



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée par : **Mahta MOUSAVI**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE – METZ

Discipline : **Chimie Organique**
Spécialité **Phytochimie**

ISOLEMENT DE MÉTABOLITES SECONDAIRES & CARACTERISATION DE COMPOSÉS BIOACTIFS ISSUS DE MATRICES VÉGÉTALES

Soutenance 16 Décembre 2019

Jury

Rapporteurs

Dr. Héla EL FERCHICHI OUARDA (HDR)
Pr. Nicolas NJINTANG-YANOU

Université de Carthage, Tunisie
Université de Ngaoundéré, Cameroun

Examineurs

Pr. Gisèle FINQUENEISEL
Dr. Élie BAUDELAIRE

Université de Lorraine, France
AGRITECH – France

Directeur & Co-Directeur

Pr. Amadou DICKO
Dr. Ali MODARRESSI (HDR)

Université de Lorraine, France
Université de Lorraine, France

REMERCIEMENTS

J'aimerais consacrer ces premières lignes à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ces travaux de recherche.

Je voudrais tout d'abord remercier *Mr. Amadou DICKO* et *Mr. Ali MODARRESSI* d'avoir accepté si gentiment d'être mes directeur et co-directeur de thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury *Mme. Héra EL FERCHICHI OUARDA* et *Mr. Nicolas NJINTANG-YANOU* d'avoir accepté d'être rapporteurs et *Mme. Gisèle FINQUENEISEL* et *Mr. Élie BOUDLAIRE* d'avoir bien voulu être examinateurs de ces travaux de recherche.

Je souhaite remercier la *Région Lorraine*, la société *AGRITECH* et la société *BENSINA NATURAL LIMITED* pour leur soutien financier durant ces quatre années.

Je souhaite remercier *Mr. Olivier PAGES* pour m'avoir accueilli au laboratoire LCP-A2MC.

Merci également à *Sandrine RUP-JACQUES* pour sa gentillesse, son amitié et pour son aide ; ainsi qu'à *Ali ZAITER* pour son aide précieuse pendant ma thèse.

Ensuite j'aimerais remercier *mes parents* et *ma sœur* qui ont accepté mon choix professionnel, m'ont soutenue durant les périodes de doute et de découragement et m'ont encouragée pendant ces ans.

GLOSSAIRE

AA	: Activité antioxydante
ABTS	: Ammonium de l'acide 2, 2' - azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AAPH	: 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride
DPPH	: 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle
EAG/g MS	: Equivalent acide gallique par gramme de matière sèche
EC/g MS	: Equivalent catéchine par gramme de matière sèche
ET/g MS	: Equivalent trolox par gramme de matière sèche
ESI	: Electrospray ionization
FVT	: Flavonoïdes totaux
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
LOD	: Limit of detection
LOQ	: Limit of quantification
LC-MS	: Chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse
m/z	: rapport masse sur charge
NT	: Non tamisé
PDA	: Photodiode array detector
PPT	: Polyphenol totaux
PTC	: Pulvérisation et tamisage différentiel contrôlés
R_f	: Facteur de rétention
ROS	: Reactive oxygen species
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RNS	: Reactive nitrogen species
SIM	: Selected ion monitoring
t_R	: Temps de rétention
TIC	: Total ion current
UV-Visible:	Ultraviolet-visible

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	1
-------------------	---

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. Description botanique.....	6
1.1. Les plantes.....	6
1.1.1. Le fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.).....	6
1.1.1.1. Aspects botaniques.....	6
1.1.1.2. Aspects pharmaceutiques.....	7
1.1.1.3. Les composés bioactifs caractéristiques	7
1.1.2. Le saule blanc (<i>Salix alba</i> L.).....	9
1.1.2.1. Aspects botaniques.....	9
1.1.2.2. Aspects pharmaceutiques.....	9
1.1.2.3. Les composés bioactifs caractéristiques	9
1.1.3. Le millepertuis (<i>Hypericum perforatum</i> L.).....	10
1.1.3.1. Aspects botaniques.....	10
1.1.3.2. Aspects pharmaceutiques.....	11
1.1.3.3. Les composés bioactifs caractéristiques	11
1.1.4. L'ortie (<i>Urtica dioica</i> L.)	12
1.1.4.1. Aspects botaniques.....	12
1.1.4.2. Aspects pharmaceutiques.....	12
1.1.4.3. Les composés bioactifs caractéristiques	13
1.1.5. Le solidage (<i>Solidago virgaurea</i> L.)	13
1.1.5.1. Aspects botaniques.....	13
1.1.5.2. Aspects pharmaceutiques.....	14
1.1.5.3. Les composés bioactifs caractéristiques	14
1.1.6. La piloselle (<i>Hieracium pilosella</i> Vaill.).....	15
1.1.6.1. Aspects botaniques.....	15

1.1.6.2.	Aspects pharmaceutiques.....	15
1.1.6.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	15
1.1.7.	Le rosier des chiens (<i>Rosa canina</i> L.)	16
1.1.7.1.	Aspects botaniques.....	16
1.1.7.2.	Aspects pharmaceutiques.....	16
1.1.7.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	17
1.1.8.	La griffe du diable (<i>Harpagophytum</i> DC.).....	18
1.1.8.1.	Aspects botaniques.....	18
1.1.8.2.	Aspects pharmaceutiques.....	18
1.1.8.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	19
1.1.9.	Le lierre (<i>Hedera helix</i> L.)	20
1.1.9.1.	Aspects botaniques.....	20
1.1.9.2.	Aspects pharmaceutiques.....	20
1.1.9.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	20
1.2.	Les fruits.....	22
1.2.1.	La cerise (<i>Prunus avium</i> L.).....	22
1.2.1.1.	Aspects botaniques.....	22
1.2.1.2.	Aspects pharmaceutiques.....	22
1.2.1.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	22
1.2.2.	La pêche (<i>Prunus persica</i> L.).....	24
1.2.2.1.	Aspects botaniques.....	24
1.2.2.2.	Aspects pharmaceutiques.....	24
1.2.2.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	24
1.2.3.	La quetsche (<i>Prunus domestica</i> subsp. <i>Insititia</i> L.)	25
1.2.3.1.	Aspects botaniques.....	25
1.2.3.2.	Aspects pharmaceutiques.....	25
1.2.3.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	25
1.2.4.	La mirabelle (<i>Prunus domestica</i> subsp. <i>Syriaca</i>).....	26

1.2.4.1.	Aspects botaniques.....	26
1.2.4.2.	Aspects pharmaceutiques.....	26
1.2.4.3.	Les composés bioactifs caractéristiques	26
2.	Les métabolites.....	27
2.1.	Les métabolites primaires.....	27
2.1.1.	Les lipides	27
2.1.2.	Les sucres	28
2.1.3.	Les acides α -aminés	28
2.2.	Les métabolites secondaires	29
2.2.1.	Les alcaloïdes	29
2.2.1.1.	Généralités	29
2.2.1.2.	Aspects biologiques	30
2.2.2.	Les terpénoïdes.....	31
2.2.2.1.	Généralités	31
2.2.2.2.	Aspects biologiques	32
2.2.3.	Les saponines	32
2.2.3.1.	Généralités	32
2.2.3.2.	Aspects biologiques	34
2.2.4.	Les composés phénoliques	34
2.2.4.A.	Les acides phénoliques et polyphénoliques	35
2.2.4.A.1.	Généralités	35
2.2.4.A.2.	Aspects biologiques	37
2.2.4.B.	Les flavonoids.....	38
2.2.4.B.1.	Généralités.....	38
2.2.4.B.2.	Aspects biologiques	39
2.2.4.B.3.	Les anthocyanidines	40
2.2.4.B.4.	Les chalcones et les aurones.....	41
2.2.4.C.	Les tanins	41
2.2.4.C.1.	Généralités.....	41
2.2.4.C.2.	Aspects biologiques.....	43

3.	Activité antioxydante.....	43
3.1.	Dosage du radical-cation de l'ABTS ^{•+}	44
3.2.	Dosage du radical du DPPH [•]	46
4.	Production des poudres.....	47
4.1.	Broyage et tamisage	47
4.1.1.	Broyage	47
4.1.2.	Tamisage	48
4.2.	Pulvérisation et tamisage différentiel contrôlés (PTC).....	48
5.	Méthodes d'extraction	49
5.1.	Les méthodes d'extraction conventionnelles.....	49
5.1.1.	La macération	50
5.1.2.	L'hydrodistillation.....	50
5.1.3.	Le Soxhlet	51
5.2.	Les technologies vertes.....	52
5.2.1.	Extraction assistée par micro-ondes	52
5.2.2.	Extraction Assistée par Ultrasons (EAU).....	53
5.2.3.	PTC.....	54
6.	Extraction de métabolites secondaires.....	54
6.1.	Les alcaloïdes	54
6.2.	Les terpénoïdes.....	55
6.3.	Les saponines	55
6.4.	Les composés phénoliques	55
6.5.	Les tanins.....	56
7.	Chromatographie	57
7.1.	Les mécanismes de séparations chromatographiques	57
7.1.1.	Chromatographie de partage	57
7.1.2.	Chromatographie d'adsorption en phase normale ou inverse	58
7.1.3.	Chromatographie d'exclusion stérique.....	58

