est variable.

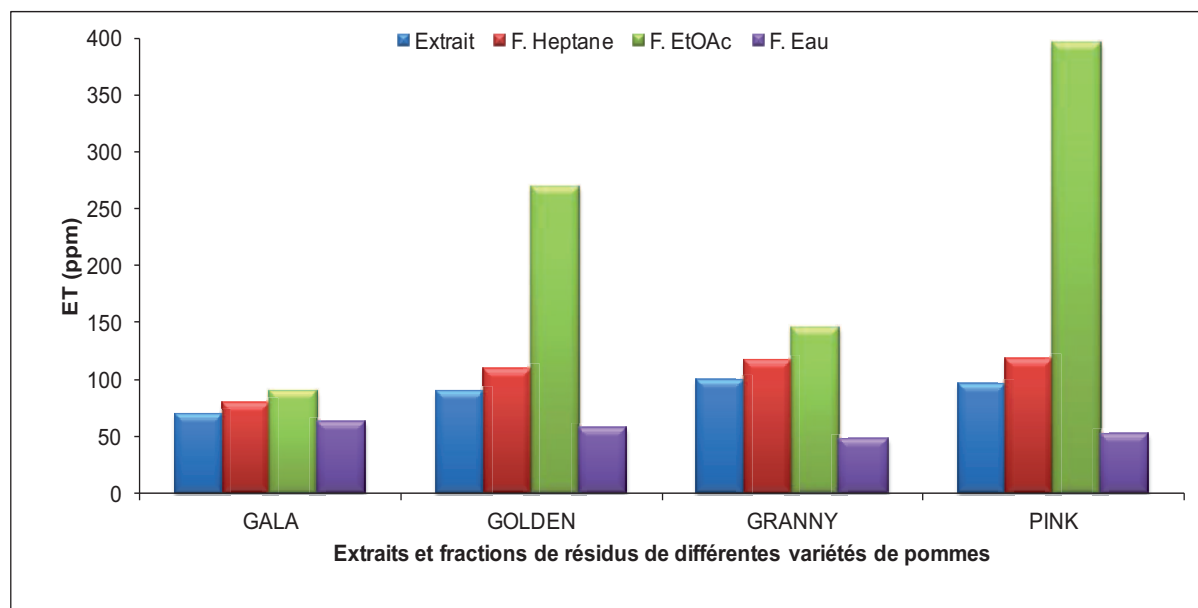


Figure III.51. Inhibition du TPTZ par les extraits de résidus de pommes et leurs fractions

Les valeurs les plus importantes ont été enregistrées pour les fractions EtOAc selon la séquence suivante : Pink Lady > Golden > Granny Smith > Gala. Elles sont suivies par les fractions Heptane. Par contre les fractions aqueuses ne présentent pas un grand pouvoir réducteur ce qui peut être expliqué par le fait qu'elles ne contiennent pas de composés phénoliques étant surtout riches en sucres qui conformément aux résultats obtenus pour les solutions des composés standards ne réagissent pas avec le test FRAP.

Grace aux tests chimiques réalisés, nous avons pu établir la relation entre l'activité antioxydante des extraits bruts de résidus de pommes et de leurs fractions et la présence des molécules appartenant aux familles des composés phénoliques et triterpéniques.

Néanmoins, sachant que la présence de plusieurs molécules ayant la même activité peut soit induire un effet antioxydant synergique soit être responsable d'une certaine inhibition, afin de pouvoir attribuer cette activité à une ou autre de ces molécules, un fractionnement plus poussé des extraits et des études plus approfondies sont nécessaires.

De plus, il serait utile de déterminer la concentration minimale des extraits bruts et de leurs fractions pouvant présenter des activités antioxydantes.

## CONCLUSIONS

Dans ce chapitre nous avons présenté les différents résultats de notre étude concernant la possibilité d'utiliser les agro ressources (cerises ou résidus de pommes) en tant que sources de composés bioactifs.

Ainsi dans la première partie du chapitre, nous nous sommes plus particulièrement attachés à mettre au point une méthode d'extraction sans solvant des anthocyanines de cerises.

Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'extraction rapide et éco responsable basée sur l'effet de l'irradiation électromagnétique sur l'eau constitutive des fruits, eau qui a ainsi servi de solvant d'extraction pour tous les composés d'intérêt.

Au cours de nos recherches nous avons mis en évidence que la technique de conservation la plus appropriée pour les extraits de cerises était la lyophilisation capable d'assurer une bonne stabilité des solutés pendant une longue période de temps.

Afin de purifier les anthocyanines nous avons testé deux méthodes différentes de fractionnement : la chromatographie de partage centrifuge d'une part et la chromatographie liquide semi-préparative d'autre part. Cette deuxième technique est apparue comme plus performante et plus intéressante car elle a pu être développée en respectant les principes les plus importants de la chimie verte, à savoir : utilisation de solvants biodégradables (eau, éthanol), additifs moins toxiques (acide formique) et recyclage de la phase mobile. Elle nous a permis de récupérer deux fractions purifiées contenant chacune un des anthocyanines recherchés (la cyanidine-3-*O*-glucoside et la cyanidine-3-*O*-rutoside) dont la structure a pu être confirmée par spectrométrie de masse.

La deuxième partie du chapitre a été consacrée à l'étude de résidus issus de la production de jus clair à partir de quatre variétés de pommes : Royal Gala, Golden, Granny Smith et Pink Lady. Ces résidus contiennent des composés bioactifs (composés phénoliques et triterpéniques principalement) reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et qui pourrait être valorisés comme ingrédients dans des applications cosmétiques, thérapeutiques et agroalimentaires. Sensibles à une dégradation rapide, ces résidus de pommes doivent être tout d'abord conservés. Pour cela nous avons testé la lyophilisation et la zéodratation. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la zéodratation peut constituer une bonne alternative plus économique et plus verte à la lyophilisation puisqu'elle ne nécessite pas d'étape préliminaire de congélation et qu'elle est plus rapide.

Quatre techniques d'extraction différentes : la macération, l'extraction par solvant pressurisé, l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par microondes ont été comparées et différents solvants ont été utilisés pour extraire les composés d'intérêt à partir de résidus de pommes lyophilisés. Nos études montrent que 3 cycles de 30 s d'extraction sous microondes à une puissance de 700 W peuvent assurer une bonne extraction dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle des composés présents dans les résidus de pommes.

Les analyses effectuées sur les extraits obtenus de résidus de différentes variétés de pommes par HPTLC, HPLC couplé à différents types de détection (UV, DEDL, MS) ou SFC nous ont permis d'identifier la présence de deux familles majoritaires de composés : celle des composés phénoliques qui est très étudiée du fait de son fort potentiel antioxydant et celle des composés triterpéniques qui a été beaucoup moins étudiée mais qui est reconnue pour son important pouvoir anti inflammatoire.

Comme précédemment, nous avons fractionné les extraits obtenus afin de séparer les différentes familles de composés et d'étudier leurs activités respectives. L'objectif étant de

séparer les différentes familles moléculaires, notre choix s'est porté sur l'extraction liquide-liquide par des étapes successives.

Les différentes fractions récupérées dans l'heptane, l'acétate d'éthyle et l'eau ainsi que les extraits bruts ont été soumis à différents tests antioxydants afin de déterminer leur teneur en composés phénoliques totaux, leur teneur en flavonoïdes totaux, leur activité anti radicalaire et leur pouvoir réducteur. Ces tests nous ont permis de conclure que les fractions acétate d'éthyle sont les plus riches en composés d'intérêt suivies des fractions heptane tandis que les fractions aqueuses ne présentent pas d'activité notable. Les fractions EtOAc étant constituées des composés phénoliques et des composés terpéniques qui n'ont pas été extraits par l'heptane, il serait intéressant de développer une autre méthode de fractionnement permettant de mieux séparer ces deux familles moléculaires.

Au vu des résultats obtenus au cours de nos travaux, nous pouvons conclure que les fruits entiers et leurs résidus après valorisation en tant que jus de fruits, peuvent constituer des sources riches en composés bioactifs. Différentes méthodes pour extraire et isoler ces composés d'intérêt ont été explorées mais il reste à évaluer plus précisément la quantité de molécules récupérables par kg de fruits ou de résidus de fruits. Une valorisation ultérieure de ces composés en les incorporant dans diverses formulations agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques peut être envisagée mais reste à développer.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Routray, W., Orsat, V. *Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review*. Food and Bioprocess Technology. **2011**, 1-16.
2. Sparr Eskilsson, C., Björklund, E. *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A. **2000**, 902 (1), 227-250.
3. Chandra, A., Rana, J., Li, Y. *Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2001**, 49 (8), 3515-3521.
4. Yang, Z., Zhai, W. *Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.)*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2010**, 11 (1), 169-176.
5. Bridgers, E.N., Chinn, M.S., Truong, V.-D. *Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars*. Industrial Crops and Products. **2010**, 32 (3), 613-620.
6. Srivastava, J., Vankar, P.S. *Canna indica flower: New source of anthocyanins*. Plant Physiology and Biochemistry. **2010**, 48 (12), 1015-1019.
7. Kim, D.-O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., Lee, C.Y. *Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53 (26), 9921-9927.
8. Lapornik, B., Prosek, M., Golc Wondra, A. *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time*. Journal of Food Engineering. **2005**, 71 (2), 214-222.
9. Cacace, J.E., Mazza, G. *Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2002**, 50 (21), 5939-5946.
10. Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R. *Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry. **2003**, 64 (5), 923-933.
11. Nayak, C.A., Srinivas, P., Rastogi, N.K. *Characterisation of anthocyanins from *Garcinia indica* Choisy*. Food Chemistry. **2010**, 118 (3), 719-724.
12. Kirakosyan, A., Seymour, E.M., Llanes, D.E.U., Kaufman, P.B., Bolling, S.F. *Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products*. Food Chemistry. **2009**, 115 (1), 20-25.
13. Bridle, P., Timberlake, C.F. *Anthocyanins as natural food colours-selected aspects*. Food Chemistry. 58 (1-2), 103-109.
14. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry. **1999**, 66 (4), 401-436.
15. Wang, H., Nair, M.G., Iezzoni, A.F., Strasburg, G.M., Booren, A.M., Gray, J.I. *Quantification and characterization of anthocyanins in balaton tart cherries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1997**, 45 (7), 2556-2560.
16. Bonerz, D., Würth, K., Dietrich, H., Will, F. *Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars*. European Food Research and Technology. **2007**, 224 (3), 355-364.
17. Mozetic, B., Simcic, M., Trebse, P. *Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatment*. Food Chemistry. **2006**, 97 (2), 302-309.
18. Mozetic, B., Trebse, P., Hribar, J. *Anthocyanins and hydroxycinnamic acids in sweet cherries*. Food Technology and Biotechnology. **2002**, 40 (3), 207-212.

19. Usenik, V., Fabčić, J., Stampar, F. *Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.)*. Food Chemistry. **2008**, 107 (1), 185-192.
20. Sandra, P., Sandra, K., Pereira, A., Vanhoenacker, G., David, F. *Green Chromatography: Part 1: Introduction and Liquid Chromatography*. LC-GC Europe. **2010**, 23 (5), 242-259.
21. Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N. *Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants- A review*. World Journal of Zoology. **2008**, 3 (2), 40-46.
22. Balat, M., Balat, H., Öz, C. *Progress in bioethanol processing*. Progress in Energy and Combustion Science. **2008**, 34 (5), 551-573.
23. Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. *Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations*. Bioresource Technology. **2003**, 87 (2), 167-198.
24. Walter, R.H., Sherman, R.M. *Grape and apple pomace charcoal*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **1975**, 23 (6), 1218-1218.
25. Schieber, A., Keller, P., Carle, R. *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. **2001**, 910 (2), 265-273.
26. Cetkovic, G., Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Savatovic, S., Mandic, A., Tumbas, V. *Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace*. Food Chemistry. **2008**, 109 (2), 340-347.
27. Suárez, B., Álvarez, Á.L., García, Y.D., Barrio, G.d., Lobo, A.P., Parra, F. *Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace*. Food Chemistry. **2010**, 120 (1), 339-342.
28. Alonso-Salces, R.M., Barranco, A., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. *A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues: Comparison with pressurised liquid extraction*. Talanta. **2005**, 65 (3), 654-662.
29. Diñeiro García, Y., Valles, B.S., Picinelli Lobo, A. *Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace*. Food Chemistry. **2009**, 117 (4), 731-738.
30. Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. *Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. **2004**, 18 (5), 553-563.
31. Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.-C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H.E., Mirata, M.A., Schrader, J., Ulber, R. *Biotransformation of triterpenes*. Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands). **2011**, 46 (1), 1-15.
32. Varian, *HPLC Columns. Pursuit XRs. Extra resolution. Maximum lifetime. Ultimate performance*. 2006.
33. Bowen-Forbes, C.S., Mulabagal, V., Liu, Y., Nair, M.G. *Ursolic acid analogues: non-phenolic functional food components in Jamaican raspberry fruits*. Food Chemistry. **2009**, 116 (3), 633-637.
34. Ho, J.-C., Chen, C.-M., Row, L.-C. *Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of Tetrapanax papyriferus*. Phytochemistry. **2007**, 68 (5), 631-635.
35. Fang, X., Wang, J., Yu, X., Zhang, G., Zhao, J. *Optimization of microwave-assisted extraction followed par RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of Chaenomeles sinensis*. Journal of Separation Science. **2010**, 33 (8), 1147-1155.

36. Chen, Y., Xie, M.-Y., Gong, X.-F. *Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from Ganoderma atrum*. Journal of Food Engineering. **2007**, 81 (1), 162-170.
37. Xia, E.-Q., Wang, B.-W., Xu, X.-R., Zhu, L., Song, Y., Li, H.-B. *Microwave-Assisted Extraction of Oleanolic Acid and Ursolic Acid from Ligustrum lucidum Ait*. International Journal of Molecular Sciences. **2011**, 12 (8), 5319-5329.
38. Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. *Solvent free microwave extraction of Elletaria cardamomum L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil*. Journal of Food Engineering. **2007**, 79 (3), 1079-1086.
39. Frighetto, R.T.S., Welendorf, R.M., Nigro, E.N., Frighetto, N., Siani, A.C. *Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography*. Food Chemistry. **2008**, 106 (2), 767-771.
40. Cefarelli, G., D'Ambrosia, B., Fiorentino, A., Izzo, A., Mastellone, C., Pacifico, S., Piscopo, V. *Free-Radical-Scavenging and Antioxidant Activities of Secondary Metabolites from Reddened Cv. Annurca Apple Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54 (3), 803-809.
41. Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.-U., Rentschler, C., Carle, R. *A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2003**, 4 (1), 99-107.
42. Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B. *Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. **2009**, 1216 (38), 6662-6670.
43. Ma, C.-M., Cai, S.-Q., Cui, J.-R., Wang, R.-Q., Tu, P.-F., Hattori, M., Daneshtalab, M. *The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry. **2005**, 40 (6), 582-589.
44. D'Ambrosia, B., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Pacifico, S. *Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple*. Food Chemistry. **2006**, 98 (2), 285-290.
45. Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., Scheffler, A. *Pentacyclic triterpene distribution in various plants - Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts*. Molecules. **2009**, 14 (6), 2016-2031.
46. Kromasil, *Kromasil - for your analytical HPLC*.
47. Thermo Electron. *Hypersil classical phases and Hypersil ODS Columns*.
48. Waters, *Atlantis T3, DC18 and HILIC silica columns*. 2007.
49. Interchim, *HPLC - les technologies Interchim*. p. 24-55.
50. Supelco, *Improve resolving power and peak symmetry for active analytes by using an HPLC phase with unique selectivity*, in *Supelco Bulletin*, Sigma Aldrich, I., Editor. 1997. p. 1-4.
51. Thermo Electron, *HyPURITY Advanced Columns. Technical guide*. 2004. p. 1-16.
52. Agilent, *Agilent Eclipse XDB-C8*. 2003.
53. Waters, *Symmetry family of HPLC Columns*. 2002. p. 1-14.
54. Agilent, *Agilent PLRP-S media for HPLC analysis of peptides*. 2011. p. 1-5.
55. Przybyciel, M. *Novel phases for HPLC separations*. LC/GC LC Column Technology Supplement **2006**, 49-52.
56. Claude, B., Morin, P., Lafosse, M., Andre, P. *Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized [beta]- and [gamma]-cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. **2004**, 1049 (1-2), 37-42.