7.1.4.	Chromatographie sur échangeur d'ions.....	59
7.1.5.	Electrochromatographie capillaire.....	59
7.2.	Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	59
7.2.1.	L'injecteur et la pompe.....	60
7.2.2.	La colonne.....	60
7.2.3.	Le détecteur.....	60
7.2.3.1.	Détecteur d'absorption UV.....	61
7.2.3.2.	Détecteur par spectrométrie de masse.....	61
7.3.	HPLC semi-préparative.....	63

Chapitre 2. Etudes Phytochimiques

1.	Isolement de métabolites secondaires.....	66
1.1.	Matériels et méthodes.....	67
1.1.1.	Réactifs utilisés.....	67
1.1.2.	Méthode d'extraction hydrométhanolique.....	67
1.1.3.	Séparation par chromatographie sur gel de silice.....	68
1.1.4.	Appareillage.....	68
1.1.4.1.	LC-PDA/MS.....	68
1.1.4.2.	HPLC semi-préparative.....	69
1.1.4.3.	RMN.....	70
1.2.	Résultats.....	71
1.2.1.	L'hédéracoside C et l' α -hédérine du lierre.....	71
1.2.1.1.	Chromatographie sur gel de silice et caractérisation par LC-MS.....	71
1.2.1.2.	Isolement par HPLC semi-préparative.....	74
1.2.2.	L'hypéroside du millepertuis.....	75
1.2.2.1.	Chromatographie sur gel de silice et caractérisation par LC-MS.....	76
1.2.2.2.	Isolement par HPLC- semi préparative.....	77
1.2.2.3.	Identification par LC-UV-ESI / MS.....	78
1.2.2.4.	Caractérisation par RMN.....	79

2. Étude de la phytochimie des poudres	81
2.1. Matériels et Méthodes	82
2.1.1. Réactifs utilisés.....	82
2.1.2. Préparation des poudres.....	82
2.1.2.1. Préparation de poudres des fruits à l'échelle du laboratoire	82
2.1.2.2. Préparation de poudres des plantes à l'échelle industrielle.....	83
2.1.3. Extraction hydroalcoolique de métabolites secondaires.....	84
2.1.4. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante	84
2.1.4.1. Polyphénols totaux (PPT)	84
2.1.4.2. Flavonoïdes totaux (FVT).....	85
2.1.4.3. Activité antioxydante	86
2.1.5. Analyses par chromatographie LC-UV-ESI/MS.....	89
2.1.5.1. Conditions analytiques.....	89
2.1.5.2. Courbe d'étalonnage	90
2.2. Résultats et discussions	91
A. Echelle industrielle – Pilote.....	91
2.A.1. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante	91
2.A.1.1. Graines du fenouil.....	91
2.A.1.2. Ecorce du saule blanc.....	92
2.A.1.3. Parties aériennes du millepertuis.....	93
2.A.1.4. Parties aériennes de l'ortie	94
2.A.1.5. Parties aériennes de la solidage.....	95
2.A.1.6. Parties aériennes de la piloselle	96
2.A.1.7. Fruits du rosier des chiens.....	97
2.A.1.8. Racine de la griffe du diable	98
2.A.1.9. Parties aériennes du lierre	99

2.A.1.10. Comparaison des résultats par PTC à l'échelle du laboratoire à celle obtenue par PTC à l'échelle industrielle	100
2.A.2. Analyses par chromatographie LC-UV-ESI/MS.....	103
2.A.2.2. Écorce du saule blanc.....	105
2.A.2.3. Parties aériennes du millepertuis.....	108
2.A.2.4. Parties aériennes de l'ortie	110
2.A.2.5. Parties aériennes de la solidage.....	112
2.A.2.6. Parties aériennes de la piloselle	114
2.A.2.7. Fruits du rosier des chiens.....	116
2.A.2.8. Racine de la griffe du diable	118
2.A.2.9. Parties aériennes du lierre	120
B. Echelle du laboratoire.....	122
2.B.1. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante	122
2.B.1.1. La cerise.....	122
2.B.1.2. La pêche.....	123
2.B.1.3. La quetsche	125
2.B.1.4. La mirabelle	126
2.B.1.5. Comparaison des résultats.....	128
2.B.2. Analyses par chromatographies LC-UV-ESI/MS	129
2.B.2.1. La cerise.....	129
2.B.2.2. La pêche.....	131
2.B.2.3. La quetsche	133
2.B.2.4. La mirabelle	135
CONCLUSION.....	137
PÉRSPECTIVES.....	138
RÉFÉRENCES.....	139

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Constituants majoritaires de l'huile essentielle de graines de fenouil	8
Figure 2 : L'acide polyphénolique caractéristique des graines de fenouil	8
Figure 3 : Comparaison entre l'acide acétylsalicylique et la salicyline.....	10
Figure 4 : Composés caractéristiques de parties aériennes du millepertuis.....	11
Figure 5 : Acides phénoliques présent dans l'ortie.....	13
Figure 6 : Flavonoïdes marqueurs dans la solidage.....	14
Figure 7 : Composés caractéristiques de la piloselle	16
Figure 8 : Flavonoïdes contenus dans les fruits du rosier des chiens	17
Figure 9 : Principaux composés dans la racine de la griffe du diable	19
Figure 10 : Saponines triterpéniques présentes dans le lierre.....	21
Figure 11 : Principaux composés antioxydants de la cerise	23
Figure 12 : Autres composés caractéristiques de la cerise	23
Figure 13 : Isoquercétine, le flavonoïde caractéristique de la pêche	24
Figure 14 : Exemples d'alcaloïdes.....	29
Figure 15 : Exemples d'alcaloïde vrai (Cocaïne), de pseudo-alcaloïde (Conine) et de proto-alcaloïde (Adrénaline).....	30
Figure 16 : Exemples de terpénoïdes.....	31
Figure 17 : Exemples de sapogénines triterpéniques.....	33
Figure 18 : Exemples de sapogénines stéroïdiennes.....	33
Figure 19 : Famille des composés phénoliques	35
Figure 20 : Molécules de base permettant la synthèse d'acides phénoliques.....	36
Figure 21 : Exemples d'acides phénoliques	36
Figure 22 : Exemples d'acides polyphénoliques	37
Figure 23 : Flavonoïdes et ses isomères naturels	38
Figure 24 : Différentes classes des flavonoïdes.....	39
Figure 25 : Exemples d'anthocyanidines.....	40
Figure 26 : Structure générale d'une chalcone et d'une aurone	41
Figure 27 : Exemples des tanins condensés et des phlorotannins	42
Figure 28 : Réaction entre l'ABTS ^{•+} et le trolox.....	45
Figure 29 : Réaction entre le DPPH [•] et le trolox	46
Figure 30 : Le principe de la source électrospray d'ionisation (ESI)	62
Figure 31 : Le principe d'analyseur quadripolaire	63

Figure 32 : Appareillage Shimadzu LC-MS-2020	69
Figure 33 : HPLC semi-préparative Waters 600	70
Figure 34 : Les deux saponines triterpénoïdes présentes dans le lierre	71
Figure 35 : Diagramme de fractionnement par chromatographie sur gel de silice.....	72
Figure 36 : Profil du chromatogramme d'ions extraits (SIM) de l'hédéracoside C et de l' α -hédérine additionnées de leur adduits (46) : m/z 1265 et m/z 795, respectivement.....	73
Figure 37 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de l'acide chlorogénique (t_R = 5,05 min) et la quercétine (t_R = 15,5 min) par HPLC-semi préparative.	75
Figure 38 : Hypéroside, le flavonoïde marquer du millepertuis.....	76
Figure 39 : Diagramme de fractionnement par chromatographie sur gel de silice.....	76
Figure 40 : Profil du chromatogramme d'ions extraits (SIM) de l'hypéroside (m/z 463).....	77
Figure 41 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de la solution contient l'hypéroside	78
Figure 42 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de l'hypéroside isolé.....	78
Figure 43 : Profils des chromatogrammes : TIC et SIM de l'hypéroside isolé	79
Figure 44 : Profils des RMN 1H et ^{13}C de l'hypéroside.....	80
Figure 45 : Le broyeur et la tamiseuse utilisé pour fractionner les poudres dans l'échelle du laboratoire	83
Figure 46 : Une tamiseuse industrielle	83
Figure 47 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique	85
Figure 48 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de catéchine.....	86
Figure 49 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du trolox.....	87
Figure 50 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du trolox.....	89
Figure 51 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du fenouil	91
Figure 52 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et les activités antioxydants (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du saule blanc.....	92
Figure 53 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du millepertuis.....	93
Figure 54 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de l'ortie.	94
Figure 55 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la solidage.....	95
Figure 56 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la piloselle.....	96

Figure 57 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du rosier des chiens	97
Figure 58 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la griffe du diable	98
Figure 59 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du lierre	99
Figure 60 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction < 180 µm du fenouil	103
Figure 61 : Les marqueurs dans les grains du fenouil	104
Figure 62 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la quercétine 3-glucuronide (m/z 477) et de l'acide 1,5-dicaféoylquinique (m/z 515) pour la fraction < 180 µm	104
Figure 63 : Les composés bioactifs dans l'écorce du saule blanc	105
Figure 64 : Le profil du chromatogramme UV à 260 nm de la fraction < 180 µm du saule blanc.....	106
Figure 65 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la salicyline (m/z 285) additionnée de son adduit (46) : m/z 331 et de la catéchine (m/z 289) pour la fraction < 180 µm	106
Figure 66 : Le profil du chromatogramme UV à 350 nm de la fraction < 180 µm du millepertuis ...	108
Figure 67 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'hypéroside (m/z 463), l'hypéricine (m/z 503) et l'hyperforine (m/z 535) pour la fraction < 180 µm	109
Figure 68 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction < 180 µm de l'ortie.....	110
Figure 69 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide caféique (m/z 179) et l'acide férulique (m/z 193) pour la fraction < 180 µm	111
Figure 70 : Le profil du chromatogramme UV à 300 nm de la fraction 180-315 µm	112
Figure 71 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z du kaempférol-3-O-rutinoside (m/z 593) et du kaempférol (m/z 285) pour la fraction 180-315 µm	112
Figure 72 : Le profil du chromatogramme UV à 350 nm de la fraction 315-500 µm	114
Figure 73 : Les deux flavonoïdes d'intérêts de la piloselle	114
Figure 74 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'ombelliférone (m/z 161), la lutéoline (m/z 285) et la lutéoline 7-O-glucoside (m/z 447) pour la fraction 315-500 µm	115
Figure 75 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction 315-500 µm	116
Figure 76 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la catéchine (m/z 289), la quercitrine (m/z 447) et la quercétine (m/z 301) pour la fraction 315-500 µm	117
Figure 77 : Le profil du chromatogramme UV à 310 nm de la fraction > 500 µm	118
Figure 78 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z du verbascoside (m/z 623) et de l'harpagoside (m/z 493) pour la fraction > 500 µm	119
Figure 79 : Le profil du chromatogramme UV à 310 nm de la fraction non-tamisée	120

Figure 80 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'hédéracoside C et de l' α -hédérine additionnées de leur adduits (46) : m/z 1265 et m/z 795, respectivement. Les profils correspondent à la fraction non-tamisée.	120
Figure 81 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la cerise.....	122
Figure 82 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la cerise, à l'aide des tests DPPH et ABTS.	123
Figure 83 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la pêche.....	124
Figure 84 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la pêche, à l'aide des tests DPPH et ABTS.	124
Figure 85 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche.	125
Figure 86 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche, à l'aide des tests DPPH et ABTS.....	126
Figure 87 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle.	127
Figure 88 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle, à l'aide des tests DPPH et ABTS.....	127
Figure 89 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction 180-315 μ m	130
Figure 90 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide malique (m/z 133), l'acide p-coumaroylquinique (m/z 337) et la procyanidine B2 (m/z 577) pour la fraction 180-315 μ m.	130
Figure 91 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction > 500 μ m	132
Figure 92 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide malique (m/z 133), l'acide chlorogénique et son isomère (m/z 353) pour la fraction > 500 μ m.	132
Figure 93 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction > 500 μ m	134
Figure 94 : Chromatogramme UV a 340 nm de la fraction > 500 μ m de la mirabelle.....	135

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les solvants et les acides utilisés lors des expériences et leurs origines.....	67
Tableau 2 : Les plantes sélectionnées et leurs parties d'intérêts	81
Tableau 3 : Les sels et les réactifs utilisés lors des expériences et leurs origines	82
Tableau 4 : L'AA de la fraction granulométrique sélectionnée, l'AA de la fraction non-tamisée et le pourcentage d'augmentation de l'AA de chaque plante.....	100
Tableau 5 : Comparaison entre les granulométries des meilleures AA des six plantes	102
Tableau 6 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée du fenouil.....	105
Tableau 7 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du saule blanc.	107
Tableau 8 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du millepertuis.	109
Tableau 9 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de l'ortie.....	111
Tableau 10 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la solidage.	113
Tableau 11 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la piloselle.....	115
Tableau 12 : Concentrations des flavonoïdes caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du rosier des chiens.....	117
Tableau 13 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la griffe du diable.	119
Tableau 14 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du lierre.....	121
Tableau 15 : L'AA de la fraction granulométrique sélectionnée, l'AA de la fraction non-tamisée (NT) et le pourcentage d'augmentation de l'AA de chaque fruit.....	128
Tableau 16 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la cerise.	131
Tableau 17 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la pêche.	133
Tableau 18 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche.	134
Tableau 19 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle.	136

AVANT PROPOS

Ce projet centré sur la Région Lorraine a permis l'étude de plantes et de fruits. Il regroupe plusieurs acteurs lorrains dont deux PME : Agritech France, une société de commercialisation de produits alimentaires séchés, et Végafruits qui commercialise et distribue des fruits et légumes principalement en Lorraine. De plus, le développement de ce projet est réalisé dans trois laboratoires :

LIBio : le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules a assuré la production des poudres de qualité constante issues de différentes parties de plantes et de fruits de la Région Lorraine et la réalisation des analyses physico-chimiques.

URAFPA : l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux est chargée d'une part, de sélectionner des plantes et fruits régionales en fonction de leur intérêt biologique, et d'autre part de réaliser les analyses biologiques in vivo des extraits végétaux.

LCP-A2MC : Laboratoire de Chimie et de Physique Approche Multi-échelles des Milieux Complexes, s'est chargé de mettre au point les méthodes d'extraction, d'isolement et de caractérisation des métabolites secondaires issus des extraits végétaux.

INTRODUCTION

Les recherches développées au cours de cette thèse entrent dans le cadre de la phytochimie (ou la chimie végétale) qui recouvre plusieurs domaines dont :

- La chimie organique pour l'étude des structures des composés bioactifs et pour les méthodologies d'isolement de composés d'intérêts contenus dans les extraits de plantes.
- La chimie analytique et les techniques chromatographiques pour l'identification et la caractérisation des nombreux constituants présents dans les plantes.
- La biochimie pour l'étude des activités biochimiques.

L'utilisation des végétaux comme source d'alimentaire ou en raison de leurs propriétés médicinales, ou encore pour leur utilisation en tant que cosmétique remonte de longues années. Mais l'intérêt pour les aspects pharmacologiques des plantes augmente de jour en jour ainsi que la demande en médicaments à base de produits naturels. Les aspects pharmaceutiques de chaque

végétal sont dus à la présence de métabolites primaires et de métabolites secondaires. Ces derniers jouent un rôle dans la protection de la plante contre les agressions d'agents pathogènes.

Dans notre projet, nous nous sommes concentrés sur les métabolites secondaires et sur leur extraction, identification, isolement et caractérisation.

Il existe différentes méthodes d'extraction/séparation de métabolites secondaires à partir de végétaux. Ils peuvent être divisés en deux catégories : les méthodes anciennes qui sont utilisées depuis l'antiquité et les procédures modernes qui se développent pour se rapprocher du domaine de la chimie verte. L'extraction verte est basée sur la conception de procédés qui garantissent un haut rendement d'extraction tout en réduisant la consommation d'énergie et celle de solvants organiques toxiques.

L'un des procédés d'extraction modernes repose sur le brevet "PCT/FR2011/000561. Le PTC est un procédé de Pulvérisation & Tamisage différentiel Contrôlés. Ce nouveau procédé de broyage et de criblage différentiel contrôlé peut être utilisé pour extraire et/ou séparer de façon par voie sèche des composés bioactifs issus de matrices végétales [1]. Lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention, l'organe du végétal subit une dessiccation, puis le résidu sec est broyé et les poudres sont fractionnées par tamisage contrôlé en fonction de leurs granulométries.