57. Guo, S., Duan, J.-A., Tang, Y.-P., Yang, N.-Y., Qian, D.-W., Su, S.-L., Shang, E.-X. *Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of Ziziphus Species by HPLC-ELSD-MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2010**, 58 (10), 6285-6289.
58. Lee, M.K., Ahn, Y.M., Lee, K.R., Jung, J.H., Jung, O.-S., Hong, J. *Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of Prunellae Spica: Determination of triterpenic acids*. Analytica Chimica Acta. **2009**, 633 (2), 271-277.
59. Gbaguidi, F., Accrombessi, G., Moudachirou, M., Quetin-Leclercq, J. *HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from Mitracarpus scaber and antimicrobial activity on Dermatophilus congolensis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **2005**, 39 (5), 990-995.
60. Cui, T., Li, J.-Z., Kayahara, H., Ma, L., Wu, L.-X., Nakamura, K. *Quantification of the Polyphenols and Triterpene Acids in Chinese Hawthorn Fruit by High-Performance Liquid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**, 54 (13), 4574-4581.
61. Chen, J.H., Xia, Z.H., Tan, R.X. *High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in Perilla frutescens*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **2003**, 32 (6), 1175-1179.
62. Ganbold, M., Barker, J., Ma, R., Jones, L., Carew, M. *Cytotoxicity and bioavailability studies on a decoction of Oldenlandia diffusa and its fractions separated by HPLC*. Journal of Ethnopharmacology **2010**, 131 (2), 396-403.
63. Wang, H., Wang, Z., Guo, W. *Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of Macrocarpium officinalis (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC*. Industrial Crops and Products. **2008**, 28 (3), 328-332.
64. Srivastava, P. *Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids - betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid - in cell cultures of Lantana camara L. In Vitro Cellular; Developmental Biology - Plant*. **2010**, 46 (6), 549-557.
65. Zhou, C., Chen, K., Sun, C., Chen, Q., Zhang, W., Li, X. *Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of Eriobotrya japonica Lindl. by HPLC*. Biomedical Chromatography. **2007**, 21 (7), 755-761.
66. Pereira, L. *Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **2008**, 31 (11-12), 1687-1731.
67. West, C., Elfakir, C., Lafosse, M. *Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. **2010**, 1217 (19), 3201-3216.
68. ThermoElectron, *Method development guide for Hypercarb Columns*. 2004.
69. Ross, P., Majors, R.E. *The role of porous graphitic carbon in HPLC*. LC-GC Europe. **2000**, 13 (5), 310-319.
70. Rhourri, B., *Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse (Thèse de doctorat)*. 2009, Université d'Orléans: Orléans, France. p. 290.
71. Phenomenex, *Synergi. Formulated for polarity*.
72. Justino, G.C., Borges, C.M., Florêncio, M.H. *Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a re-examination*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. **2009**, 23 (2), 237-248.
73. March, R.E., Lewars, E.G., Stadey, C.J., Miao, X.-S., Zhao, X., Metcalfe, C.D. *A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry. **2006**, 248 (1-2), 61-85.
74. Pan, J., Song, Q., Shi, H., King, M., Junga, H., Zhou, S., Naidong, W. *Development, validation and transfer of a hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem*

- mass spectrometric method for the analysis of the tobacco-specific nitrosamine metabolite NNAL in human plasma at low picogram per milliliter concentrations.* Rapid Communications in Mass Spectrometry. **2004**, 18 (21), 2549-2557.
75. Prasain, J.K., Wang, C.-C., Barnes, S. *Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples.* Free Radical Biology and Medicine. **2004**, 37 (9), 1324-1350.
  76. Xing, J., Xie, C., Lou, H. *Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **2007**, 44 (2), 368-378.
  77. Cuyckens, F., Claeys, M. *Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides.* Rapid Communications in Mass Spectrometry. **2002**, 16 (24), 2341-2348.
  78. Huang, L., Chen, T., Ye, Z., Chen, G. *Use of liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in Anoctochilus roxburghii (wall.) Lindl.* Journal of Mass Spectrometry. **2007**, 42 (7), 910-917.
  79. Siddiqui, B.S., Raza, S.M., Begum, S., Siddiqui, S., Firdous, S. *Pentacyclic triterpenoids from Lantana camara.* Phytochemistry. **1995**, 38 (3), 681-685.
  80. Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., Liu, S. *Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. **2004**, 1047 (2), 213-220.
  81. Shu, P., Hong, J.-L., Wu, G., Yu, B.-Y., Qin, M.-J. *Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Iris tectorum by HPLC-DAD-ESI-MSn.* Chinese Journal of Natural Medicines. **2010**, 8 (3), 202-207.
  82. Pollier, J., Goossens, A. *Oleanolic acid.* Phytochemistry. **2012**, 77 (0), 10-15.
  83. Rodríguez-Medina, I.C., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. *Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices.* Journal of Chromatography A. **2009**, 1216 (23), 4736-4744.
  84. Mari, A., Tedesco, I., Nappo, A., Russo, G.L., Malorni, A., Carbone, V. *Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar.* Food Chemistry. **2010**, 123 (1), 157-164.
  85. Alonso-Salces, R.M., Ndjoko, K., Queiroz, E.F., Ioset, J.R., Hostettmann, K., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. *On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection.* Journal of Chromatography A. **2004**, 1046 (1–2), 89-100.
  86. Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H. *Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2003**, 51 (21), 6347-6353.
  87. He, X., Liu, R.H. *Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2007**, 55 (11), 4366-4370.
  88. D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Monaco, P., Pacifico, S. *Radical-Scavenging Activities of New Hydroxylated Ursane Triterpenes from cv. Annurca Apples.* Chemistry & Biodiversity. **2005**, 2 (7), 953-958.
  89. Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I. *Sour Cherry (Prunus cerasus L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods.* Journal of Biomedicine and Biotechnology. **2004**, 5 253-258.



90. Chaovanalikit, A., Wrolstad, R.E. *Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties*. Journal of Food Science. **2004**, 69 (1), FCT67-FCT72.
91. Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., Neri, D. *Cherry Antioxidants: From Farm to Table*. Molecules. **2010**, 15 (10), 6993-7005.
92. Khoo, G.M., Clausen, M.R., Pedersen, B.H., Larsen, E. *Bioactivity and total phenolic content of 34 sour cherry cultivars*. Journal of Food Composition and Analysis. **2011**, 24 (6), 772-776.
93. Awad, M.A., de Jager, A., van Westing, L.M. *Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation*. Scientia Horticulturae. 2000, 83 (3-4), 249-263.
94. Lu, Y., Yeap Foo, L. *Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace*. Food Chemistry. **2000**, 68 (1), 81-85.
95. Soares, M.C., Ribeiro, E.T., Kuskoski, E.M., Valdemiro Gonzaga, L., Lima, A., Filho, J.M., Fett, R. *Composition of phenolic acids content in apple (Malus sp) pomace*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. **2008**, 29 (2), 339-348.
96. Garcia, Y.D., Valles, B.S., Lobo, A.P. *Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace*. Food Chemistry. **2009**, 117 731-738.
97. Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R., Cecchini, F. *Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage*. Food Chemistry. **2011**, 127 (2), 493-500.
98. He, X., Liu, R.H. *Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2008**, 56 (21), 9905-9910.
99. Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V. *A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts*. Microchemical Journal. **2009**, 91 (1), 107-110.
100. Singleton, V.L., Rossi, J.A. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture. **1965**, 16 (3), 144-158.
101. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, 53 (10), 4290-4302.
102. Naczk, M., Shahidi, F. *Extraction and analysis of phenolics in food*. Journal of Chromatography A. **2004**, 1054 (1-2), 95-111.
103. Ismail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., Ismail, M. *Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (cucumis melo) methanolic extracts*. Food Chemistry. **2010**, 119 (2), 643-647.
104. Blois, M.S. *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature. **1958**, 181 1199-1200.
105. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*. Journal of the Science of Food and Agriculture. **1998**, 76 (2), 270-276.
106. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay*. Analytical Biochemistry. **1996**, 239, 70-76.



## CHAPITRE IV

# MANAGEMENT DE LA VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DES FRUITS PAR EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS





## IV. 1. APPARITION ET EVOLUTION DU CONCEPT DE « DEVELOPPEMENT DURABLE »

Au cours des dernières années, la pollution de l'environnement a commencé à avoir une ampleur de plus en plus importante. L'évolution rapide des diverses industries a conduit à l'utilisation excessive des ressources naturelles et à une pollution parfois sévère considérée comme responsable des changements climatiques fréquents.

Par conséquent, la communauté internationale a décidé de trouver des solutions applicables au niveau global afin de diminuer les effets de la pollution et de contrôler l'emploi irraisonnable des ressources disponibles.

Pour ce faire, elle se réunit régulièrement pour discuter des problèmes d'environnement.

La première réunion intitulée « Conférence de Stockholm sur l'Environnement Humain » s'est déroulée en 1972 et a eu comme thématique le débat du problème de l'environnement global et des nécessités de développement. Cette conférence s'est finalisée par :

- la « Déclaration sur l'Environnement » (26 principes) [1] ;
- le « Plan d'Action pour l'Environnement Humain » [2] (109 recommandations) ayant trois composantes :
  - le Programme pour l'Evaluation de l'Environnement Global (Earthwatch) ;
  - les activités pour le management de l'environnement ;
  - les mesures d'appui.

La Conférence de Stockholm a conduit à la naissance du « Programme des Nations Unies pour l'Environnement » dont les activités majeures sont divisées en deux grandes catégories :

- activités orientées vers les problèmes des facteurs d'environnement : la pollution de l'eau, de l'air et du sol ;
- activités orientées vers les problèmes globaux : les pluies acides, la dégradation de la couche d'ozone, les changements climatiques, la conservation de la biodiversité, les déchets toxiques et dangereux etc.

Ultérieurement, la forte liaison existant entre l'environnement et le développement économique a fait l'objet du Rapport Brundtland [3] intitulé « Notre avenir à tous » et exposé en 1987 par la Commission Mondiale sur l'Environnement et le Développement devant l'Assemblée Générale de l'Organisation des Nations Unies. Ce rapport présente pour la première fois le concept « développement durable ». Conformément au principe de ce concept « la société doit satisfaire les demandes de ses membres par l'augmentation de la production mais aussi par la création des conditions équitables d'accès aux ressources naturelles sans porter de préjudices au développement des générations futures ».

En 1992, à Rio de Janeiro, a eu lieu la « Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement » dont le sujet a été axé sur la nécessité d'intégrer le développement économique et la protection de l'environnement dans l'objectif du développement durable. La conférence s'est finalisée avec :

- la « Déclaration de Rio » [4] incluant 27 principes ;
- l'« Agenda 21 » [5] incluant un plan d'action de 40 chapitres comprenant la base d'action, les objectifs à réaliser, les activités nécessaires pour atteindre les objectifs

établis et les modalités de la mise en place pour le développement durable de différents domaines de programmes spécifiques ;

- l'établissement des principes du management de la conservation et du développement durable des forêts ;
- l'Organisation institutionnelle de la Commission Mondiale pour le Développement Durable ;
- la mise au point du Mécanisme de financement pour la mise en place de l'Agenda 21.

Dix années plus tard, en 2002, la « Conférence des Nations Unies sur le Développement Durable » déroulée à Johannesburg a conduit à :

- la « Déclaration de Johannesburg sur le Développement Durable » [6] à travers laquelle les gouvernements des états participants ont accepté d'agir ensemble pour le renforcement des trois constituants indépendants du développement durable : le développement économique, le développement social et la protection de l'environnement au niveau local, national, régional et global ;
- le « Plan de Réalisation de la Conférence Mondiale sur le Développement Durable » [7] qui vise l'application des mesures concrètes à tous niveaux et le renforcement de la coopération internationale afin d'éradiquer la pauvreté, de modifier les modèles de production et de consommation, de protéger la santé et de protéger les ressources naturelles.

La dernière réunion mondiale axée sur le développement durable s'est déroulée en juin 2012 de nouveau à Rio de Janeiro en Brésil. Elle a eu comme points centraux deux thèmes principaux :

- le développement durable à travers l'économie verte ;
- l'amélioration de la coordination internationale en vue du développement durable [8].

Dans ce contexte, un des objectifs majeurs du développement durable est représenté par le contrôle de l'impact des activités sociales et économiques sur l'environnement ce qui impose la mise au point de processus qui se déroulent sous l'égide des systèmes de management de qualité et d'environnement et qui utilisent des énergies renouvelables. De plus, il est nécessaire que les processus conduisent, si possible, à de faibles quantités de déchets, la génération de ces déchets pouvant être réduite par la diminution des sources de déchets ou par la réutilisation des produits. Parmi ces actions, la minimisation est la plus importante. Elle inclut :

- la prévention de la production des déchets par l'utilisation de technologie de production efficaces ;
- le recyclage interne de la production des déchets ;
- l'amélioration de la qualité des déchets ;
- la réutilisation des produits ou de certaines parties dans le même but ou dans des buts différents [9].

En retenant les aspects les plus importants du développement durable, nous allons voir par la suite quels sont les effets bénéfiques et nocifs possibles du processus de récupération des molécules bioactives à partir d'un matériel végétal.

Ainsi, dans un premier temps nous allons établir les aspects environnementaux ayant un impact significatif sur l'environnement. Nous allons continuer avec la présentation de leurs effets sur les facteurs d'environnement (air, eau, sol, santé humaine etc.) et nous allons conclure le présent chapitre par la présentation des différentes possibilités de réduire ces effets.

## IV. 2. ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX SPECIFIQUES AU PROCESSUS DE RECUPERATION DE PRINCIPES ACTIFS

### IV. 2. 1. Analyse du processus technologique

Le processus de récupération des composés actifs à partir d'une source d'origine végétale implique plusieurs étapes décrites dont le principe a été décrit antérieurement. Ce processus est repris dans la Figure IV.1. Son analyse va nous servir à l'identification des aspects environnementaux impliqués.

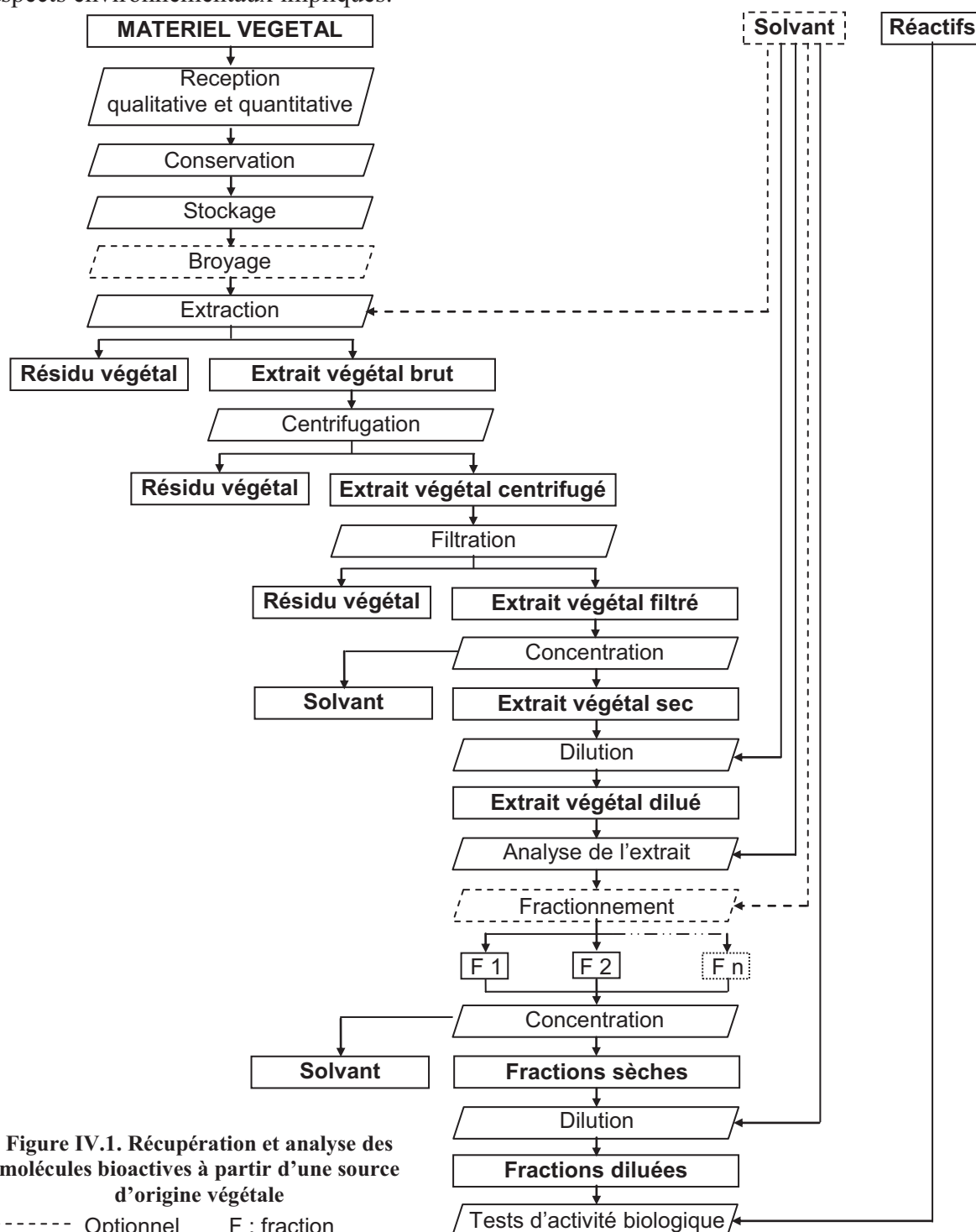


Figure IV.1. Récupération et analyse des molécules bioactives à partir d'une source d'origine végétale

Brièvement, le matériel végétal (représenté par les fruits ou par les résidus de fruits) est premièrement **réceptionné** du point de vue **qualitatif et quantitatif**. Cette opération doit être effectuée soigneusement afin de pouvoir utiliser uniquement des matières premières conformes aux demandes du processus d'obtention de molécules bioactives. Ainsi, il est nécessaire que les cerises ne soient pas abîmées et qu'elles soient cueillies à pleine maturité. En ce qui concerne les résidus de pommes, il est indiqué qu'ils ne soient pas en cours de fermentation ou attaqués par des insectes ou autres organismes ou microorganismes pouvant dégrader la qualité du matériel végétal.

Une fois réceptionnés, les fruits et les résidus de fruits doivent être tout de suite **conservés** afin de mieux préserver les constituants d'intérêt. Cette étape peut comporter une ou plusieurs sous-étapes. Nous avons vu dans les autres chapitres de ce manuscrit que la méthode la mieux adaptée pour conserver les cerises et les résidus de pommes est la congélation. Cette méthode présente le grand avantage de pouvoir stopper rapidement le processus de dégradation des matériaux végétaux. Dans le cas des cerises, la congélation a été le seul mode de préservation utilisé. En effet, il était nécessaire de pouvoir conserver l'eau constitutive des cerises afin de réaliser l'extraction des bioactifs sans ajouter de solvant. Toutefois la conservation à long terme du végétal par congélation est consommatrice d'énergie et encombrante car le matériel végétal reste volumineux. Les résidus de pommes pouvant être utilisés secs, ils ont été tout d'abord congelés puis séchés par lyophilisation ou par zéodratation, les deux procédés conduisant à l'enlèvement judicieux de l'eau permettant le développement des microorganismes de dégradation. Les résidus de pommes séchés ont été ensuite finement **broyés** et stockés dans des petits bocaux en verre à température ambiante.

L'étape suivante impliquée dans le processus de récupération des principes actifs à partir de fruits ou de leurs résidus est l'**extraction**.

Au cours de nos recherches une méthode « verte » d'extraction des anthocyanines de cerises a été développée. Cette méthode a utilisé comme solvant d'extraction uniquement la quantité importante d'eau constitutive de ces fruits. Sous l'action de l'irradiation électromagnétique, l'eau s'est échauffée conduisant à une forte augmentation de la pression et de la température à l'intérieur des cellules végétales ce qui a entraîné la destruction des parois cellulaires et la migration des principes actifs vers l'extérieur.

Lors de l'extraction des molécules bioactives de résidus de pommes nous avons eu besoin d'ajouter un solvant capable de solubiliser les analytes d'intérêt étant donné que l'eau a été enlevée par séchage. Par conséquent, nous avons mélangé le matériel végétal avec différents solvants tels que l'éthanol (EtOH), le méthanol (MeOH), l'acétate d'éthyle (EtOAc) ou des mélanges MeOH-Eau, EtOAc-EtOH dans un rapport de 1 g de végétal sec pour 20 mL de solvant. Quatre méthodes d'extraction différentes ont été utilisées : la macération (M), l'extraction par solvant pressurisé (ASE), l'extraction assistée par ultrasons (USAE) et l'extraction assistée par microondes (MWAE).

Les extraits végétaux bruts ont été ensuite soumis à une **centrifugation** permettant la séparation des extraits de résidus végétaux. La centrifugation a été suivie d'une **filtration** par filtres seringue. Ces deux étapes nous ont permis d'obtenir des extraits limpides sans traces de matériel végétal pouvant gêner le déroulement ultérieur du processus d'analyse.

Au moment de la caractérisation du matériel végétal nous avons remarqué la richesse en certains principes actifs. Toutefois, nous avons constaté que certaines molécules bioactives se trouvent en faibles quantités. Cette observation nous a conduits à recourir à une

**concentration** des extraits bruts obtenus. Pour ce faire, nous avons utilisé, soit l'évaporation sous azote ou vide (extraits de résidus de pommes) soit la lyophilisation (extraits de cerises).

Les extraits secs obtenus ont été **dilués** par l'ajout d'un solvant compatible avec l'analyse à réaliser ultérieurement.

Différentes méthodes d'**analyse** ont été développées pour la caractérisation des extraits. Ainsi, dans le cas des extraits de cerises, nous avons utilisé particulièrement la chromatographie liquide de haute performance (HPLC). Par contre, dans le cas des extraits de résidus de pommes, différentes techniques telles que la chromatographie haute performance sur couche mince (HPTLC), la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase supercritique (SFC) ont été employées. Les phases mobiles impliquées dans l'élution des composés d'intérêt ont été constituées d'eau et de différents solvants (MeOH, acétonitrile (MeCN), isopropanol (iPrOH)) avec des ajouts de faibles volumes d'acides organiques (acide formique, acide trifluoroacétique, acide acétique). La détection des molécules bioactives des extraits a été réalisée à l'aide de différents types de détecteur tels que : l'UV, le DAD, le DEDL ou le spectromètre de masse (MS).

Afin de faciliter l'analyse des extraits et le couplage à la spectrométrie de masse en vue d'une meilleure caractérisation, ou de tester leur activité antioxydante, les extraits ont été soumis à un **fractionnement** par extraction liquide-liquide (ELL) (extraits de résidus de pommes) ou par chromatographie de partage centrifuge (CPC) ou chromatographie semi-préparative (CSP) (extraits de cerises). Les deux premières techniques ont impliqué l'utilisation des solvants non-miscibles à l'eau tels que le butanol (BuOH), l'heptane ou l'EtOAc alors que la CSP a été réalisée à l'aide d'une phase mobile plus « verte » composée d'eau et d'EtOH avec ajout d'un faible pourcentage d'acide formique.

Les fractions obtenues sont plus diluées en composés bioactifs ce qui impose la nécessité d'une nouvelle **concentration**. Cette fois-ci nous avons utilisé juste l'évaporation sous vide à différentes températures selon le solvant impliqué dans le fractionnement.

Les fractions séchées ont été **solubilisées** à une concentration connue en vue des analyses ultérieures.

Finalement, nous avons procédé à l'évaluation des **activités biologiques** des extraits et de leurs fractions. Pour ce faire, nous avons estimé à l'aide de différents réactifs spécifiques, la teneur en composés phénoliques totaux (test du Folin-Ciocalteu), la teneur en flavonoïdes totaux, la capacité anti-radicalaire (test DPPH) et le pouvoir réducteur (test FRAP).

En regardant toutes les étapes nécessaires pour la récupération et l'analyse des molécules bioactives existant dans un matériel végétal nous pouvons remarquer que ce processus est assez complexe et laborieux.

De plus, le déroulement de certaines étapes implique la consommation d'énergie et des volumes élevés des solvants (dont certains sont toxiques pour les organismes vivants et pour l'environnement) et produisent des déchets.

Nous allons voir par la suite quels sont les facteurs polluants et les aspects ayant un impact significatif sur l'environnement.



## IV. 2. 2. Facteurs polluants

Les principaux polluants résultant des activités du processus de récupération de principes actifs sont représentés par les résidus solides, liquides et par les émissions dans l'atmosphère. De plus le déroulement du processus nécessite une consommation d'énergie et peut générer du bruit.

**Les résidus solides** peuvent être classés en deux catégories:

1. *déchets non valorisables* (fruits non-conformes, feuilles, queux, résidus végétaux, consommables de laboratoire) qui sont :
  - issus de la réception qualitative et quantitative et du stockage des fruits et des résidus de fruits ;
2. *déchets valorisables* qui :
  - sont pesés et stockés sur des plateformes en béton ;

**Les résidus liquides** incluent :

1. *les eaux usées* constituées de :
  - l'eau utilisée pour le lavage des matières premières et des récipients, pour l'hygiénisation des équipements technologiques et des espaces de stockage etc. L'eau résiduelle récupérée contient des substances organiques, des morceaux de fruits ou de résidus de fruits, des agents de nettoyage, des sels et des substances solides en suspension.
  - l'eau provenant de décharges des opérations d'hygiène corporelle, de la préparation des aliments, du lavage des vêtements, de l'évacuation de produits physiologiques. Elle représente un milieu propice pour le développement des microorganismes dont la plupart pathogènes ;
2. *les phases mobiles chromatographiques, les solvants d'extraction et de fractionnement*, constitués d'eau, de solvants et d'acides organiques en faible quantités.
3. *les mélanges de réactifs utilisés pour les tests d'activité biologique*

**Les émissions dans l'air** représentés par :

1. *les émissions gazeuses* :
  - issues de la combustion des combustibles utilisés pour le transport des matières premières qui conduit à l'apparition de polluants gazeux tels que le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), les composés de l'azote (NO<sub>x</sub>), les composés organiques volatils (COV), le monoxyde et le dioxyde de carbone ;
  - ces composés peuvent provenir d'autres étapes du processus également. Ainsi, les composés organiques volatils, par exemple, peuvent être obtenus au moment du séchage de résidus de pommes ou lors de la concentration des extraits végétaux par évaporation ;
2. *les particules en suspension* :
  - la poussière est générée par le transport, par la manipulation des matières premières (résidus de pommes broyés) et des combustibles solides (charbone etc.) ;
3. *l'odeur* :
  - son apparition est due aux différentes étapes du processus technologique telles que : l'extraction des molécules bioactives, la concentration des extraits obtenus mais aussi le traitement des eaux ménagères ou technologiques.

### **L'énergie**

Le déroulement de certaines étapes du processus de récupération de principes actifs présents dans les sources végétales analysées se réalise avec une consommation d'énergie nécessaire pour le stockage à basse température, pour le séchage des résidus de pommes, le broyage du matériel végétal, l'extraction, la centrifugation, la concentration des extraits, les analyses chromatographiques, les fractionnements et la détermination de l'activité biologique des extraits et de leurs fractions. L'étape la plus énergivore du processus est le stockage des matières premières par congélation. Elle est suivie par la lyophilisation du matériel végétal et des extraits alors que l'extraction de principes actifs nécessite très peu d'énergie.

### **Le bruit**

De courtes périodes bruyantes peuvent être remarquées au cours du processus lors du broyage de résidus de pommes séchés afin d'obtenir la poudre qui va être soumise à l'extraction ou lors de l'extraction de principes actifs (notamment dans le cas de l'extraction assistée par ultrasons et de l'extraction assistée par microondes). Un bruit particulier peut être détecté au moment de l'analyse chromatographique (pompes, réducteurs de pression etc.) et aussi au moment de la concentration des extraits par évaporation sous vide. En revanche, au niveau de laboratoire, le niveau du bruit ne dépasse pas les limites maximales admissibles.

## **IV. 2. 3. Identification des aspects environnementaux**

Avant de procéder à l'identification proprement-dite des aspects environnementaux du processus de récupération des principes actifs de fruits ou de résidus de fruits nous allons présenter quelques définitions spécifiques.

Conformément aux normes européennes de références EN ISO 14001 : 2004 [10] et EN ISO 14050 : 2009 [11] : **l'aspect environnemental** est un élément des activités, produits ou services d'une société qui peut interagir avec l'environnement. Les mêmes normes stipulent que **l'impact sur l'environnement** est représenté par tout changement de l'environnement, bénéfique ou nocif, qui résulte totalement ou partiellement des activités, les produits ou les services d'une société.

Les aspects environnementaux sont soumis à une sélection dans un ordre bien précis et visent à :

- l'élimination de ceux qui ne peuvent pas être contrôlés par la société et sur lesquels elle n'a aucune influence ;
- la rétention des aspects qui ont ou peuvent avoir un impact significatif sur l'environnement ;
- le déroulement des activités nécessaires pour diminuer l'impact significatif des aspects environnementaux.

Afin d'identifier les aspects environnementaux il est nécessaire de considérer :

- l'utilisation des matières premières, des matériaux, des appareils et de l'énergie ;
- la gestion de déchets ;
- les émissions atmosphériques ;
- les déversements dans l'émissaire ;
- la contamination du sol ;
- les problèmes concernant la communauté.

Dans le tableau suivant sont présentés les aspects environnementaux spécifiques au processus d'obtention de composés bioactifs à partir de fruits ou de leurs résidus et leur impact sur l'environnement.

**Tableau IV.1. Aspects environnementaux du processus d'obtention de principes actifs**

<i>Processus</i>	<i>Aspect environnemental</i>	<i>Impact sur l'environnement</i>
Transport des matières premières	Résidus valorisables : - fruits (cerises dégradées) - résidus de fruits (résidus de pommes, queux de cerises, feuilles de cerisier) Résidus non valorisables : - poussière ; huiles usées	Air, sol, santé humaine
Réception qualitative et quantitative	Résidus valorisables : - fruits (cerises) - résidus de fruits (résidus de pommes, queux de cerises, feuilles de cerisier) Résidus non valorisables : - poussière	Air, sol, santé humaine
Conservation	Résidus valorisables : - condensation Consommation d'énergie ; Bruit	Air, sol, santé humaine
Stockage	Résidus valorisables : - fruits dégradés - résidus de fruits dégradés Consommation d'énergie	Air, sol, santé humaine
Broyage	Résidus non valorisables : - poussière Consommation d'énergie Bruit	Air, sol, santé humaine
Extraction	Résidus potentiellement valorisables : - résidus végétaux de l'extraction - solvants Consommation d'énergie	Air, eau, sol, santé humaine
Centrifugation	Résidus non valorisables : - sédiment végétal Consommation d'énergie ; Bruit	Air, eau, sol, santé humaine
Filtration	Résidus non valorisables : - rétentat végétal	Air, eau, sol, santé humaine
Concentration	Résidus valorisables : - solvants condensés Consommation d'énergie	Air, eau, sol, santé humaine
Dilution	Résidus potentiellement valorisables : - consommables de laboratoire	Sol, santé humaine
Analyse de l'extrait	Résidus valorisables : - phase mobile chromatographique (solvants (MeOH), eau, acides organiques (acide formique, HOAc, TFA), composés bioactifs) Résidus potentiellement valorisables : - consommables de laboratoire Résidus non valorisables : - phase mobile chromatographique (solvants : MeCN, iPrOH, EtOAc, acétone, chloroforme) Consommation d'énergie	Air, eau, sol, santé humaine

Tableau IV.1. Aspects environnementaux du processus d'obtention de principes actifs (suite)

<i>Processus</i>	<i>Aspect environnemental</i>	<i>Impact sur l'environnement</i>
Fractionnement de l'extrait	Résidus valorisables : - phase mobile chromatographique (solvants (MeOH, EtOH, EtOAc, BuOH, heptane), acides organiques (acide formique), eau) Consommation d'énergie	Air, eau, sol, santé humaine
Concentration	Résidus valorisables : - solvants condensés Consommation d'énergie	Eau, sol, santé humaine
Dilution	Résidus potentiellement valorisables : - consommables de laboratoire	Sol, santé humaine
Tests d'activité biologique	Résidus valorisables : - mélange de réactifs Résidus potentiellement valorisables : - consommables de laboratoire Consommation d'énergie	Eau, sol, santé humaine
Nettoyage, hygiénisation	Matières organiques solubles Particules solides en suspension (résidus de produits, des agents de nettoyage)	Air, eau, sol, santé humaine

## IV. 3. EVALUATION ET QUANTIFICATION DE L'IMPACT DES ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX IDENTIFIES

### IV. 3. 1. Evaluation de l'impact des aspects environnementaux identifiés

Les aspects environnementaux sont soumis à une hiérarchisation en fonction de la signification de l'impact [12]. Les critères utilisés pour son calcul sont reportés ci-dessus :

**Dispositions législatives et de réglementation (R)** – notes de 1 à 10 pour les situations suivantes :

- dispositions législatives et de réglementation strictement précisées – 10 points ;
- sollicitations évidentes des clients et/ou de la communauté locale – 8 points ;
- impositions internes pour la résolution des intérêts particuliers – 6 points ;
- sollicitations du personnel de la société – 4 points ;
- absence de dispositions – 2 points.

**Evaluation de niveau du risque (N<sub>r</sub>)** – on considère les facteurs suivants :

- probabilité d'apparition (A) – plus elle est importante plus le risque est élevé ;
- probabilité de détection (B) – plus la capacité de détection diminue moins le contrôle est probable et donc le niveau de risque augmente ;
- l'importance des conséquences (C) – plus les dommages produits par la pollution sont importants plus le facteur de risque est élevé.

L'évaluation du niveau de risque se réalise à l'aide d'un système numérique conduisant à un total conformément au Tableau IV.2:

**Tableau IV.2. Evaluation du niveau de risque**

<i>Probabilité d'apparition</i> (A)	<i>Probabilité de détection</i> (B)	<i>Sévérité des conséquences</i> (C)	<i>Niveau du risque</i> $N_r = (A + B) \times C$
Très fréquente - 5 points	Très grande - 1 point	Très élevée - 10 points	60
Fréquente - 4 points	Grande - 2 points	Elevée - 8 points	48
Modérée - 3 points	Modérée - 3 points	Modérée - 6 points	36
Basse - 2 points	Basse - 4 points	Basse - 4 points	24
Très basse - 1 point	Très basse - 5 points	Très basse - 2 points	12

1. **Implications des aspects de santé (S)** – notes de 1 à 10 pour les situations suivantes :
  - provoque la mort – 10 points ;
  - provoque des conséquences graves sur les organismes – 8 points ;
  - provoque des irritations, des difficultés de respiration – 6 points ;
  - conduit à de l'inconfort, à la réduction de la capacité de travail – 4 points ;
  - non significatives – 2 points.
  
2. **Implications écologiques sur l'environnement (E)** – notes de 1 à 10 en fonction de l'aire de pollution :
  - niveau global – 10 points ;
  - niveau régional – 8 points ;
  - niveau local – 6 points ;
  - voisinage – 4 points ;
  - espace de la société – 2 points.
  
3. **Problèmes de la communauté et du milieu local (P)** – au moment de l'établissement des aspects environnementaux, les éléments relatifs à la communauté et au milieu local sont aussi à considérer en accordant des notes de 1 à 75 :
  - Bruit :
    - absence – 0 point ;
    - près de l'entreprise – 5 points ;
    - à l'intérieur de la société – 15 points ;
    - voisinage – 25 points ;
  - Aspect du paysage :
    - agréable – 0 point ;
    - désagréable à l'intérieur de la société – 5 points ;
    - perturbant pour les voisins – 25 points ;
  - Réclamations :
    - absence – 0 point ;
    - du personnel de la société – 5 points ;
    - des voisins, bénéficiaires – 15 points ;
    - des organismes de contrôle et administratives – 25 points.

Les notes établies pour les 5 critères d'évaluation sont introduites dans la « Fiche d'évaluation de l'impact des aspects environnementaux ».

Dans le cas du processus de récupération des principes actifs à partir de fruits ou de leurs résidus, les notes pour les aspects environnementaux impliqués sont présentées dans le Tableau IV.3.