Ce brevet revendique une extraction de principes actifs naturels, il se distingue des procédés d'extraction classiques en ce qu'il n'utilise aucun solvant organique, il se distingue aussi des procédés dit de la chimie verte qui utilisent des fluides supercritiques ou des plantes à traire. Les intérêts de ce procédé sont sa facilité de mise en œuvre pour la production de gros volumes et sa capacité à extraire une gamme élargie d'actifs de taille et de poids moléculaires très variés. Le procédé [2] se caractérise par la succession des étapes suivantes :

- Etape 1 : une dessiccation effectuée par des techniques de déshydratation.
- Etape 2 : une pulvérisation effectuée par toute forme de broyage connue.
- Etape 3 : une dispersion permettant d'obtenir un nuage particulaire formé de micro ou de nano particules dispersées dans l'air ou dans un gaz inerte.
- Etape 4 : un tamisage différentielle contrôlé qui permet de séparer les particules en fonction de leur taille granulométrique.
- Etape 5 : une récupération progressive des actifs piégés entre deux tamis par aspiration.

Dans la première partie de notre étude, une méthodologie d'isolement des métabolites secondaires issus des extraits de plantes séchées et broyées mais non-tamisées est effectuée. Le but de cette partie est de développer une méthode d'isolement des métabolites secondaires en utilisant une HPLC-semi préparative.

Dans la deuxième partie, les analyses phytochimiques des poudres de nombreuses plantes, préparées par le PTC à l'échelle industrielle (Pilote) sont réalisées. Il convient de noter que ces analyses phytochimiques des poudres de nombreuses plantes, préparées par le PTC à l'échelle du laboratoire, ont été déjà effectuées par Ali Zaiter [2]. Le but de notre travail est de valider le PTC à l'échelle industrielle (Pilote) par comparaison des résultats à ceux obtenus par extraction PTC à l'échelle du laboratoire.

Ce travail sera appliqué à l'étude phytochimique de 9 plantes de la Région Lorraine. Les plantes ont été sélectionnées par l'équipe URAFPA en fonction de leur potentiel bioactif.

Les plantes sélectionnées sont : le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le saule blanc (*Salix alba* L.), le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), l'ortie (*Urtica dioica* L.), la solidage (*Solidago virgaurea* L.), la piloselle (*Hieracium pilosella* Vaill.), le rosier des chiens (*Rosa canina* L.), la griffe du diable (*Harpagophytum* DC.) et le lierre (*Hedera helix* L.). La caractérisation physico-chimique de poudres de plantes seront réalisées par l'équipe du LiBio.

De plus, pour la première fois, nous avons étudié l'effet du PTC à l'échelle du laboratoire sur l'extraction de métabolites secondaires par voie sèche d'extraits de fruits. Pour cet objectif, nous avons effectué les analyses phytochimiques sur les fractions granulométriques ainsi que sur les fruits broyés mais non tamisés. L'objectif est de déterminer l'efficacité du procédé de fractionnement différentiel sur augmentation de l'activité antioxydante et sur l'enrichissement des composés d'intérêts dans certaines classes granulométriques.

Les fruits sélectionnés sont : la cerise (*Prunus avium* L.), la pêche (*Prunus persica* L.), la quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) et la mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*). La caractérisation physico-chimique des poudres de fruits seront réalisées par l'équipe du LiBio.

Dans le premier chapitre, une étude bibliographique est réalisée. Il présente les aspects botaniques et pharmaceutiques des plantes et des fruits sélectionnés, la description générale des

métabolites, l'activité antioxydante, les principales méthodes d'extraction et particulièrement les méthodes d'extraction de métabolites secondaires et les principes de la chromatographie.

Dans le deuxième chapitre, les travaux expérimentaux sont présentés en deux parties :

- La première partie présente une méthodologie de l'isolement des deux saponines de l'extrait du lierre par HPLC-semi préparative. Afin de vérifier leur propriétés tensioactives pour des applications dans le domaine de la cosmétique. Cette expérience a permis de mettre en place une méthodologie, validée par l'isolement de l'hypéroside l'un des flavonoïdes marqueurs du millepertuis.

- La deuxième partie présente les propriétés phytochimiques des plantes et des fruits sélectionnés en fonction de leur granulométrie. Afin de déterminer ses propriétés phytochimiques, le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux a été effectué ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante, l'identification et la quantification des composés bioactifs par LC-MS pour chaque fraction granulométrique.

Chapitre 1.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1. Description botanique**
- 2. Les métabolites**
- 3. Activités antioxydantes**
- 4. Production des poudres**
- 5. Méthodes d'extraction**
- 6. Extraction de métabolites secondaires**
- 7. Chromatographie**

1. Description botanique

1.1. Les plantes

Les neuf plantes sélectionnées provenant de la Région Lorraine sont : le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le saule blanc (*Salix alba* L.), le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), l'ortie (*Urtica dioica* L.), la solidage (*Solidago virgaurea* L.), la piloselle (*Hieracium pilosella* Vaill.), le rosier des chiens (*Rosa canina* L.), la griffe du diable (*Harpagophytum* DC.) et le lierre (*Hedera helix* L.). Les aspects botaniques et les aspects pharmaceutiques de chaque plante sont étudiés par bibliographie. En fin, selon les études bibliographiées, la partie d'intérêt de chaque plante est sélectionné afin de réaliser les analyses phytochimiques en fonction de la granulométrie.

1.1.1. Le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.)

1.1.1.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Foeniculum vulgare* Mill.
- Synonyme : *Foeniculum officinale*
- Famille : Apiacées
- Origine : Europe du sud
- Période de floraison : été
- Couleur des fleurs : jaune
- Type de plante : légume, aromate
- Type de végétation : vivace, bisannuel
- Type de feuillage : caduc
- Hauteur : jusqu'à 2,50 m
- Type de fruits : graines (de 4 à 10 millimètres)



Le fenouil est une plante aromatique bien connue, il est utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour aromatiser les aliments et les liqueurs, ainsi que dans l'industrie de la parfumerie. Il existe deux espèces de fenouils : le Vulgaire et le Piperitum. La famille des Vulgaire est la plus cultivée.

1.1.1.2. Aspects pharmaceutiques

Le fenouil est une plante médicinale populaire qui possède des activités pharmacologiques aussi bien en médecine traditionnelle qu'en phytothérapie moderne. Le fenouil par la présence de composés antioxydants, manifeste des activités anti-inflammatoires et anti-radicalaires [3]. De plus, il possède également des activités antimicrobiennes, bronchodilatatrice, œstrogène, diurétique, lithontriptique, galactagogue, emménagogue, antithrombotique, hypotenseur, hypotenseur et gastroprotecteur [4]. L'existence de composés phénoliques dans cette plante lui donne un potentiel antioxydant [5]. L'extrait aqueux de fenouil est également utilisé dans l'industrie cosmétique pour améliorer les effets anti-âge des produits de soin de la peau [6].

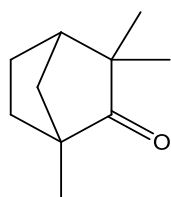
Les graines de fenouil sont utilisées comme aromatisant dans les produits alimentaires tels que les liqueurs, le pain, les pâtisseries et le fromage. Elles sont également utilisées comme constituant de produits cosmétiques et pharmaceutiques [7]. D'autre part, les huiles essentielles sont principalement concentrées dans les graines et dégagent une senteur et un goût particulier. Les graines contiennent 1 – 4% (w/w) d'huile essentielles [8].



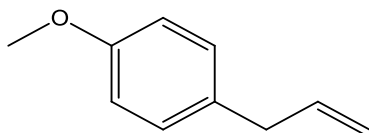
De nombreuses études ont montré que les effets pharmacologiques des graines de fenouil sont attribués aux huiles essentielles et leurs activités antibactériennes [9] [10], antimicrobiennes [11] [12], antifongiques [13] et antidiabétiques [14] ont été signalées. Plusieurs études mentionnent l'utilisation de l'extrait de graines pour son l'activité antioxydante [15] et aussi pour soulager l'inflammation [16].

1.1.1.3. Les composés bioactifs caractéristiques

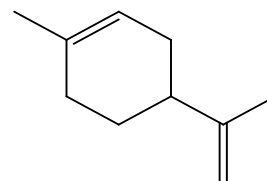
L'huile essentielle des graines est en majorité constituée de monoterpènes oxygénés comme la fenchone, l'estragole et d'un monoterpène majeur le (+)-limonène (Figure 1).