Tableau IV.3. Evaluation de l'impact des aspects environnementaux

<i>Aspect environnemental</i>	<i>R</i>	<i>N<sub>r</sub></i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>P</i>	<i>Total (R+N<sub>r</sub>+S+E+P)</i>
<i>Résidus valorisables :</i>						
- fruits (cerises dégradées, cerises séchées)	10	12	2	2	12	38
- résidus de fruits (résidus de pommes, queux de cerises, feuilles de cerisier)	10	24	2	4	12	52
- condensation	6	12	2	2	5	27
- solvants condensés	6	12	2	2	5	27
- phase mobile chromatographique (solvants (MeOH, MeCN, iPrOH, EtOAc, acétone, chloroforme), eau, acides organiques (acide formique, HOAc, TFA), composés bioactifs)	10	36	6	4	15	71
- mélange de réactifs	10	24	6	4	15	59
- consommables de laboratoire	6	12	2	2	5	27
<i>Résidus non valorisables :</i>						
- résidus de pommes	6	36	8	2	5	57
- sédiment végétal	6	12	2	2	5	27
- rétentat végétal	6	12	2	2	5	27
<i>Matières organiques solubles</i>						
<i>Particules solides en suspension (résidus de produits, agents de nettoyage)</i>	10	30	2	10	15	67
<i>Poussière</i>	10	20	2	2	5	39
<i>Fuites de carburants</i>	10	20	2	2	10	44
<i>Huiles usées</i>	10	12	2	2	10	36
<i>Bruit</i>	10	12	2	2	10	36
<i>Consommation d'énergie</i>	10	20	2	2	5	39

Les aspects environnementaux ayant plus de 50 points sont considérés comme des aspects environnementaux significatifs et sont présentés dans le Tableau IV.4.

Tableau IV.4. Liste des aspects environnementaux significatifs

<i>Etape technologique</i>	<i>Aspect environnemental</i>	<i>Evaluation de l'impact</i>
Extraction	Résidus végétaux	57
Analyse de l'extrait	Phase mobile chromatographique (solvants (MeOH, MeCN, iPrOH, EtOAc, acétone, chloroforme), eau, acides organiques (acide formique, HOAc, TFA), composés bioactifs)	71
Tests d'activité biologique	Mélange de réactifs	59
Nettoyage, hygiénisation	Matières organiques solubles Particules solides en suspension (résidus de produits, agents de nettoyage)	67

## IV. 3. 2. Quantification de l'impact des aspects environnementaux

### IV. 3. 2. 1. Description de la méthode de quantification

Afin de quantifier l'impact des aspects environnementaux identifiés antérieurement nous avons utilisé la « Méthode de détermination de l'indice de pollution globale » (IPG).

Développée par Rojanschi [13], cette méthode peut être employée pour apprécier la qualité de l'environnement du point de vue quantitatif. Elle se base sur la détermination d'un indicateur issu du rapport entre la valeur idéale et la valeur réelle à un moment donné des indicateurs de qualité spécifiques pour les facteurs d'environnement analysés.

Conformément à la présentation synthétique réalisée par Robu *et al.* [14] la méthode IPG comporte plusieurs étapes d'appréciation de la qualité des facteurs d'environnement et la corrélation graphique des résultats obtenus. Pour ce faire, il est nécessaire d'accorder à chaque facteur d'environnement considéré des notes pouvant refléter l'approchement ou l'éloignement de l'état idéal (absence de la pollution) de ce facteur. Les notes peuvent être de 1 à 10 sachant que la valeur « 10 » est attribuée si l'état naturel d'un facteur d'environnement n'a pas été affecté par l'activité humaine, alors que la valeur « 1 » indique une situation irréversible de détérioration du facteur d'environnement analysé.

Généralement, l'appréciation de la qualité globale de l'environnement d'une région à un moment donné est possible par l'appréciation de la qualité de l'air, de l'eau, du sol, de l'état de la santé de la population etc. Chacun de ces facteurs peut être caractérisé par des indicateurs représentatifs à travers leur encadrement dans certaines limites de qualité<sup>2</sup>.

Les notes accordées sont ensuite utilisées pour déterminer une moyenne pour chacun des facteurs d'environnement cités antérieurement. Ces moyennes servent à l'obtention d'une surface graphique qui relie tous les facteurs pouvant ainsi illustrer l'effet synergique. Selon le nombre de facteurs impliqués il y a possibilité d'obtenir un triangle (3 facteurs), un carré (4 facteurs) etc. (Figure IV.2). Dans la situation idéale (les facteurs d'environnement conservent leur état naturel), les notes ont la valeur maximale ce qui conduit à une surface graphique régulière. Pour une situation réelle la surface obtenue n'est pas régulière. De plus, elle est inférieure à celle du cas idéal.

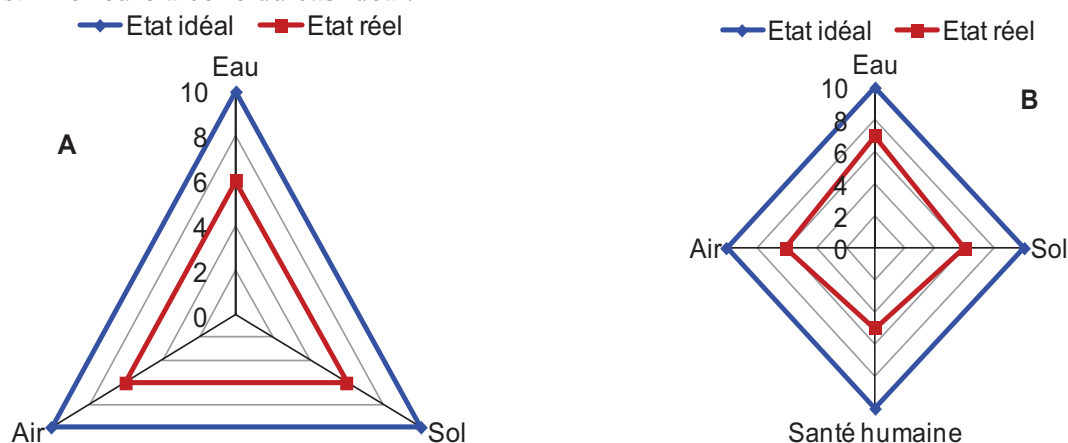


Figure IV.2. Calcul de l'indice de pollution globale pour 3 facteurs (A) ou 4 facteurs (B)

<sup>2</sup> Par exemple, on considère que la qualité de l'air n'est pas affectée par l'activité humaine si la concentration en oxydes de soufre ne dépasse pas  $20 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ , si la concentration des matières en suspension est nulle et si l'utilisation de l'air n'induit pas des effets nocifs sur les vivants ou sur la végétation. Tout changement constaté pour ces paramètres conduit à la diminution de la qualité de l'air.

Le rapport entre la surface représentant l'état idéal ( $E_I$ ) et celle représentant l'état réel ( $E_R$ ) des facteurs d'environnement est appelé **indice de pollution globale (IPG)**.

Si les composants d'environnement ne souffrent pas de dégradations l'IPG est unitaire. Il devient supra unitaire dès que les caractéristiques des facteurs d'environnement changent. Le Tableau IV.5 illustre l'état de l'environnement en fonction de l'IPG.

**Tableau IV.5. Valeurs de l'indice de pollution globale**

<i>Valeur de l'IPG</i>	<i>Etat de l'environnement</i>
IPG = 1	Environnement naturel non affecté par l'activité humaine
1 < IPG < 2	Environnement affecté par l'activité humaine dans les limites admissibles
2 < IPG < 3	Environnement affecté par l'activité humaine provoquant de l'inconfort pour les êtres vivants
3 < IPG < 4	Environnement affecté par l'activité humaine provoquant des troubles pour les êtres vivants
4 < IPG < 6	Environnement gravement affecté par l'activité humaine. Dangereux pour les êtres vivants
IPG > 6	Environnement dégradé, impropre pour les êtres vivants

Les mêmes auteurs [14] remarquent aussi les principaux avantages de la méthode IPG parmi lesquels nous pouvons citer :

- la possibilité d'obtenir l'image globale de l'état de l'environnement à certain moment ;
- la possibilité de comparer des régions différentes à conditions que l'évaluation soit faite sur les mêmes critères ;
- la possibilité de comparer l'état de la même région dans des moments différents.

Par contre, en dépit de ces avantages la méthode IPG reste subjective vu qu'elle utilise des notes établies selon l'expérience et l'exigence de chaque évaluateur.

### **IV. 3. 2. 2. Application de la méthode au processus de récupération de principes actifs à partir de fruits ou de résidus de fruits**

Sachant que les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au niveau du laboratoire nous n'avons pas déterminé effectivement l'influence des étapes du processus de récupération des molécules bioactives à partir de sources végétales sur la qualité des paramètres d'environnement.

Par conséquent, les notes d'appréciation accordées par la suite ne sont qu'à titre d'exemple.

Ainsi, nous pouvons remarquer que les activités déroulées génèrent des eaux usées. Vu qu'avant d'arriver dans l'émissaire, ces eaux sont traitées, nous pouvons considérer que les êtres vivants du milieu aquatique ne sont pas affectés par les déversements et en conséquence nous pouvons accorder **8 points** pour l'impact du processus sur le facteur d'environnement **EAU**.

La récupération des molécules bioactives à partir de fruits ou de résidus de fruits a plus d'influence sur la qualité de l'air à cause de composés organiques volatils qui peuvent être libérés de résidus de pommes dans le cas d'un stockage inapproprié, de l'apparition de la poussière au moment du broyage de résidus de pommes ou de l'utilisation de solvants volatils. Ces considérations nous ont conduits à la conclusion que la **note 7** représente le mieux le niveau d'affectation de la qualité de l'**AIR**.



Le **SOL** peut être affecté par les fuites de combustibles utilisés pour le transport des matières premières, mais aussi dans le cas du stockage des consommables de laboratoire dans des espaces inadéquates. Nous pouvons apprécier l'impact sur ce facteur d'environnement avec la **note 9**.

En ce qui concerne l'influence sur la **SANTE HUMAINE**, nous considérons qu'autant le niveau du bruit des installations utilisées que celui des émissions des polluants ne dépassent pas les limites admises ce qui nous a conduit à accorder **8 points** pour l'impact du processus sur ce facteur d'environnement.

La représentation graphique de la situation idéale par rapport à nos estimations est illustrée dans la Figure IV.3.

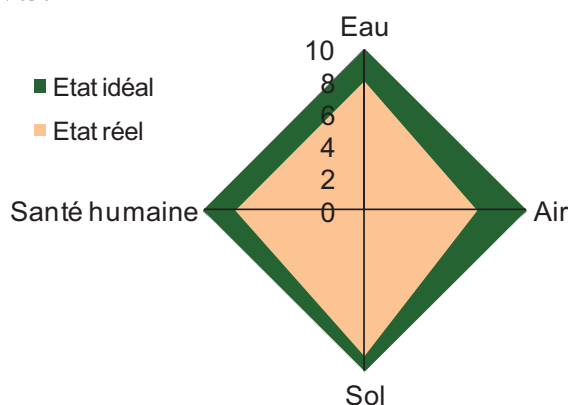


Figure IV.3. Représentation de l'impact sur les facteurs d'environnement du processus de récupération des molécules bioactives

Le rapport des aires des surfaces déterminées a été de 1,53. L'indice de pollution globale se situe entre 1 et 2 ce qui signifie (conformément aux données du Tableau IV.5) que l'environnement est affecté par l'activité de récupération des principes actifs à partir de sources végétales dans les limites admissibles. Cet encadrement est similaire à celui obtenu par Zaharia *et al.* [15] qui ont étudié l'impact sur l'environnement d'un site de production d'arômes en utilisant la même méthode de quantification.

## IV. 4. REMEDIATION DES ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX A IMPACT SIGNIFICATIF

Dans le contexte du développement durable il est indiqué que chaque activité humaine se déroule avec une production minimale de résidus valorisables ou non valorisables. Le traitement et la réutilisation de ces résidus est aujourd'hui une des préoccupations majeures de tous les producteurs.

Comme nous avons vu antérieurement (Tableau IV.5), la récupération des molécules bioactives à partir de fruits ou de résidus de fruits conduit également à l'obtention de résidus végétaux, de phases mobiles chromatographiques usées et d'eaux usées contenant des matières organiques solubles et des particules en suspension.

Nous allons détailler par la suite, les modalités de traitement de ces résidus solides et liquides.

## IV. 4. 1. Traitement des résidus végétaux

Les résidus végétaux issus du processus d'extraction sont représentés par :

- les cerises utilisées pour la récupération des composés à activité antioxydante dont les anthocyanines sont majoritaires ;
- les résidus de pommes utilisées pour récupérer des composés à activité antioxydante (composés phénoliques) et / ou anti-inflammatoire (composés triterpéniques) etc.

Lors des précédents chapitres de ce manuscrit nous avons mentionné que l'extraction de principes actifs d'intérêt de ces sources végétales se réalise différemment.

Ainsi, dans le cas des **CERISES**, nous avons réalisé une extraction assistée par microondes avec ou sans solvant. Ce dernier mode d'extraction utilise comme solvant d'extraction juste l'eau constitutive du matériel végétal et conduit à l'obtention de l'extrait d'un côté et de cerises séchées d'un autre côté.

Les *cerises épuisées* peuvent être impliquées dans différents autres processus de valorisation parmi lesquels nous pouvons citer l'introduction dans l'alimentation des animaux ou la production de la biomasse.

D'autre part, les *noyaux de cerises* peuvent constituer un matériel de départ pour l'obtention de charbon comme alternative à celui provenant habituellement du bois. Pour ce faire, le matériel végétal est carbonisé pendant 4 h, sous azote, à une température élevée (400 – 1000°C) [16]. Le charbon obtenu peut être utilisé dans différentes directions telles que la valorisation du tabac, la métallurgie ou l'industrie chimique mais aussi pour la production du charbon actif par l'intermédiaire d'un traitement thermique suivi par l'activation chimique physique (à l'air [17]) ou chimique (avec hydroxyde de potassium [18], avec chlorure de zinc [19] etc.). Le charbon actif se caractérise par une haute porosité et par de bonnes propriétés adsorbantes [20] qui le rendent utile pour l'élimination des ions métalliques tels que le Cu (II) ou le Co (II) [21] de solutions aqueuses, pour l'élimination de l'ochratoxine A du vin rouge [22] ou pour la production d'électrodes pour les supercondensateurs [23].

En ce qui concerne les *feuilles* et les *queux* de cerises, elles peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux ou comme engrais agricole.

Dans le cas de **RESIDUS DE POMMES**, l'extraction sans solvant n'a pas été possible. Par conséquent, le matériel végétal a été mis en contact avec différents solvants capables de solubiliser les composés d'intérêt. Le *résidu végétal* issu du processus d'extraction ainsi que celui obtenu après centrifugation et filtration contient toujours une partie du solvant d'extraction utilisé. Selon les caractéristiques de ce solvant (toxicité, miscibilité à l'eau etc.) plusieurs modalités de valorisation peuvent être envisagées. Par exemple, dans le cas de l'extraction à l'EtOH pur, le résidu végétal résultant peut être trempé dans l'eau et ce mélange peut être utilisé pour l'obtention de la biomasse. Par contre, le résidu contenant du MeOH (solvant plus toxique), de l'EtOAc (solvant non miscible à l'eau) purs ou en mélange avec l'EtOH ne peut être employé pour la production de biomasse qu'après l'élimination du solvant. Pour ce faire, il est possible de procéder à une rectification. Cette opération est facilement réalisable dans le cas des mélanges (MeOH – eau) vu la différence entre les points d'ébullition des constituants (65°C pour le MeOH par rapport à 100°C pour l'eau). Par contre, les points d'ébullition de l'EtOAc et du EtOH sont proches (78,3°C et 77,1°C respectivement). Le mélange de ces deux solvants est azéotrope positif et la température d'ébullition est de 71,7°C. A cette température et à pression atmosphérique le mélange obtenu par distillation est constitué de 30% EtOH et de 70% EtOAc. La séparation peut être améliorée par distillation extractive [24], par distillation azéotropique [25], par

pervaporation à températures élevées (100 à 130°C) sur des membranes de zéolithes [26] etc. Une fois les solvants éliminés, le résidu végétal peut être utilisé pour la production de la biomasse, pour l'alimentation animale etc.

## IV. 4. 2. Traitement des résidus chromatographiques

L'analyse chromatographique des extraits obtenus à partir de cerises ou de résidus de pommes nécessite des volumes importants de **SOLVANTS** dont les *alcools* sont parmi les plus utilisés. Leur fiche toxicologique indique le fait que dans des conditions normales de stockage, ce sont des produits relativement stables. Ils sont totalement ou partiellement miscibles à l'eau, facilement inflammables, volatils et souvent toxiques [27]. Ainsi, le MeOH affecte le nerf optique pouvant provoquer la cécité ou la mort [28]. Les vapeurs d'EtOH inhalées en mode répété conduisent à des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures. Ils provoquent des céphalées, de la fatigue et entraînent une diminution de la capacité de concentration et de la vigilance [29]. L'iPrOH provoque somnolence, vertiges, irritations oculaires [30]. Le BuOH provoque également de la somnolence, des vertiges. Il irrite la peau et les voies respiratoires [31]. Un autre solvant, peu utilisé au cours des travaux de recherches présentés dans ce manuscrit est le MeCN. L'acétonitrile est responsable, comme la plupart des solvants organiques, d'atteintes cutanées de dermo-épidermite irritative récidivante, avec dessèchement de la peau, et d'atteintes neurologiques se manifestant par une ébriété, des sensations de vertiges voire des signes de syndrome narcotique [32]. A part les solvants organiques, les phases mobiles chromatographiques utilisées pour l'analyse des extraits contiennent certains *additifs* capables d'assurer la stabilité des composés d'intérêt et d'améliorer les pics chromatographiques. L'acide formique provoque d'importants effets irritants sur la peau et les muqueuses (oculaires et respiratoires) [33]. L'acide acétique (HOAc) et ses vapeurs sont caustiques et peuvent provoquer des brûlures chimiques de la peau, des yeux et des muqueuses respiratoires et digestives [34] alors que l'exposition au TFA peut affecter le système nerveux central, le foie et les reins [35].

Outre les effets directs sur les êtres humains observés lors de la manipulation de longue ou de courte durée, les solvants et les additifs utilisés pour l'analyse chromatographique peuvent affecter indirectement tout être vivant si leurs vapeurs arrivent dans l'eau ou dans l'atmosphère. Dans ce dernier cas, les émissions sont fortement limitées et réglementées par la directive 1999/13/CE [36] concernant les composés organiques volatils. Les solvants seront donc préférentiellement utilisés sous hotte ou en circuit fermé afin d'éviter toute vaporisation dans l'atmosphère et respecter ainsi les valeurs d'émission établies.

Après l'analyse chromatographique, les mélanges de solvants obtenus peuvent être régénérés par différents procédés parmi lesquels la distillation et l'incinération sont les plus utilisés. Nous avons vu antérieurement que le mélange EtOH – EtOAc est azéotrope. De la même manière, les mélanges EtOH-Eau et MeCN-Eau sont azéotropes, leur séparation par distillation simple étant difficile. Capello *et al.* [37] ont réalisé une ample étude concernant les options de traitement pour les solvants « usagés ». Ils ont développé un logiciel capable d'identifier la meilleure modalité de traitement des mélanges de solvants selon leurs composants. Ainsi, ils proposent qu'un mélange contenant de l'acétate d'éthyle soient plutôt soumis à la distillation alors qu'un mélange contenant des alcools peut être soit distillé soit incinéré. Dans la seconde partie de leur étude [38] ces chercheurs ont présenté une liste des solvants pour lesquels, à partir d'un certain rendement de récupération, la distillation est plus avantageuse pour l'environnement par rapport à l'incinération. De plus, ils proposent un schéma pouvant servir au choix de la méthode de traitement des solvants usagés en fonction de la composition du mélange.

### IV. 4. 3. Traitement des mélanges de réactifs

Les **MELANGES DES REACTIFS** contenant des traces de molécules bioactives obtenus lors des tests d'activité biologique doivent aussi être traités avec beaucoup de précaution surtout sachant qu'il existe la possibilité qu'ils contiennent des traces des métaux tels que le sodium et le tungstène (Test de Folin-Ciocalteu) ou l'aluminium (existant dans le chlorure d'aluminium utilisé pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux des extraits de résidus de pommes et de leurs fractions).

Comme dans le cas des solvants usagés, le traitement de ces mélanges de réactifs se réalise par des sociétés spécialisées.

Les mélanges de réactifs peuvent être, selon leur constitution, incinérés ou soumis à des traitements chimiques. A titre d'exemple, une des méthodes chimiques les plus utilisées est l'oxydation de type Fenton. Celle-ci se déroule en milieu acide et est basée sur la génération de radicaux libres ayant un potentiel d'oxydation élevé. Les radicaux libres peuvent être piégés dans les réactions avec les ions  $Fe^{2+}$  ou avec le peroxyde d'hydrogène ou ils peuvent déclencher des réactions en chaîne avec autres composés chimiques [39]. Benatti *et al.* ont [40] utilisé ce type d'oxydation pour le traitement des réactifs chimiques résiduels du laboratoire. Leurs résultats indiquent le fait que par l'intermédiaire de ce processus il est possible d'éliminer au maximum la demande chimique d'oxygène et de réduire, dans le même temps, la quantité de boue obtenue.

### IV. 4. 4. Traitement des eaux usées

Les eaux usées obtenues pendant le processus de récupération des principes actifs à partir de fruits ou de résidus de fruits proviennent surtout des étapes de lavage et hygiénisation des équipements et sont susceptibles de contenir des matériels organiques, des particules en suspension, des agents de nettoyage etc.

Ces eaux entrent dans le circuit d'épuration local et arrivent ensuite dans l'émissaire d'où elles sont réintroduites dans la consommation quotidienne.

Le traitement des eaux usées se réalise après avoir établi par l'intermédiaire de leurs analyses physico-chimiques et biologiques, leurs caractéristiques (composition chimique, turbidité, acidité ou alcalinité, présence des microorganismes pathogènes, des métaux etc.). Ce traitement peut impliquer des processus physiques, chimiques et biologiques [41] et peut comporter plusieurs étapes. Conformément à la description réalisée par Bolzonella *et al.* [42] ces étapes sont :

1. le traitement préliminaire :
  - assure l'élimination des matériels grossiers et de petite taille ;
  - se déroule avec une efficacité variable ;
2. l'égalisation des débits :
  - se réalise entre l'étape d'élimination des matériels grossiers et celle d'élimination des matériels en suspension ;
  - permet la stabilisation du débit ;
3. la sédimentation primaire :
  - permet l'élimination des solides en suspension ;
  - assure l'élimination de jusqu'à 60% de la demande chimique d'oxygène (DCO) ;
4. l'ajustement du pH :
  - nécessaire pour les étapes de traitement biologique qui se déroulent généralement à un pH neutre ;
5. le traitement biologique :

- inclut des processus anaérobies, d'aération extensive, de filtration bactérienne et se finalise par épandage ;
- 6. le traitement par procédés membranaires :
  - peut inclure microfiltration, ultrafiltration et osmose inverse ou autres processus chimiques et physiques (traitement par charbon actif, précipitation etc.) capables d'assurer l'élimination des polluants et d'améliorer les caractéristiques de l'eau.

Le traitement des effluents aqueux doit conduire à l'obtention d'eaux pouvant être déversées dans l'émissaire sans affecter les êtres vivants du milieu aquatique. Par conséquent, il est nécessaire que les caractéristiques de l'eau respectent les normes réglementaires présentées dans la directive 1991/271/CEE [43]. Cette directive stipule que :

- la demande biochimique en oxygène (DBO5 à 20°C) sans nitrification doit être de 25 mg.L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> ;
- la demande chimique en oxygène (DCO) doit être de 125 mg.L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> ;
- la teneur totale des matières solides en suspension ne doit pas dépasser 35 mg.L<sup>-1</sup>.

## CONCLUSIONS

Nous avons présenté dans ce dernier chapitre une étude théorique concernant le management du processus de récupération de molécules biologiquement actives à partir de fruits ou de résidus de fruits.

Ce chapitre a débuté par l'examen de nos travaux de recherche dans le contexte du *développement durable*. Nous avons repris ensuite brièvement les étapes nécessaires pour le déroulement du processus et nous avons mis en évidence les *polluants* possibles afin de déterminer quels sont les principaux *aspects environnementaux* pouvant affecter la qualité de l'air, de l'eau, du sol et de la santé humaine.

Après avoir identifié ces aspects, nous avons procédé à leur *évaluation* à base des critères suivants :

- existence des dispositions législatives et de réglementation ;
- évaluation de niveau du risque ;
- implications des aspects de santé ;
- implications écologiques sur l'environnement ;
- problèmes de la communauté et du milieu local.

Cette évaluation nous a permis de mettre en évidence *4 aspects environnementaux* ayant un impact significatif sur l'environnement :

1. les résidus végétaux provenant des étapes d'extraction, centrifugation, filtration ;
2. la phase mobile chromatographique contenant des solvants (MeOH, MeCN, iPrOH, EtOAc, acétone, chloroforme), de l'eau et des acides organiques (acide formique, HOAc, TFA), composés bioactifs) provenant du processus d'analyse des extraits et de leurs fractions ;
3. le mélange de réactifs usés obtenus après les tests d'activité biologique ;
4. les eaux usées contenant des matières organiques solubles et des particules solides en suspension (résidus de produits, agents de nettoyage) obtenues lors du nettoyage et d'hygiénisation des équipements et des surfaces de travail.

La *quantification de l'impact* des aspects environnementaux a été réalisée en utilisant la *Méthode de l'indice globale de pollution*.

La dernière partie de ce chapitre a été consacrée aux *possibilités de traitement* des résidus végétaux, des mélanges de solvants et de réactifs et des eaux usées.

Après avoir réalisé cette étude et selon le résultat obtenu après l'application de la Méthode de l'indice globale de pollution (IPG = 1,53) nous pouvons conclure que le déroulement des étapes nécessaires pour la récupération des principes actifs de fruits ou de résidus de fruits peut affecter l'environnement dans les limites admissibles.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Organisation des Nations Unies. *Conférence des Nations Unies sur l'Environnement*. **1972**.
2. Organisation des Nations Unies. *Action plan for the human environment*. **1972**.
3. Commission Mondiale sur l'Environnement et le Développement. *Rapport Brundtland « Notre avenir à tous »*. **1987**.
4. Organisation des Nations Unies. *Déclaration de Rio sur l'environnement et le développement*. **1992**.
5. Organisation des Nations Unies. *Agenda 21 - The United Nations Programme of Action from Rio*. Sommet "Planète Terre. **1992**.
6. Organisation des Nations Unies. *Déclaration de Johannesburg sur le Développement Durable*. **2002**.
7. Organisation des Nations Unies. *Rapport du Sommet mondial pour le développement durable, Johannesburg*. **2002**.
8. Organisation des Nations Unies. *Rio +20 - Conférence des Nations Unies sur le développement durable, Rio de Janeiro, Brésil*. **2012**.
9. Pap, N., Pongracz, E., Myllykoski, L., Keiski, R. *Waste minimization and utilization in the food industry: Processing of arctic berries, and extraction of valuable compounds from juice-processing by-products*. Proceedings of the Waste Minimization and Resources Use Optimization Conference. **2004**, 159-168.
10. International Organization for Standardisation. *EN ISO 14001. Environmental management systems - Requirements with guidance for use, in TC 207. Environmental Management*. **2004**.
11. International Organization for Standardisation. *EN ISO 14050. Environmental management - Vocabulary, in TC 207. Environmental management*. **2009**.
12. Panainte, M., Nedeff, V., Măcărescu, B., Moşneguţu, E. *Studiul impactului ecologic. Note de curs. Îndrumar de laborator. Îndrumar de proiect*. **2007**, Alma Mater, Bacău, Roumanie.
13. Rojanschi, V. *Posibilităţi de evaluare globală a impactului poluării asupra calităţii ecosistemelor*. Mediul Înconjurător. **1991**, II (1-2), 45-52.
14. Robu, B., Macoveanu, M. *Evaluări de mediu pentru dezvoltarea durabilă*. **2010**, Editura Ecozone, Iasi.
15. Zaharia, C., Suteu, D., Macoveanu, M. *Environmental impact assessment for a unit of food aromas and essences production using the global pollution index*. Romanian Biotechnological Letters. **2010**, 15 (5), 5553-5558.
16. Durán-Valle, C.J., Gómez-Corzo, M., Gómez-Serrano, V., Pastor-Villegas, J., Rojas-Cervantes, M.L. *Preparation of charcoal from cherry stones*. Applied Surface Science. **2006**, 252 (17), 5957-5960.
17. Olivares-Marín, M., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. *Preparation of activated carbon from cherry stones by physical activation in air. Influence of the chemical carbonisation with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. **2012**, 94 (0), 131-137.
18. Olivares-Marín, M., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. *Preparation of activated carbons from cherry stones by activation with potassium hydroxide*. Applied Surface Science. **2006**, 252 (17), 5980-5983.
19. Olivares-Marín, M., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. *Preparation of activated carbon from cherry stones by chemical activation with ZnCl<sub>2</sub>*. Applied Surface Science. **2006**, 252 (17), 5967-5971.

20. Durán-Valle, C.J., Gómez-Corzo, M., Pastor-Villegas, J., Gómez-Serrano, V. *Study of cherry stones as raw material in preparation of carbonaceous adsorbents*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. **2005**, 73 (1), 59-67.
21. Jaramillo, J., Gómez-Serrano, V., Álvarez, P.M. *Enhanced adsorption of metal ions onto functionalized granular activated carbons prepared from cherry stones*. Journal of Hazardous materials. **2009**, 161 (2-3), 670-676.
22. Olivares-Marín, M., Del Prete, V., Garcia-Moruno, E., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. *The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine*. Food Control. **2009**, 20 (3), 298-303.
23. Olivares-Marín, M., Fernández, J.A., Lázaro, M.J., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V., Stoeckli, F., Centeno, T.A. *Cherry stones as precursor of activated carbons for supercapacitors*. Materials Chemistry and Physics. **2009**, 114 (1), 323-327.
24. Berg, L., Yeh, A.-I., Ratanapuech, P. *The recovery of ethyl acetate by extractive distillation*. Chemical Engineering Communications. **1985**, 39 (1-6), 193-199.
25. Berg, L., *Separation of ethyl acetate from ethanol by azeotropic distillation*. 1999: Etats Unis d'Amérique.
26. Sato, K., Sugimoto, K., Nakane, T. *Separation of ethanol/ethyl acetate mixture by pervaporation at 100–130°C through NaY zeolite membrane for industrial purpose*. Microporous and Mesoporous Materials. **2008**, 115 (1-2), 170-175.
27. Boust, C. *Fiche solvants. Les alcools*. Institut National de Recherche et Sécurité **2009**, ED (4225), 1-6.
28. *Methanol. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2009**, FT (5), 1-8.
29. Bonnard, N., Falcy, M., Jargot, D., Pasquier, E. *Ethanol. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2011**, F (48), 1-8.
30. Bonnard, N., Brondeau, M.-T., Jargot, D., Malard, S., Schneider, O., Serre, P. *Propan-2-ol. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2009**, FT (66), 1-10.
31. Bonnard, N., Brondeau, M.-T., Falcy, M., Jargot, D., Schneider, O., Serre, P. *Butan-1-ol. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2011**, FT (80), 1-7.
32. Bonnard, N., Brondeau, M.-T., Falcy, M., Protois, J.C., Schneider, O. *Acétonitrile. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2004**, FT (104), 1-7.
33. Bonnard, N., Falcy, M., Jargot, D., Miraval, S., Schneider, O. *Acide formique. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2011**, FT (149), 1-8.
34. Brondeau, M.-T., Jargot, D., Nikolova-Pavageau, N., Schneider, O. *Acide acétique. Fiche toxicologique*. Institut National de Recherche et Sécurité. **2011**, FT (24), 1-8.
35. *Acide trifluoroacétique. Fiche de données de sécurité*. Acros Organics. **2009**, 1-9.
36. Conseil Européen. *Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations*. Journal Officiel des Communautés européennes. **1999**, L (85), 1-22.
37. Capello, C., Hellweg, S., Badertscher, B., Betschart, H., Hungerbuhler, K. *Environmental assessment of waste-solvent treatment options. Part I: The Ecosolvent Tool*. Journal of Industrial Ecology. **2007**, 11 (4), 26-38.
38. Capello, C., Hellweg, S., Hungerbuhler, K. *Environmental assessment of waste-solvent treatment options. Part II: General rules of thumb and specific recommendations*. Journal of Industrial Ecology. **2008**, 12 (1), 111-127.



39. Neyens, E., Baeyens, J. *A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique*. Journal of Hazardous Materials. **2003**, 98 (1-3), 33-50.
40. Benatti, C.T., Tavares, C.R.G., Guedes, T.A. *Optimization of Fenton's oxidation of chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology*. Journal of Environmental Management. **2006**, 80 (1), 66-74.
41. Woodard, F. *Industrial waste treatment handbook*. **2001**, Butterworth–Heinemann, Etats Unis d'Amérique.
42. Bolzonella, D., Cecchi, F., Pavan, P., *Treatment of food processing wastewater*, in *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*. , Waldron, K. **2007**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Angleterre.
43. Conseil Européen. *Directive 1991/271/CEE du Conseil du 21 mai 1991 relative aux traitements des eaux urbaines résiduaires*. Journal Officiel de l'Union européenne. **1991**, L (135), 40-42.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES





## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les fruits constituent un des éléments principaux pour une alimentation équilibrée. Ils sont consommés frais ou sous formes de différents produits obtenus après certaines transformations. Les importantes quantités de résidus issus de ces processus sont facilement dégradables et peuvent contribuer à l'augmentation de taux de pollution de l'environnement.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont visé :

- le choix de certaines sources végétales riches en principes actifs et des méthodes appropriées pour l'extraction, l'analyse et la purification de ces composés bioactifs ;
- le développement des méthodes de récupération de molécules bioactives de fruits et de résidus de fruits par l'utilisation des techniques d'extraction non-énergivores nécessitant des faibles volumes de solvants ;
- l'analyse des extraits obtenus afin d'identifier les composés bioactifs extraits et de confirmer leurs structure ;
- à faciliter la séparation des différentes familles de composés extraites de fruits et de résidus de fruits par l'intermédiaire des méthodes de fractionnement adéquates ;
- l'étude des extraits et des fractions obtenues afin de déterminer l'existence des activités antioxydantes et (le cas échéant) les possibles effets synergiques ;
- le management du processus d'extraction de principes actifs.

Les conclusions générales formulées par l'interprétation des résultats obtenus pendant les travaux de recherche déroulés sont présentées par la suite.

**Concernant l'étude bibliographique réalisée** nous pouvons conclure que :

- la transformation des fruits conduit à l'obtention de quantités importantes de sous-produits qui peuvent être facilement utilisés dans différents domaines tels que l'alimentation des animaux, la fertilisation du sol ou la production des agro combustibles ;
- les fruits constituent une source riche de composés bioactifs qui se retrouvent aussi en partie dans les résidus obtenus après leur transformation.