Fenchone



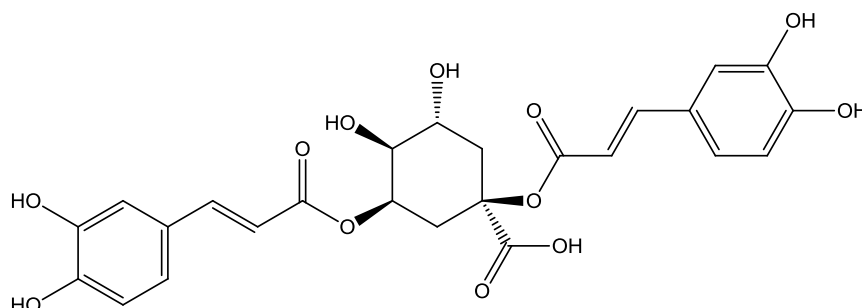
Estragol



(+)-Limonène

Figure 1 : Constituants majoritaires de l'huile essentielle de graines de fenouil

De plus, les graines contiennent des vitamines comme la vitamine C, B1, B2 et B3 [17]. De nombreuses activités pharmaceutiques des graines de fenouil sont dues aux composés polyphénoliques. L'acide dicaféoylquinique est l'un des acides polyphénoliques caractéristiques des graines de fenouil [18] (Figure 2).



Acide dicaféoylquinique

Figure 2 : L'acide polyphénolique caractéristique des graines de fenouil

1.1.2. Le saule blanc (*Salix alba* L.)

1.1.2.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Salix alba* L.
- Synonyme : Saule commun, Saule argenté
- Famille : Salicacées
- Origine : Europe, Asie
- Période de floraison : mai
- Couleur des fleurs : vert-jaune
- Type de plante : arbre
- Type de feuillage : caduc
- Couleur(s) du feuillage : gris/vert
- Hauteur : jusqu'à 24 m



Le saule blanc n'est pas auto fertile, il ne pousse pas à l'ombre et il préfère les sols humides ou mouillés. Les feuilles sont alternes, atteignant 11 cm de long, avec des poils soyeux blanchâtres des deux côtés. Le nom du saule blanc dérive de la couleur blanche au-dessous des feuilles. Les fruits apparaissent sous forme de capsules de forme allongée. Il a une écorce grise profondément fissurée.

1.1.2.2. Aspects pharmaceutiques

Historiquement, l'écorce du saule blanc est utilisée depuis plus de 2000 ans, d'abord dans la région méditerranéenne, notamment en Égypte et en Grèce, puis en Chine, en Europe et en Amérique. L'utilisation d'extraits d'écorce du saule blanc est commune pour traiter les douleurs, telles que les douleurs articulaires, le mal de dos aigus [19], l'arthrose [20] et les maux de tête [21].



1.1.2.3. Les composés bioactifs caractéristiques

On pense que les propriétés de l'extrait d'écorce de saule blanc précédemment énumérées sont associées, du moins en partie, à sa teneur en salicyline. Chez les phytothérapeutes, cette plante s'appelle une « aspirine végétale » car elle contient un composé

miraculeux dans son écorce : la salicyline. En effet, cette molécule est très proche au niveau de sa structure de l'acide acétylsalicylique (aspirine) (Figure 3). Ce composé est connu pour ses activités antalgiques et anti-inflammatoires [22].

Il faut noter que la salicyline contenue dans l'extrait d'écorce de saule blanc ne peut expliquer à elle seule son efficacité clinique [23]. Outre les constituants liés à la salicyline, divers polyphénols et flavonoïdes sont également présents [24].

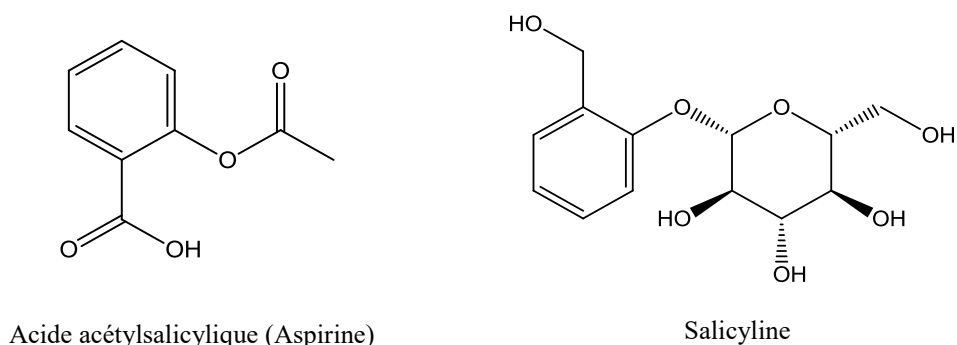


Figure 3 : Comparaison entre l'acide acétylsalicylique et la salicyline

1.1.3. Le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.)

1.1.3.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Hypericum perforatum* L.
- Famille : Clusiacées, Guttifères
- Origine : Hémisphère nord
- Période de floraison : de juin à octobre
- Couleur des fleurs : jaune
- Type de plante : petit arbuste à fleurs
- Type de feuillage : ovales lancéolées
- Hauteur de la tige : 1 m
- Type de végétation : vivace, vivace arbustive



Ses fleurs à cinq pétales s'épanouissent au début de l'été et ses fruits sont généralement des capsules sèches qui possèdent un grand nombre de très petites graines.

1.1.3.2. Aspects pharmaceutiques

Le principal intérêt pharmaceutique du millepertuis est son effet antidépresseur [25]. Cependant, cette herbe a montré d'autres activités, y compris : antivirale [26], pour la cicatrisation des plaies [27] et antibactérien [28]. De plus, le millepertuis a un large éventail d'applications médicales, notamment pour traiter les plaies cutanées, l'eczéma, les brûlures, les maladies du tube digestif et les troubles psychologiques [25].

1.1.3.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Les extraits éthanoliques du millepertuis contiennent de nombreux composés phénoliques, à savoir des flavonoïdes et des acides phénoliques, ce qui suggère qu'ils pourraient avoir des propriétés antioxydantes importantes [29] [30] [31]. L'hypéroside est un flavonoïde marqueur du millepertuis et certaines recherches rapportent les effets préventifs de l'hypéroside sur le cancer du poumon [32] [33] (Figure 4). Les deux autres composés caractéristiques du millepertuis sont l'hyperforine et l'hypericine (Figure 4). Ils sont non seulement les principaux composants chimiques lipophiles du millepertuis, mais jouent également un rôle essentiel dans l'activité antidépresseive de cette plante [34] [35]. Ces deux molécules ont un effet anti-inflammatoire notable [36]. Les recherches effectuées par Wood et al. en 1990 [37] montrent que l'hypericine présente une activité anti-VIH/SIDA.

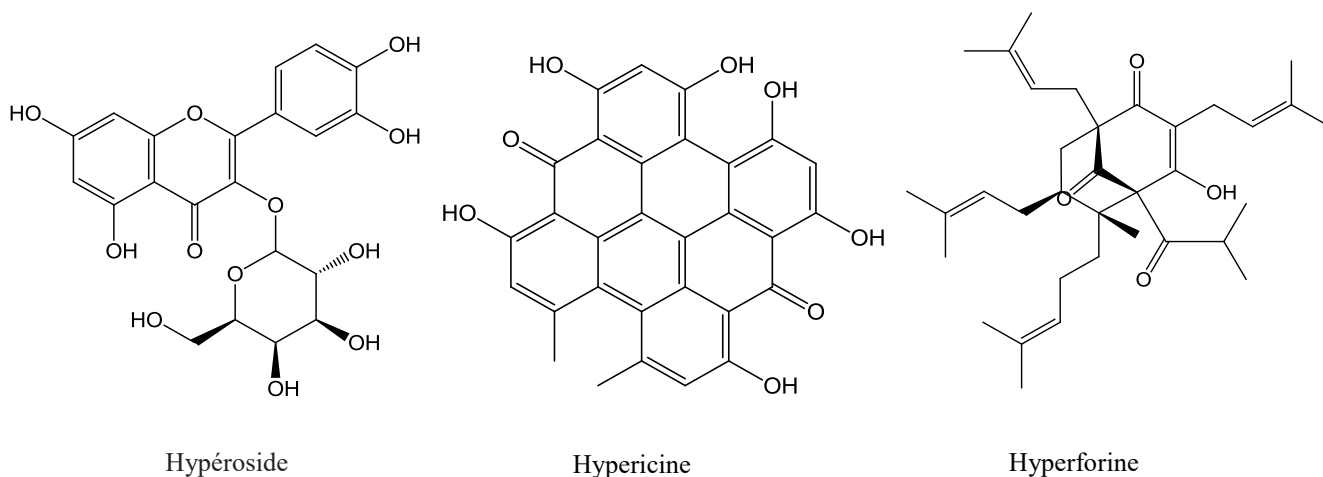


Figure 4 : Composés caractéristiques de parties aériennes du millepertuis

1.1.4. L'ortie (*Urtica dioica* L.)

1.1.4.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Urtica dioica* L.
- Famille : Urticacées
- Origine : Europe
- Couleur des fleurs : vert foncé
- Type de plante : mauvaise herbe
- Hauteur : jusqu'à 150 cm
- Type de végétation : vivace
- Période de floraison : de juillet à septembre



L'ortie est une plante qui pousse dans les terres incultes tempérées et tropicales du monde entier. Les feuilles sont vertes foncées avec 15 cm de longueur et tous ses organes (tige, feuille, fleur) sont recouverts de poils.