**Deux sources végétales ont été choisies** pour la récupération des molécules bioactives : *les fruits du cerisier* et *les résidus de quatre variétés de pommes* différentes (Royal Gala, Golden, Granny Smith et Pink Lady) car ces deux sources sont produites en quantité importantes aussi bien dans la Région Centre de France que dans la région roumaine de Moldavie.

*Les cerises* sont riches en composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes dont les anthocyanines sont les plus connus. Ces composés sont reconnus pour leur activité antioxydante et pour leurs effets bénéfiques dans le processus de prévention et de traitement de différentes maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives, de certains types de cancer etc.

*Les résidus de pommes* contiennent également des composés phénoliques mais aussi des composés triterpéniques. Cette dernière classe de composés est beaucoup moins étudiée et présente surtout des effets anti-inflammatoires, antibactériens, antioxydants etc. ce qui la rend utile dans le traitement de diverses maladies.

Conformément à l'étude bibliographique réalisée :

- la récupération des composés bioactifs présents dans les sources végétales ciblées est basée, en général, sur l'utilisation de méthodes classiques telles que la macération réalisée à l'aide de différents solvants dont quelques-uns sont toxiques, les plus couramment indiqués étant les solvants polaires ;
- parmi les méthodes d'analyses mentionnées dans la littérature, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à différents types de détecteurs tels que l'UV, le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) ou le spectromètre de masse (MS) est la plus fréquente.

**Concernant la mise au point des méthodes d'extraction, d'analyse et de fractionnement des molécules d'intérêt biologique à partir de fruits et de sous-produits de l'industrie de transformation des fruits,** nous pouvons dégager les conclusions suivantes:

- une méthode d'extraction « verte » a été développée pour l'extraction des *composés bioactifs de cerises* ;
  - cette méthode n'utilise aucun solvant d'extraction ; elle est basée sur l'effet de l'irradiation électromagnétique sur le teneur élevée en eau constitutive des cerises ;
  - les conditions optimales d'extraction ont été les suivantes : quantité de matériel de départ :  $\approx$  50 g de cerises, puissance microondes : 1000 W, durée de l'extraction : 45 s par cycle d'extraction, nombre de cycles d'extraction : 4 ;
  - grâce à l'utilisation de l'extraction sans solvants assistée par microondes, l'extrait de cerises récupéré est déjà concentré et directement utilisable ;
  - pour conserver les composés bioactifs présents dans cet extrait la lyophilisation semble être un mode de séchage adéquat ;
  - une méthode d'analyse par HPLC-UV-DEDL a été mise au point ; elle nous a permis d'identifier plusieurs familles de composés phénoliques dont les anthocyanines ;
  - pour purifier les anthocyanines deux méthodes différentes ont été utilisées : la chromatographie de partage centrifuge (CPC) et l'HPLC semi préparative (CSP) ;
    - ✓ la *CPC* nous a conduits à la récupération de plusieurs tubes qui ont été regroupés (après avoir été analysés par HPLC) en 4 grandes fractions ;
    - ✓ cette méthode a nécessité l'utilisation de volumes importants de solvants dont quelques-uns toxiques et non miscibles à l'eau ;
    - ✓ elle s'est avérée longue et a entraîné une dégradation des composés d'intérêt ;
    - ✓ en revanche, la purification des anthocyanines des extraits bruts de cerises a été convenablement réalisée par *CSP* à l'aide d'une nouvelle méthode basée sur l'emploi d'une phase mobile constituée de solvants biodégradables (éthanol : eau, acidifiés avec 1% d'acide formique). Une bonne séparation des composés d'intérêt a été obtenue et 3 fractions différentes ont été récupérées. Le fait d'avoir travaillé en mode isocratique nous a permis d'utiliser en « boucle fermée » la phase mobile lorsqu'elle ne contient pas de composés bioactifs, ce qui a contribué à une diminution considérable des volumes des solvants nécessaires ; cette méthode de purification a conduit à la récupération de 1,3 mg de cyanidine-3-*O*-glucoside et de 2,5 mg de cyanidine-3-*O*-rutinoside à partir de 200 mg d'extrait brut; la pureté de ces composés a été supérieure à 97% ;
  - l'identification de ces deux anthocyanines a été réalisée par injection de ces 2 fractions en spectrométrie de masse ;

- la récupération de *composés bioactifs de résidus de pommes* est un processus plus complexe que celui de récupération des anthocyanines de cerises ;
  - les résidus de pommes sont facilement dégradables ; une étape de séchage est donc nécessaire ;
  - deux techniques différentes ont été testées dans ce but : la lyophilisation et la zéodratation ; cette dernière a été utilisée pour la première fois pour la conservation de résidus de pommes et nos résultats montrent qu'elle peut être une alternative à la lyophilisation vu qu'elle ne nécessite pas d'étape préliminaire de congélation et qu'elle est beaucoup moins longue ;
  - l'extraction de composés bioactifs de résidus de pommes a été réalisée par 4 méthodes différentes : la macération (M), l'extraction par solvant pressurisé (ASE), l'extraction assistée par ultrasons (USAÉ) et l'extraction assistée par microondes (MWAE) ; les résultats de nos recherches montrent qu'aucune de ces techniques n'est sélective d'une certaine famille de molécules donnée ; par conséquent nous avons considéré approprié d'utiliser la MWAE, plus rapide, comme technique d'extraction générique ;
    - ✓ différents solvants ont été testés : éthanol (EtOH), acétate d'éthyle (EtOAc), mélanges méthanol : eau (MeOH : eau) et EtOH : EtOAc. L'EtOH est capable d'extraire des composés de polarités variées (des sucres aux composés triterpéniques) et l'EtOAc permet d'extraire préférentiellement les composés phénoliques et triterpéniques ;
    - ✓ une optimisation de la MWAE a conduit aux conditions d'extraction suivantes : solvant EtOAc, puissance microondes : 700 W, nombre de cycles d'extraction : 3 ; durée d'un cycle : 30 s ;
  - les extraits de résidus de pommes ont été analysés en vue de l'identification des différentes familles de composés contenues ;
    - ✓ des informations générales ont été obtenues par l'intermédiaire de la chromatographie haute performance sur couche mince (HPTLC) ;
    - ✓ trois méthodes chromatographiques ont été développées : par HPLC sur une phase stationnaire de silice C18, et sur une phase stationnaire type carbone graphitique poreux (PGC) et la 3<sup>ème</sup> par chromatographie en phase supercritique (SFC) ;
    - ✓ l'analyse sur la colonne de silice C18 a permis l'identification de plusieurs composés phénoliques par comparaison de leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption en UV avec ceux de composés standards ;
    - ✓ l'analyse sur la colonne PGC a conduit à l'identification de certains composés triterpéniques ;
    - ✓ la méthode d'analyse par SFC a permis de détecter la présence d'autres composés triterpéniques qui étaient coélulés lors de l'analyse PGC ;
  - la plupart des composés ont été identifiés par spectrométrie de masse et par comparaison de leur spectre de masse avec les données existant dans la littérature ;
  - pour d'autres composés, des formules brutes ont pu seulement être proposées, leurs identification précise restant à développer ;
  - afin de simplifier les extraits bruts complexes obtenus à partir des résidus de différentes variétés de pommes un fractionnement par extraction liquide-liquide qui nous a permis de récupérer trois fractions : deux organiques (fraction heptane et fraction EtOAc) et une aqueuse ;
  - l'analyse HPLC-RP C18 de ces fractions nous a montré que les composés phénoliques et les composés triterpéniques se partagent entre l'heptane et l'EtOAc

tandis que la fraction aqueuse contient surtout des sucres et de faibles quantités d'acides phénoliques.

**Concernant l'étude des activités antioxydantes des extraits et des fractions** nous pouvons conclure que :

- les extraits bruts et les fractions des extraits de résidus de différentes variétés de pommes ont donné des résultats positifs aux différents tests d'activité antioxydante que nous avons employés et qui nous ont aidés à déterminer :
  - la teneur en composés phénoliques totaux - test Folin-Ciocalteu ;
  - la teneur en flavonoïdes totaux ;
  - l'activité antiradicalaire – test DPPH<sup>•</sup> ;
  - le pouvoir réducteur – test FRAP ;
- les tests cités, réalisés parallèlement sur des solutions standards, montrent que certains composés triterpéniques répondent de la même manière que les composés phénoliques ;
- ces tests chimiques nous ont permis de conclure que les fractions acétate d'éthyle sont les plus riches en composés d'intérêt suivies par les fractions heptane tandis que les fractions aqueuses ne présentent pas d'activité notable.

**Concernant le management du processus d'extraction de principes actifs** l'étude théorique réalisée indique que :

- les polluants qui peuvent apparaître au cours du processus (résidus végétaux, résidus chromatographiques, mélanges de réactifs, eaux usées) sont susceptibles d'affecter la qualité de l'air, de l'eau, du sol et de la santé humaine ;
- diverses méthodes peuvent être utilisées pour le traitement des polluants détectés ;
- le déroulement des étapes que nous avons mis en œuvre pour la récupération des composés bioactifs de fruits ou de résidus de fruits peut affecter l'environnement dans les limites admissibles.

Au vu des résultats obtenus au cours de nos travaux, nous pouvons conclure que les fruits entiers et les résidus issus de leur valorisation en tant que jus de fruits, peuvent constituer des sources riches en composés bioactifs.

**Comme prolongement de nos travaux, des recherches complémentaires pourraient être réalisées :**

- dans le cas de l'étude des *composés bioactifs de cerises*, il serait intéressant :
  - de séparer et quantifier les autres composés phénoliques présents dans les extraits ;
  - de comparer la composition en composés bioactifs de différentes variétés de cerises ;
  - de déterminer l'influence de l'état de maturation de cerises sur les quantités de molécules bioactives contenues ;
- dans le cas de l'étude des *principes actifs de résidus de pommes*, il serait intéressant :
  - d'identifier les autres composés phénoliques et triterpéniques détectés dans les extraits ;
  - de développer une autre méthode de fractionnement permettant de mieux séparer les deux familles de molécules identifiées et peut-être d'isoler et purifier certains composés d'intérêt biologique ;

- généralement, il serait intéressant :
  - d'appliquer les méthodes développées dans le cadre de cette thèse aux autres types de fruits et de sous-produits de l'industrie de la transformation des fruits ;
  - de déterminer d'autres types d'activités (que l'activité antioxydante) telles que : l'activité anti-inflammatoire, antibactérienne etc. ce qui nécessiterait de faire des tests cellulaires et/ou biologiques;
  - de réaliser des extractions de composés bioactifs de fruits et de sous-produits de l'industrie de la transformation des fruits à une plus grande échelle ;
  - de trouver une modalité de valorisation ultérieure des extraits bruts ou des composés purifiés en faisant des tests de formulation puis en les incorporant dans divers produits agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.







## ANNEXES





## ANNEXE 1. SOLVANTS ET STANDARDS UTILISES

Tous les solvants utilisés pour l'extraction et pour la chromatographie (MeOH, EtOH, EtOAc, heptane, MeCN, BuOH, iPrOH) sont de pureté analytique et ont été achetés chez SDS Carlo Erba – France.

L'eau impliquée dans le processus d'extraction et utilisée comme phase mobile en HPLC a été purifiée par un système Elgastat UHQ II (Elga, Anthony, France) à partir d'eau distillée (résistance < 18 M $\Omega$ ).

L'acide formique, l'acide acétique, l'acide trifluoroacétique, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, la catéchine, l'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'érythrodiol ainsi que le radical libre 2,2  $\alpha$ -diphényl-1-picrylhydrazil, le réactif de Folin-Ciocalteu, le sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et l'acide chlorhydrique ont été acquis de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

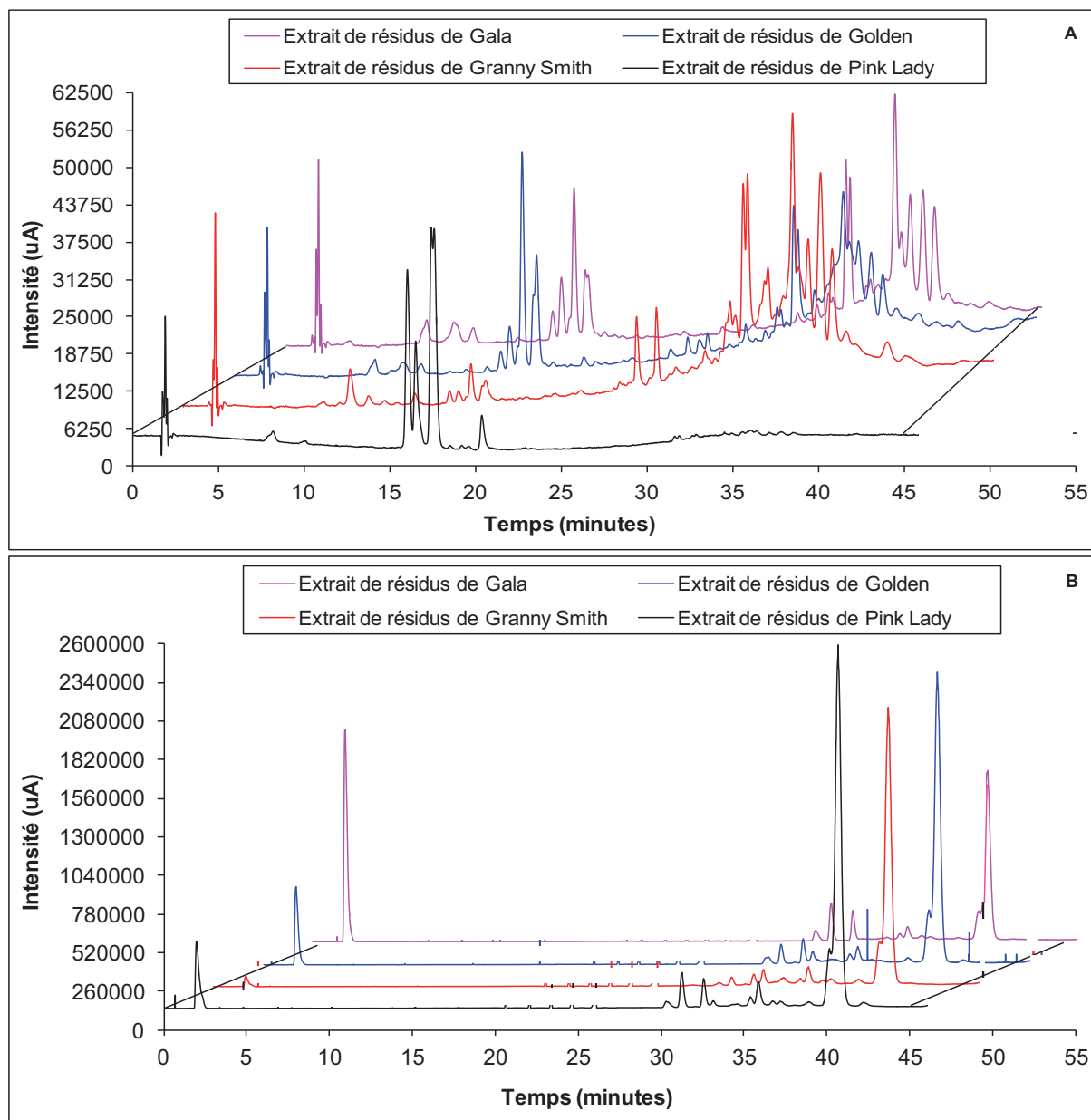
L'acide ursolique, l'uvaol, la rutine, la quercétine, la phloridzine ont été obtenus de chez Extrasynthèse France.

Le chlorure ferrique hexahydraté (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) a été acheté de chez Acros organics (Geel, Belgique).

Le 2,4,6-tripyridyl-S-triazine provient de chez JT Baker Chemicals (Deventer, Hollande).