1.1.4.2. Aspects pharmaceutiques

Dans de nombreuses cultures, l'ortie est consommée comme légume à feuilles. Il est recommandé en particulier dans les régimes végétariens et diabétiques comme source riche de protéines, de minéraux (le potassium, le calcium, le fer, le magnésium et le phosphore) et de vitamines (A, B et C), elle contient également peu de calories [38]. L'ortie a une longue histoire d'utilisation comme remède traditionnel pour traiter les rhumatismes, l'eczéma, l'arthrite, l'anémie, le rhume et la toux ainsi que pour lutter contre l'insuffisance hépatique [39]. Actuellement, cette plante fait l'objet d'une attention particulière en tant que source de fibres en médecine douce. Un rapport confirme le potentiel de l'ortie en tant que source durable de fibre textile [40].

De plus, grâce aux polyphénols contenus dans les extraits aqueux, l'ortie possède des activités antioxydantes et anti-inflammatoires [41] [42]. Parmi toutes les parties de l'ortie, ce sont les feuilles qui possèdent la meilleure activité antioxydante [43]. Les extraits d'ortie sont également utilisés dans les cosmétiques et leur application topique présente de nombreux avantages pour la santé de la peau. Les propriétés antioxydantes et anti-âge de l'extrait d'ortie sont intéressantes pour les applications en cosmétiques [44].

1.1.4.3. Les composés bioactifs caractéristiques

L'ortie est riche en acides gras, en caroténoïdes et en polyphénols [45] [46]. Les propriétés des composés phénoliques contenus dans les feuilles, les tiges et les racines de cette plante sont rapportés par Pinelli et al. en 2008 [47]. La quantité de flavonoïdes dans ses feuilles est plus grande que dans ses tiges et ses racines [48]. Les différents flavonoïdes et les acides phénoliques comme l'acide férulique et l'acide chlorogénique sont présents dans les feuilles de l'ortie [49] (Figure 5).

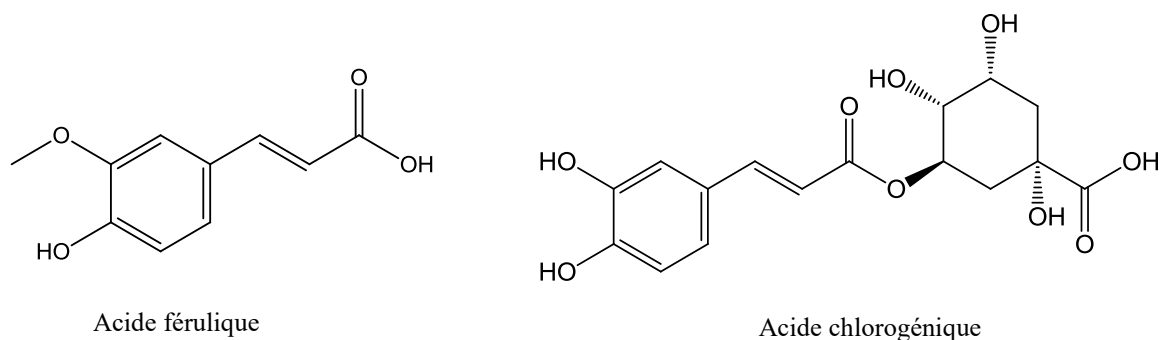


Figure 5 : Acides phénoliques présentent dans l'ortie

1.1.5. Le solidage (*Solidago virgaurea* L.)

1.1.5.1. Aspects botaniques

- Non latin : *Solidage* L.
- Synonyme : Verge d'or
- Famille : Astéracées
- Origine : Amérique du Nord
- Période de floraison : d'août à octobre
- Couleur des fleurs : jaune
- Hauteur : jusqu'à 150 cm
- Type de végétation : vivace
- Type du feuillage : caduc
- Type de plante : herbacée rhizomateuse



Cette plante se trouve sur presque tous les continents comme une herbe commune. Elle a des fleurs jaunes qui sont utilisées comme colorant jaune pour les textiles.

1.1.5.2. Aspects pharmaceutiques

Les feuilles et les fleurs de la solidage sont très appréciées en herboristerie pour la préparation de pommades, de teintures et de poudres. Cette plante est diurétique, astringente, anti-inflammatoire, antiseptique, expectorante et antispasmes musculaires [50]. Elle est également utilisée contre les douleurs articulaires (rhumatismes), l'arthrite, ainsi que l'eczéma et d'autres affections cutanées. De plus, il y a des études qui portent sur ses activités antimicrobienne [51], antioxydante [52] et antimutagène [53].

1.1.5.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Le solidage contient de nombreux composés phénoliques qui sont connus pour leur activité antioxydante [54] [55]. L'un des flavonoïdes marqueurs de la solidage est le kaempférol qui a une activité anti-inflammatoire [56]. Récemment, les propriétés anti-adipogenèse de la solidage, dues à la présence de le kaempférol-3-O-rutinoside ont été étudiées (Figure 6) [57].

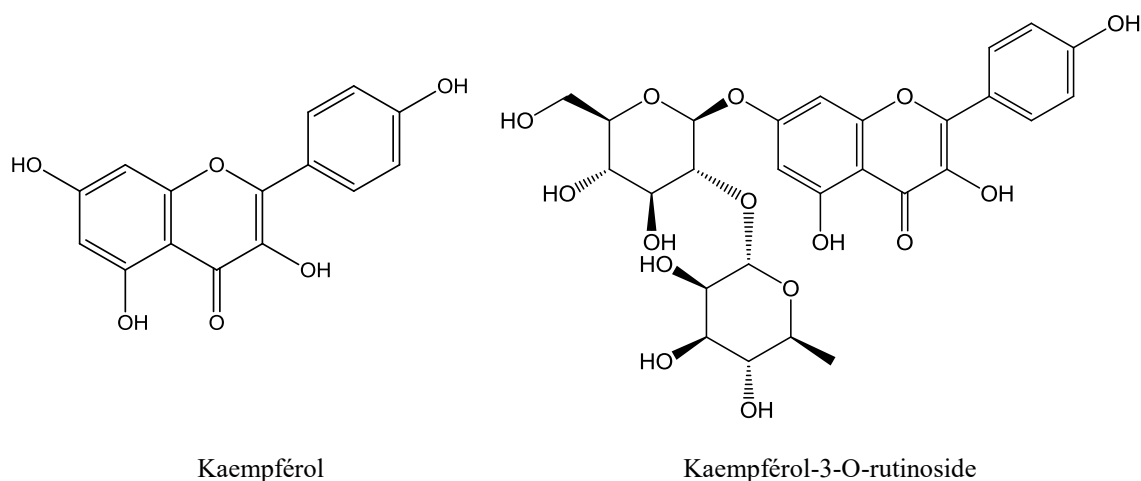


Figure 6 : Flavonoïdes marqueurs dans la solidage

1.1.6. La piloselle (*Hieracium pilosella* Vaill.)

1.1.6.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Hieracium pilosella* Vaill.
- Famille : Astéracées
- Origine : l'Europe et du nord de l'Asie
- Période de floraison : printemps, été
- Couleur des fleurs : jaune
- Hauteur : jusqu'à 30 cm
- Type de végétation : vivace
- Type du feuillage : persistant
- Synonymes : Épervière piloselle, Oreille de souris, Oreille de rat, Piloselle de rat, Herbe à l'épervier ou Veluette.



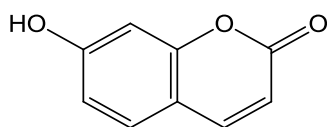
La piloselle possède des feuilles vertes recouvertes de poils argentés. C'est une plante couvre-sol largement répandue dans les montagnes sur des sols secs.

1.1.6.2. Aspects pharmaceutiques

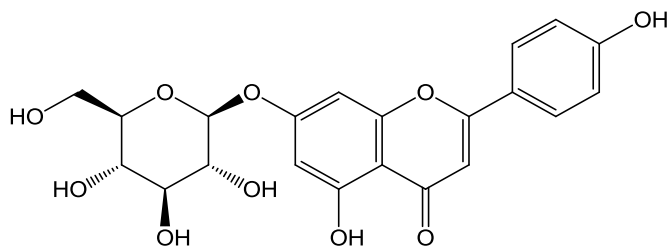
La piloselle a été utilisée pendant des siècles comme médicament. Elle est principalement utilisée pour soigner la bronchite, l'asthme bronchique, les œdèmes et comme pommade pour la cicatrisation des plaies [58]. L'extrait hydroalcoolique de cette plante montre des activités antioxydante, anti-inflammatoire et antitumorale [59]. L'activité antioxydante de cette plante, qui provient de composés phénoliques et de flavonoïdes a été rapportée par Gawrońska-Grzywacz et al. en 2011 [60]. Cette plante est particulièrement recommandée pour intensifier la miction et éliminer le mucus et les calculs urinaires [61]. Cette plante possède également des propriétés antibactériennes et antidiarrhéiques [62].

1.1.6.3. Les composés bioactifs caractéristiques

On trouve une grande variété de polyphénols dans la piloselle, parmi eux les aglycones et les glycosides flavonoïdes ont été identifiés [63]. Les composants phénoliques les plus fréquents dans les extraits méthanoliques de la piloselle sont l'acide chlorogénique, l'apigénine 7-O-glucoside et l'ombelliférone qui est un des antioxydants les plus actifs [64] [65]. L'ombelliférone (Figure 7), appartenant à la famille de la coumarine, est considérée comme un composé très actif avec des propriétés antioxydantes, analgésiques et anti-inflammatoires [66].



Ombelliférone



Apigénine 7-O-glucoside

Figure 7 : Composés caractéristiques de la piloselle

1.1.7. Le rosier des chiens (*Rosa canina* L.)

1.1.7.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Rosa canina* L.
- Synonymes : Églantier des chiens
- Origine : Europe
- Famille : Rosacées
- Période de floraison : d'avril à juillet
- Couleur des fleurs : rose ou blanche
- Type de végétation : vivace
- Hauteur : jusqu'à 3.5 m
- Type de feuillage : caduc
- Type de plante : arbuste à fleurs et aux fruits décoratifs



Le rosier des chiens est un arbuste qui se trouve dans les endroits tempérés. Ces fruits (le cynorhodon) appelés églantines ou familièrement gratte-culs sont rouges et en forme allongée avec une taille d'environ 2 cm de long.

1.1.7.2. Aspects pharmaceutiques

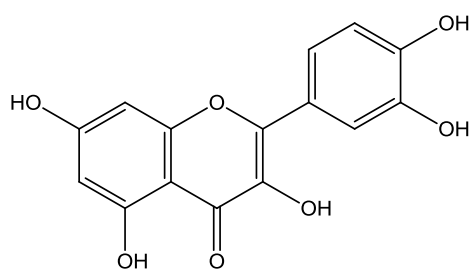
L'utilisation du rosier des chiens en tant que plante médicinale remonte à très longtemps. Les fruits (cynorhodons) sont souvent utilisés comme compléments alimentaires et comme tisane. Ils ont la plus forte teneur en vitamine C (30–1300 mg/100 g) [67]. Les caroténoïdes sont également largement présents dans les fruits, notamment le β -carotène, le lycopène et la β -rubixanthine [68].

L'extrait de cynorhodon est utilisé dans la médecine traditionnelle européenne comme laxatifs, contre les troubles du rein et des voies urinaires inférieures, l'arthrite, la goutte, la fièvre, le rhume et la carence en vitamine C [69]. Certaines études ont découvert l'effet positif des poudres des cynorhodons sur la réduction des symptômes de l'arthrose au cours d'essais cliniques [70] [71]. Il a été rapporté que plusieurs composés dans l'extrait de cynorhodon présentaient des activités anti-inflammatoires [72]. Du plus, les recherches effectuées par Orhan et al. en 2009 [73] montrent que l'extrait éthanolique de cynorhodon a des propriétés antidiabétiques. D'autres études indiquent également une activité antioxydante pour le cynorhodon [74] [75] [76].

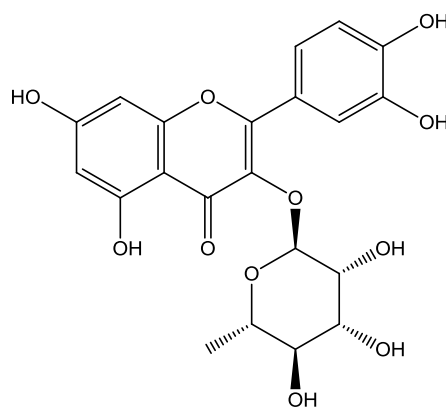


1.1.7.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Les cynorhodons sont très riches en vitamine C, ainsi qu'en vitamines A, P, K, B1 et B2 et E [77]. De plus, les minéraux tels que le potassium, le calcium, le sodium, le fer, le magnésium et le phosphore se trouvent dans les cynorhodons [78]. La teneur en polyphénols et flavonoïdes dans les cynorhodons a été effectuée par Roman et al. en 2013 [79]. De nombreuses recherches montrent le rôle important des polyphénols en l'activité antioxydante du cynorhodon [80]. Différents flavonoïdes ont été identifiés dans l'extrait de cynorhodon, tels que la quercétine et la quercitrine (Figure 8) [81].



Quercétine



Quercitrine

Figure 8 : Flavonoïdes contenus dans les fruits du rosier des chiens

1.1.8. La griffe du diable (*Harpagophytum* DC.)

1.1.8.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Harpagophytum* DC.
- Synonyme : Racine de Windhoek
- Origine : sud-ouest de l'Afrique
- Famille : Pédaliacées, Sésame
- Couleur des fleurs : violette
- Type de végétation : vivace



L'harpagophytum DC est parfois appelé griffe du diable à cause de ses fruits qui se cramponnent aux sabots et au pelage des animaux ; son autre nom est Racine de Windhoek (du nom de la capitale namibienne). La griffe du diable est une herbe annuelle à faible croissance avec une odeur désagréable. Elle a des fleurs en forme de trompette, qui mesurent 2.5 à 5 cm de long et 5 à 7.5 cm de diamètre. Ses tubercules (racines de stockage) atteignent 25 cm de long et concentrent les propriétés thérapeutiques de la plante.

1.1.8.2. Aspects pharmaceutiques

Les premières descriptions occidentales de la plante datent de 1820, mais c'est en 1907 qu'un Allemand a découvert ses vertus médicinales, au contact des peuples indigènes. Ce sont uniquement les racines de stockage de la plante que l'on emploie. La plante peut stocker jusqu'à 90% d'eau dans ces racines de stockage et ces racines sont utilisées en médecine. Ce sont de bons alliés pour stimuler l'appétit et faciliter la digestion. Deux études ont été réalisées pour évaluer l'efficacité de la griffe du diable dans le traitement de la lombalgie aiguë [82] [83].

Des preuves cliniques montrent que l'utilisation de la racine de cette plante aide au traitement de l'arthrose [84]. Des études effectuées par Andersen et al. en 2004 [85] prouvent que la racine de cette plante peut être utilisée pour soulager les douleurs aux articulations, aux muscles



et aux tendons. La racine de cette plante est reconnue pour ses effets anti-inflammatoires [86]. D'autre part, des études scientifiques montrent que cette plante présente des activités analgésiques, antidiabétiques, antiépileptiques, antimicrobiennes et antipaludiques [87]. L'autre aspect pharmaceutique important de la racine est son activité antioxydante [88] [89].

1.1.8.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Les griffes du diable regorgent de minéraux comme le calcium, le fer, le cuivre, le magnésium et le phosphore. L'un des composés principaux de la racine de la griffe du diable est l'harpagoside (Figure 9) qui est responsable des effets: anti-rhumatismal, anti-inflammatoire et analgésique [90]. Le second composé d'intérêt dans la racine de la griffe du diable est le verbascoside (Figure 9) qui possède des propriétés antioxydantes [91] [87].