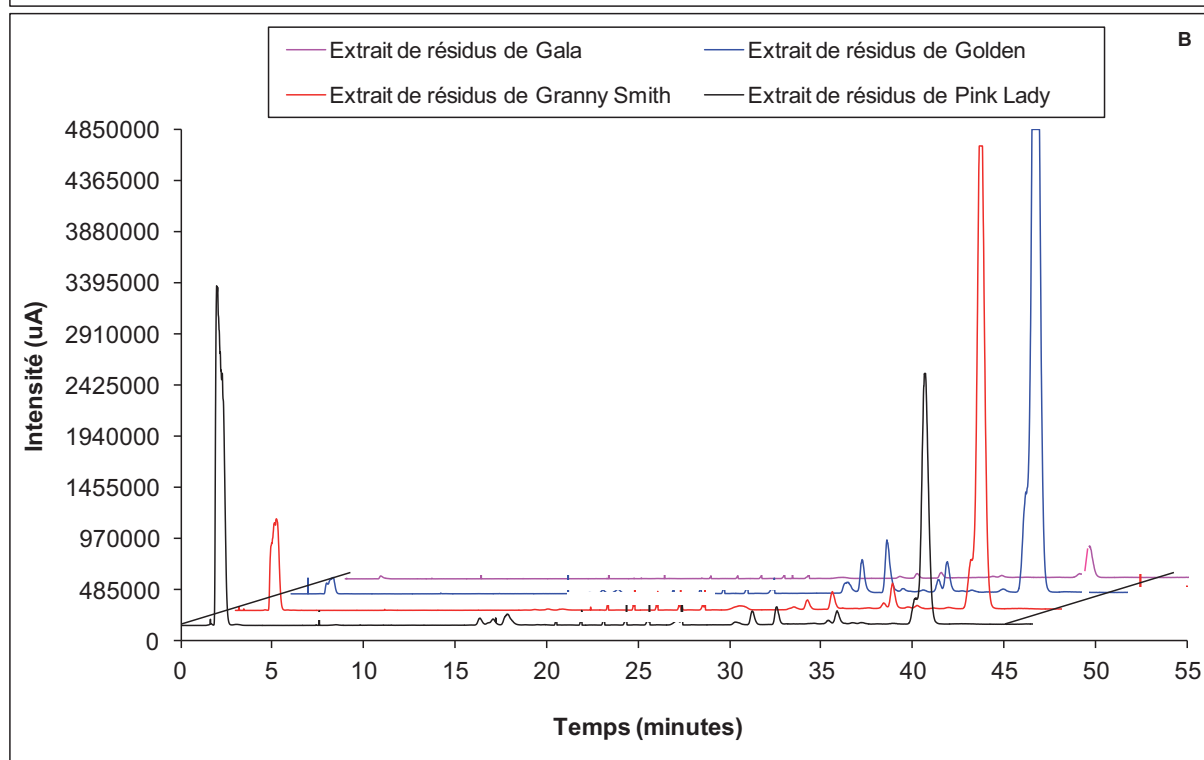
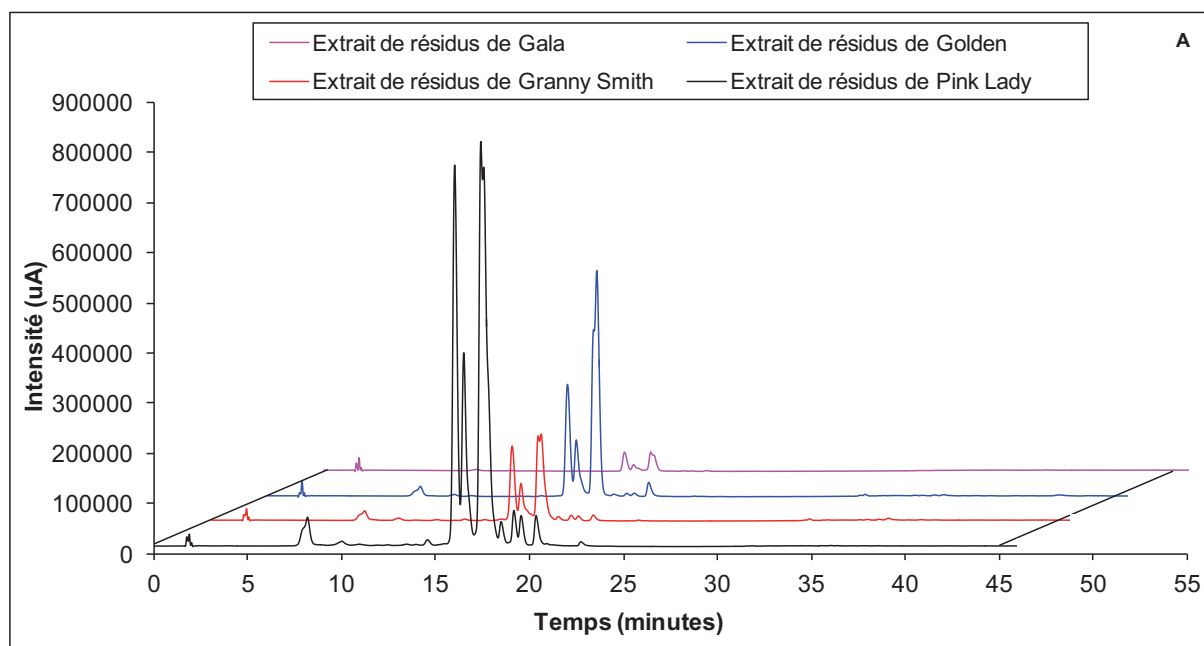
Le carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a été acheté de chez Merck (Val de Fontenay, France).

## ANNEXE 2. ANALYSE HPLC DES EXTRAITS BRUTS DE RESIDUS DE POMMES ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE



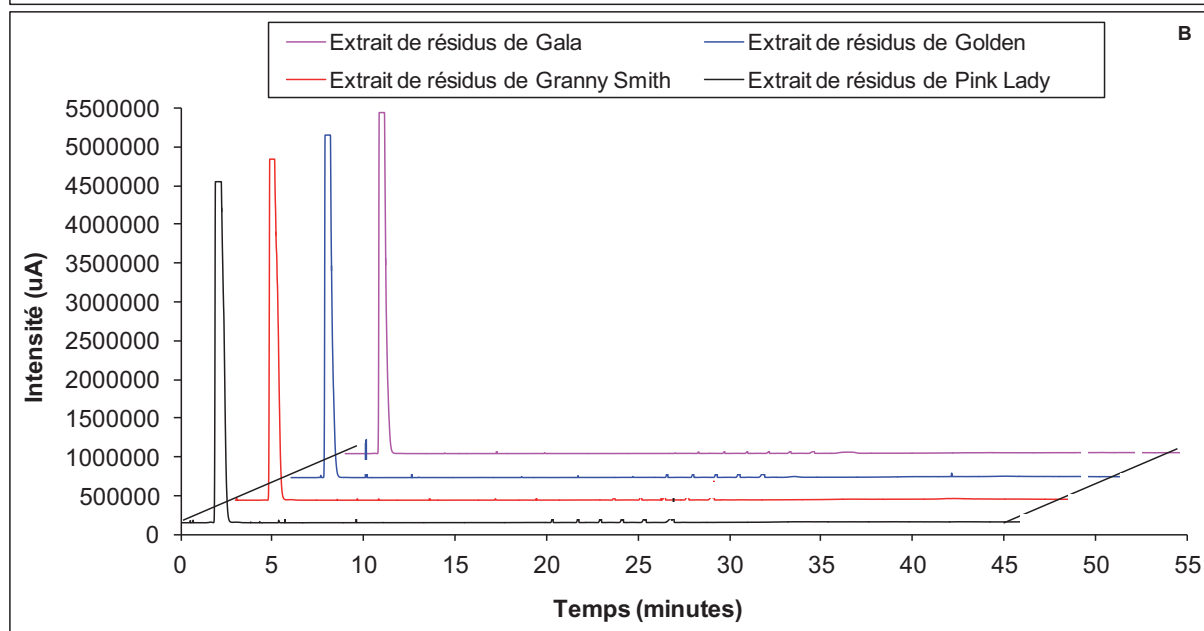
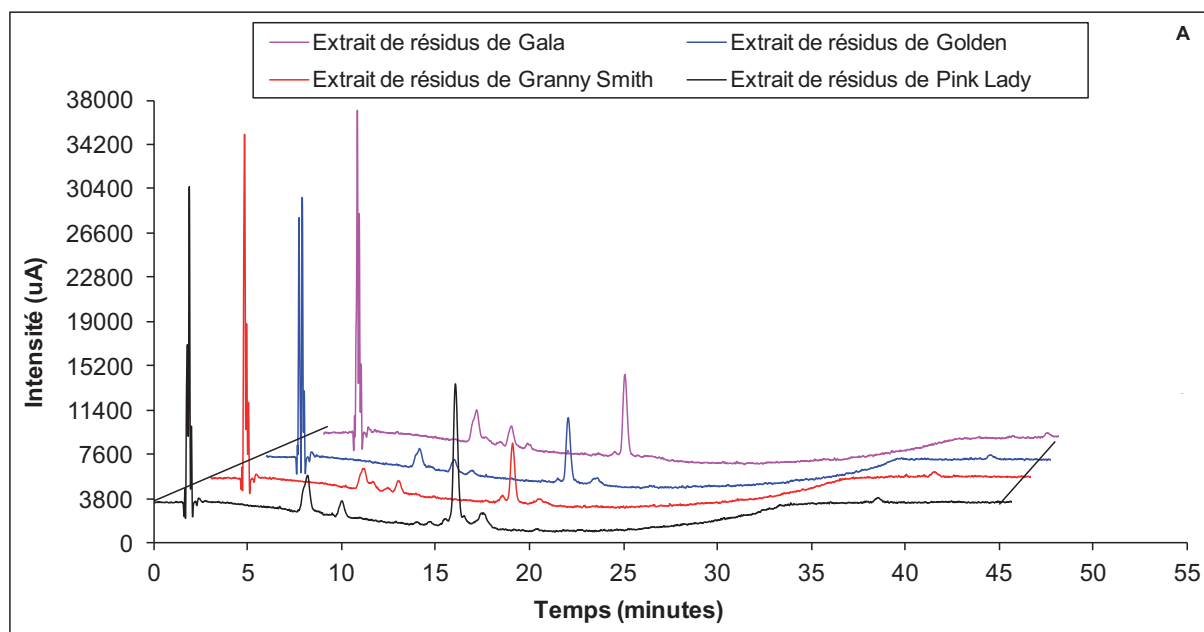
### A. Profil chromatographique des fractions Heptane

Colonne : Pursuit XRs C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5μm) ; Détection : A : UV 280 nm ;  
 B : DEDL : température de nébulisation : 52°C ; pression du gaz nébuliseur : 2,2 bars ; gain : 8  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH ; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)  
 Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B



### B. Profil chromatographique des fractions EtOAc

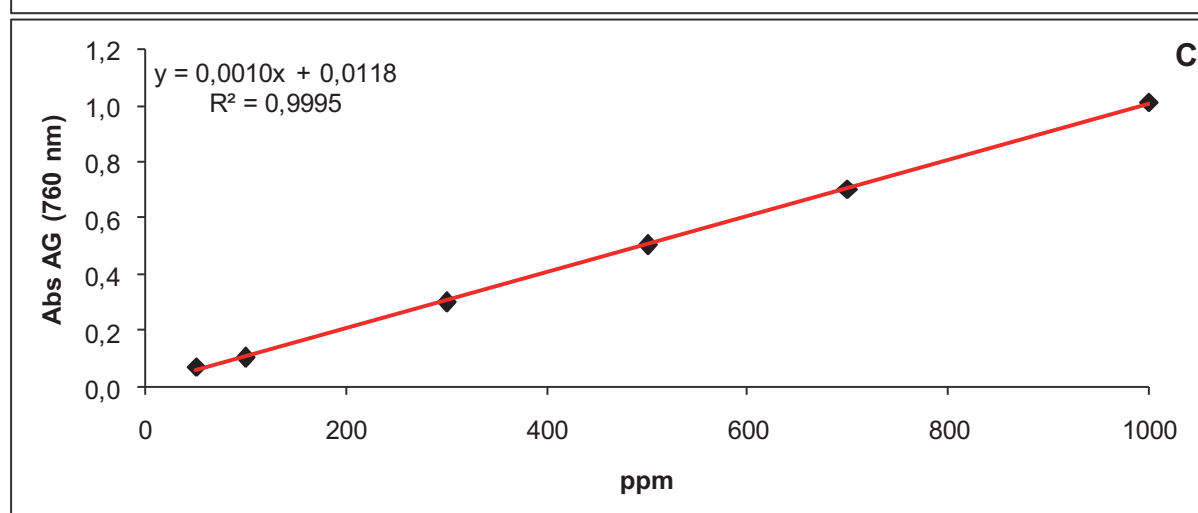
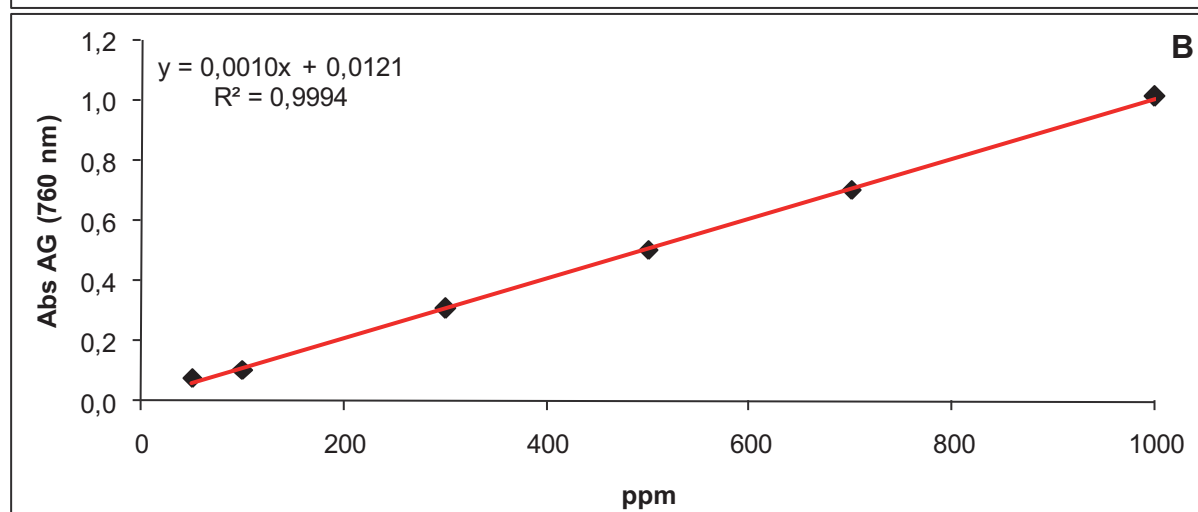
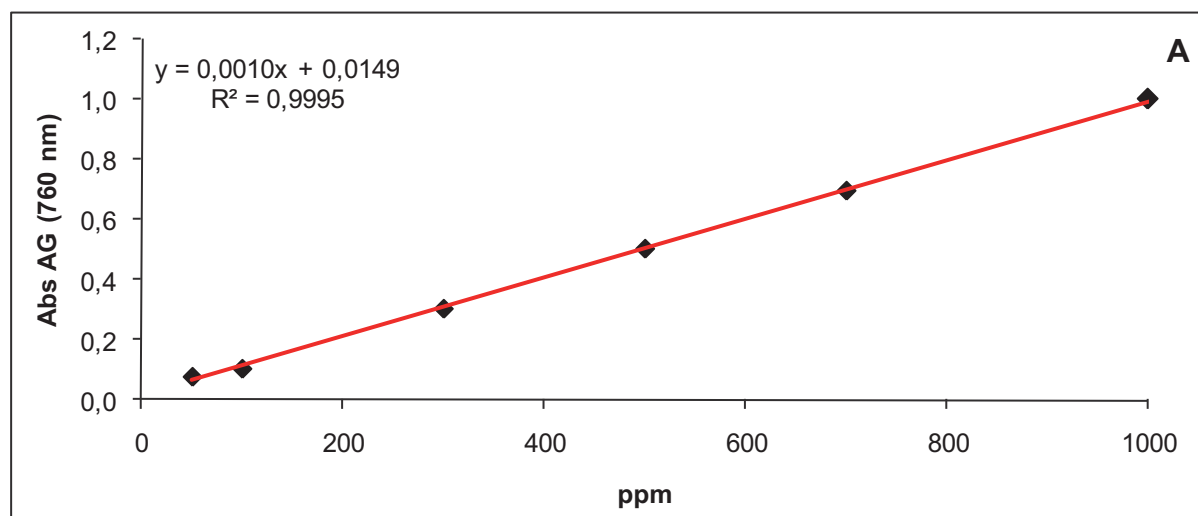
Colonne : Pursuit XRs C18 (Lx $\Phi$  = 150x4,6 mm ; 5 $\mu$ m) ; Détection : A : UV 280 nm ;  
B : DEDL : température de nébulisation : 52°C ; pression du gaz nébuliseur : 2,2 bars ; gain : 8  
Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH ; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)  
Gradient d'éluion : 0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B



### C. Profil chromatographique des fractions H<sub>2</sub>O

Colonne : Pursuit XRs C18 (LxΦ = 150x4,6 mm ; 5μm) ; Détection : A : UV 280 nm ;  
 B : DEDL : température de nébulisation : 52°C ; pression du gaz nébuliseur : 2,2 bars ; gain : 8  
 Phase mobile : A. H<sub>2</sub>O ; B. MeOH les deux acidifiés avec 0,1% HCOOH ; Débit : (1 mL.min<sup>-1</sup>)  
 Gradient d'élution : 0 - 30 min, 20 - 90% B ; 30 - 45 min, 90% B

## ANNEXE 3. DROITES D'ETALONNAGE COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX



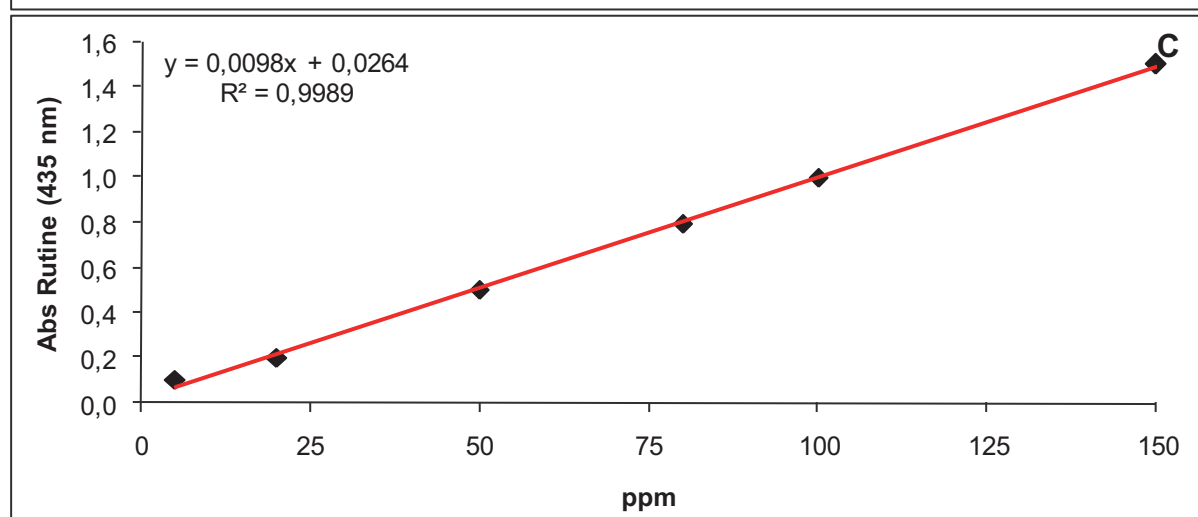
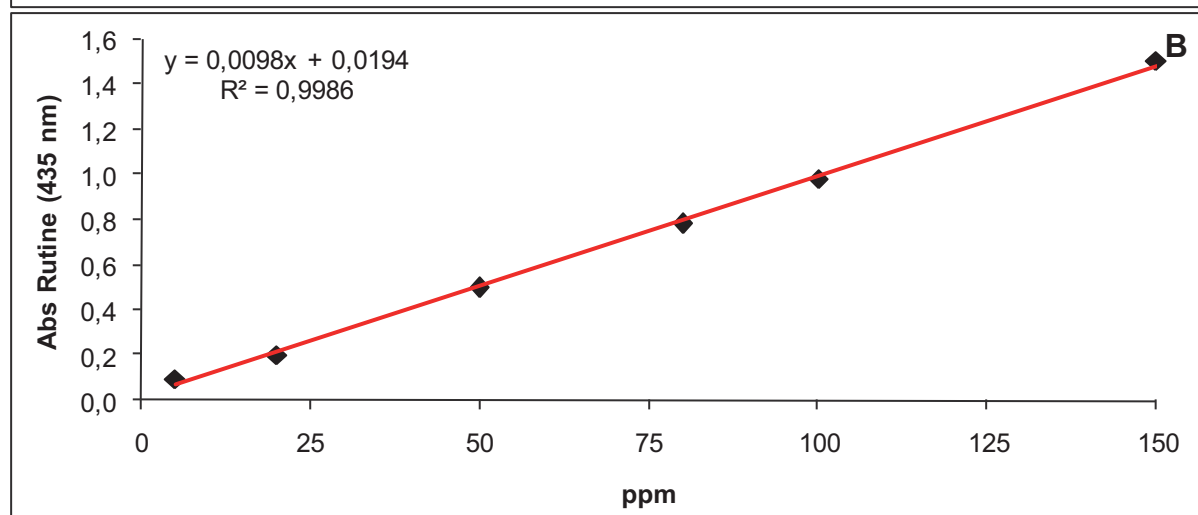
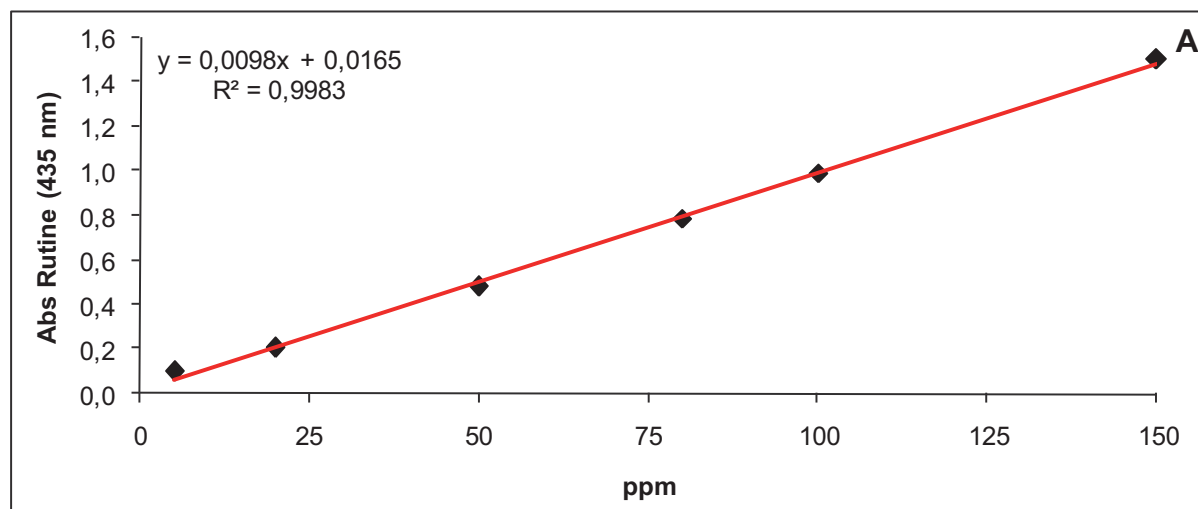
**Droites d'étalonnage (acide gallique) utilisées pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux**

A : standards ; B : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Gala et Golden ;

C : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Granny Smith et Pink Lady



## ANNEXE 4. DROITES D'ETALONNAGE FLAVONOÏDES TOTAUX

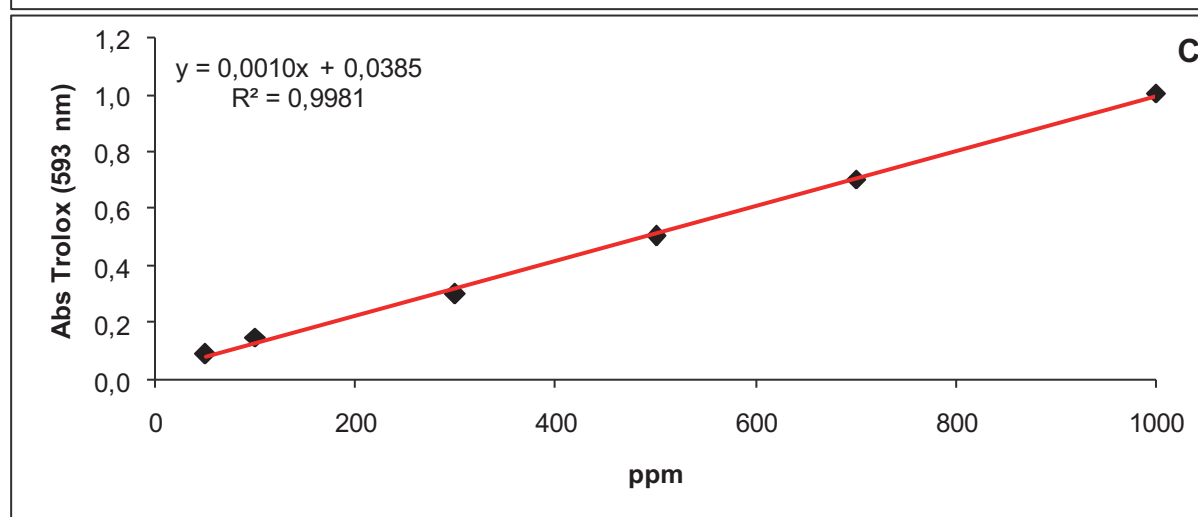
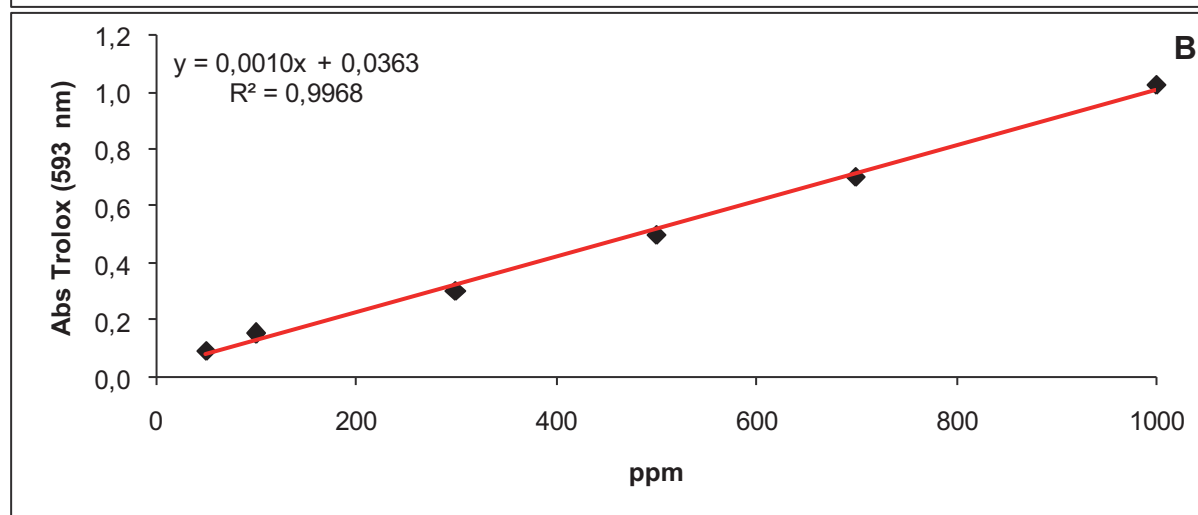
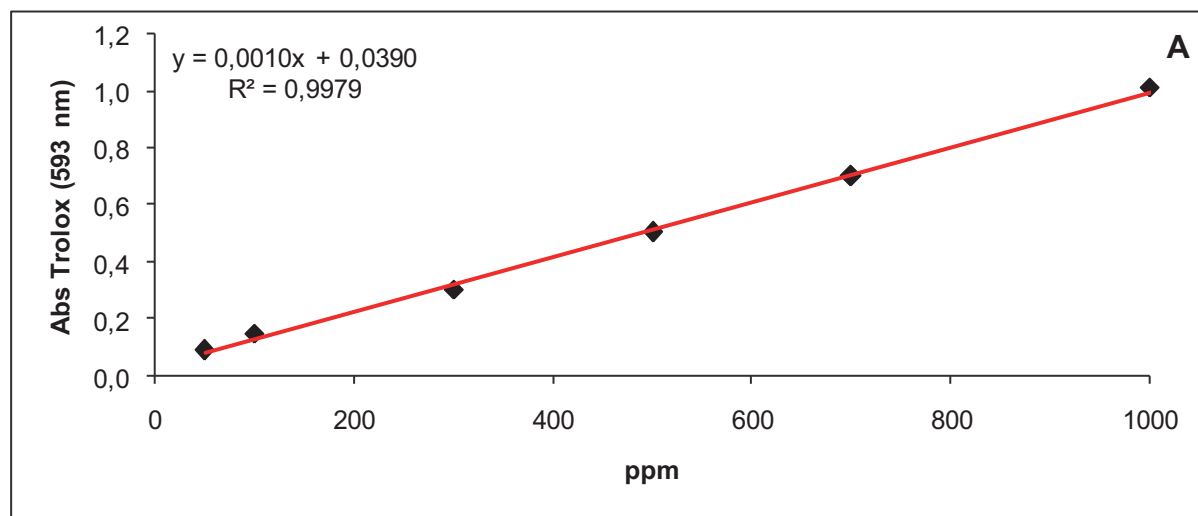


**Droites d'étalonnage (rutine) utilisées pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux**

A : standards ; B : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Gala et Golden ;

C : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Granny Smith et Pink Lady

## ANNEXE 5. DROITES D'ETALONNAGE FRAP



### Droites d'étalonnage (trolox) utilisées pour déterminer le pouvoir réducteur

A : standards ; B : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Gala et Golden ;

C : extraits et fractions d'extrait de résidus de pommes Granny Smith et Pink Lady

## ANNEXE 6. COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES REALISEES DURANT LA THESE

### Publications (P)

- P 1.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Lazăr, G., Elfakir, C.: *Apple by-products as a source of bioactive compounds*. Molécules et Ingrédients Santé, **2011**, 3-13.
- P 2.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Lazăr, G., Elfakir, C.: *Bioactive compounds extraction from pomace of four apple varieties*. Journal of Engineering Studies and Research, **2012**, 18 (1), 96-103.
- P 3.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Zubrzycki, S., Elfakir, C.: *Sweet cherries anthocyanins. An environmental friendly extraction and purification method*. Separation and Purification Technology, **2012**, 100, 51-58.
- P 4.** Lesellier, E., Destandau, E., Grigoras, C.-G., Fougère, L., Elfakir, C.: *Development of a separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector (SFC/ELSD)*. Accepté en septembre **2012** pour publication au Journal of Chromatography A.
- P 5.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Fougère, L., Elfakir, C.: *Assessment of extraction and analysis of bioactive compounds from apple pomace* – en préparation pour Journal of Food Composition and Analysis.

### Communications orales (CO)

- CO 1.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Zubrzycki, S., Elfakir, C.: *Séparation verte de molécules rouges*. AfSep – Club Ile de France : Journée de la Chimie Verte, Mai **2011**, Paris, France.
- CO 2.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Lazăr, G., Elfakir, C.: *Apple by-products as a source of bioactive compounds*. 4<sup>ème</sup> Colloque International « Molécules et Ingrédients Santé », 24-26 Mai **2011**, Quimper, France.
- CO 3.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Elfakir, C.: *Valorisation de résidus de pommes : recherche de molécules bioactives*. 7<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA, 27-29 Juin **2012**, Bacău, Roumanie.
- CO 4.** Fougère, L., Destandau, E., Grigoraş, C.-G., Lesellier, E., Elfakir, C.: *Développements méthodologiques : stratégie et caractérisation de métabolites secondaires dans les résidus de pommes*. JFSM 2012, 29<sup>èmes</sup> journées françaises de Spectrométrie de Masse, 17-20 Septembre **2012**, Orléans, France.

### Communications par affiches (CA)

- CA 1.** Grigoraş, C.-G., Destandau, E., Fînar, A., Elfakir, C.: *Analysis of sweet cherries antioxidant content*. Euroanalysis 2009, 6-10 Septembre **2009**, Innsbruck, Autriche.
- CA 2.** Grigoraş, C.-G., Gavrilă, L., Fînar, A., Lazăr, G., Elfakir, C.: *Etudes et recherches concernant la valorisation des sous-produits d'origine végétale*. Atelier Franco-Roumain. Promotion de la Chimie Verte, 6-7 Juillet **2010**, Orléans, France.

- CA 3.** Grigoraș, C.-G., Destandau, E., Zubrzycki, S., Elfakir, C.: *Obtention d'anthocyanines de cerises. Un procédé vert d'extraction et purification.* 7<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA, 27-29 Juin 2012, Bacău, Roumanie.
- CA 4.** Grigoraș, C.-G., Destandau, E., Elfakir, C.: *Extraction assistée par microondes d'acides triterpéniques de résidus de pommes.* 7<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA, 27-29 Juin 2012, Bacău, Roumanie.
- CA 5.** Destandau, E., Grigoraș, C.-G., Fougère, L., Elfakir, C., Lesellier, E.: *Development of the separation of triterpenoids by Supercritical Fluid Chromatography / Evaporative Light Scattering Detector (SFC/ELSD).* HPLC 2012, 38<sup>th</sup> International Symposium on HPLC and related techniques, 16-21 Juin 2012, Anaheim, Etats Unis d'Amérique.



Cristina-Gabriela GRIGORAȘ

VALORISATION DES FRUITS ET DES SOUS-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE  
TRANSFORMATION DES FRUITS PAR EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS

Les fruits et les sous-produits de l'industrie de transformation des fruits sont obtenus chaque année en quantités importantes partout dans le monde. Les cerises et les résidus de pommes sont parmi les sources végétales les plus riches en composés bioactifs qui sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur l'organisme humain.

Des méthodes appropriées d'extraction (macération, extraction par solvant pressurisé, extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par microondes), d'analyse (HPTLC, HPLC-UV-DEDL, HPLC-MS, SFC) et de fractionnement (CPC, HPLC semi-préparative, extraction liquide-liquide) ont été mises au point pour la récupération, l'identification et la purification des composés bioactifs de cerises (*Prunus avium*) et de résidus de différentes variétés de pommes (Royal Gala, Golden, Granny Smith, Pink Lady).

Les résultats obtenus au cours des travaux de recherches indiquent le fait que ces sources végétales contiennent des composés phénoliques (cerises, résidus de pommes) et des composés triterpéniques (résidus de pommes) qui peuvent être valorisés par incorporation dans différentes formulations alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques etc.

**Mots-clés :** cerises, résidus de pommes, composés phénoliques, composés triterpéniques, zeodratation, lyophilisation, extraction, microondes, ultrasons, macération, solvant pressurisé, HPTLC, HPLC, SFC, CPC, UV, DEDL, MS, activité antioxydante

VALORISATION OF FRUITS AND BY-PRODUCTS FROM FRUITS INDUSTRY  
BY BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION

Fruits and by-products of fruit processing industry are produced annually in large quantities worldwide. Cherries and apple pomace are among the richest plant sources in bioactive compounds that are recognized for their beneficial effects on the human body.

Appropriated methods of extraction (maceration, pressurized solvent extraction, ultrasound-assisted extraction, microwave assisted extraction), analysis (HPTLC, HPLC-UV-ELSD, HPLC-MS, SFC) and fractionation (CPC, HPLC semipreparative, liquid-liquid extraction) have been developed in order to extract, to identify and to purify bioactive compounds of cherry (*Prunus avium*) and pomaces of different apple varieties (Royal Gala, Golden Delicious, Granny Smith, Pink Lady).

The results obtained during the research work indicate that these plant sources contain phenolic compounds (cherry, apple pomace) and triterpenic compounds (apple pomace) that can be used as ingredients for various food, pharmaceutical, cosmetic formulations etc.

**Keywords:** cherry, apple pomace, phenolic compounds, triterpenic compounds, zeodratation, lyophilization, extraction, microwaves, ultrasounds, maceration, pressurized solvent, HPTLC, HPLC, SFC, CPC, UV, ELSD, MS, antioxidant activity

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE (ICOA)  
CNRS FR 2708, UMR-7311, UFR Sciences, Université d'Orléans  
BP 6759, F-45067 Orléans Cedex 2, France



UNIVERSITATEA « VASILE ALECSANDRI » DIN BACĂU  
Facultatea de Inginerie, Școala de Studii Doctorale  
157 Calea Mărășești, 600115 Bacău, Roumanie