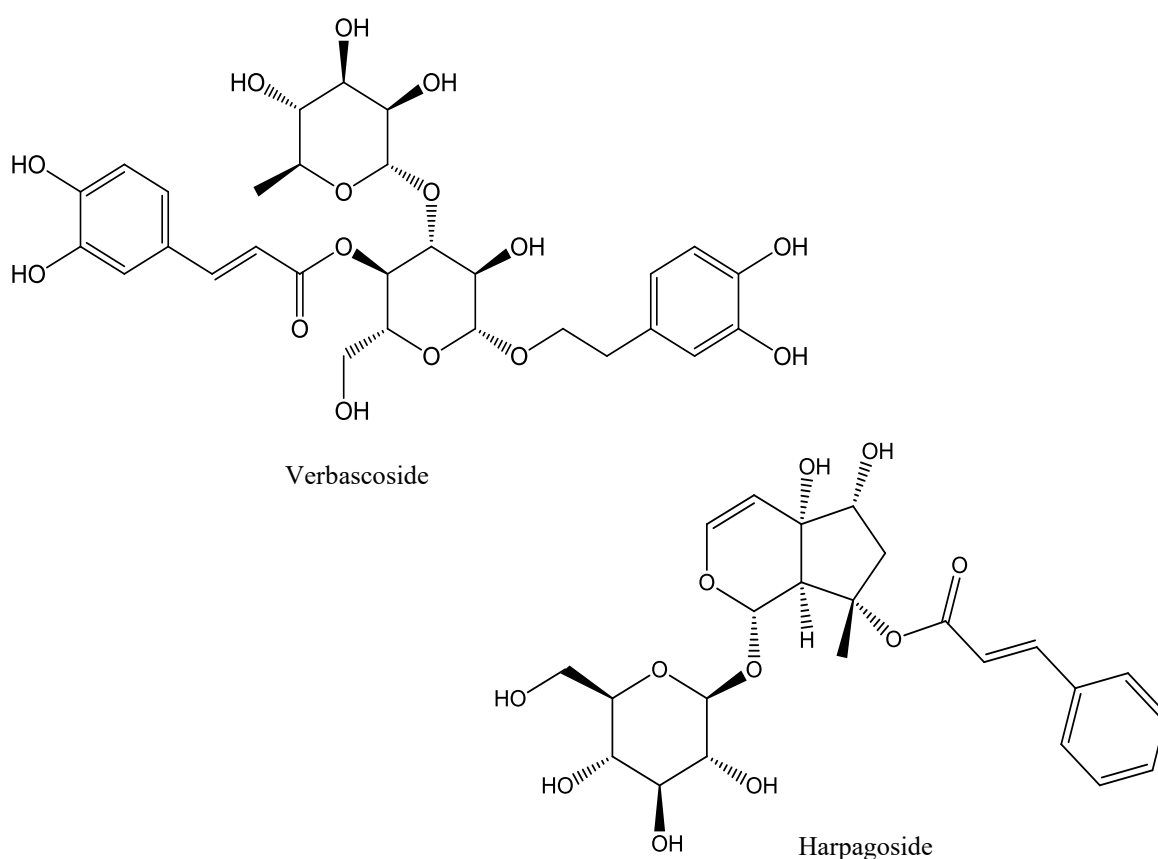


Figure 9 : Principaux composés dans la racine de la griffe du diable

1.1.9. Le lierre (*Hedera helix* L.)

1.1.9.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Hedera helix* L.
- Origine : Europe
- Famille : Araliacées
- Période de floraison : été
- Type de plante : plante grimpante
- Type de végétation : vivace
- Couleur des fleurs : blanc
- Type de feuillage : persistant



Le lierre se trouve dans les jardins mais il se développe souvent sans qu'on le veuille sur le tronc des arbres et les murs des maisons. Le lierre pousse plus vigoureusement à l'ombre, sur des sites humides des sols lourds et fertiles. Les feuilles du lierre sont à limbe assez dure, verte foncée ou légèrement blanches sur leur contour. Les fleurs sont petites et groupées dans des ombelles sphériques très serrées.

1.1.9.2. Aspects pharmaceutiques

Les feuilles et les fruits frais de cette plante, à fortes doses, seraient toxiques et pourraient causer des irritations gastro-intestinales, des diarrhées sanglantes et la mort. Par contre, il a été rapporté que le lierre a des propriétés antispasmodiques [92], anti-inflammatoires [93], antiallergiques [94] et des effets antiarthritiques [95].

Les nanoparticules du lierre peuvent être utilisées dans les crèmes solaires comme le filtre d'irradiation UV [96]. L'intérêt principal de l'utilisation du lierre en cosmétique provient de ses saponines [97]. Les saponines sont utilisées dans la formulation de produits cosmétiques pour le soin de la peau ou des cheveux [98] [99]. Elles sont également utilisées comme surfactants et comme émulsifiants [100].

1.1.9.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Un des groupes de composés biologiquement actifs responsables de l'utilisation médicinale du lierre est celui des saponines triterpéniques. Les deux saponines triterpéniques connue dans l'extrait de cette plante sont l'hédéracosite C et l' α -hédérine (Figure 10) [101].

Des études présentent les activité antimutagène [102] antioxydante [103] et antitumoral [104] de l' α -hédérine.

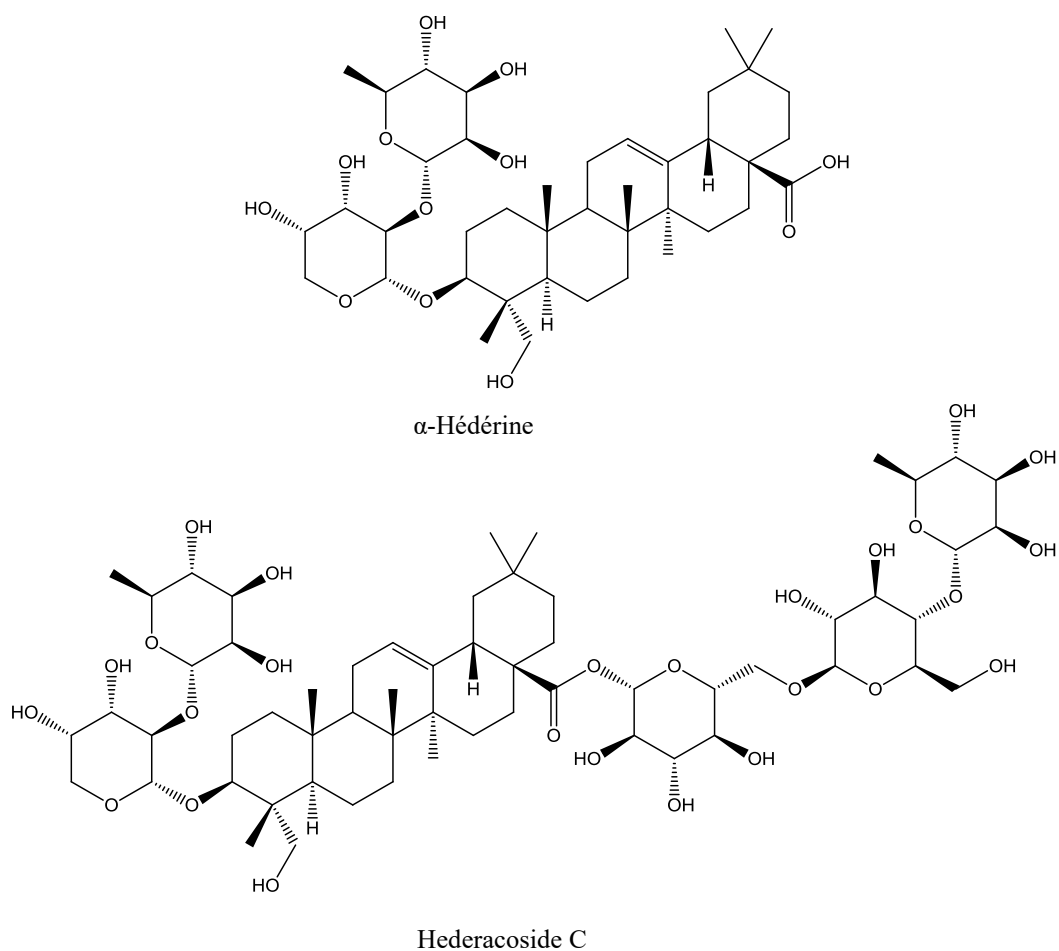


Figure 10 : Saponines triterpéniques présentes dans le lierre

1.2. Les fruits

Les quatre fruits sélectionnés sont : la cerise (*Prunus avium* L.), la pêche (*Prunus persica* L.), la quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) et la mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*). Les aspects botaniques et les aspects pharmaceutiques de chaque fruit sont étudiés par bibliographie.

1.2.1. La cerise (*Prunus avium* L.)

1.2.1.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Prunus avium* L.
- Origine : Amérique du Nord et Europe
- Famille : Rosacées
- Période de floraison : printemps
- Type de plante : arbre
- Couleur des fleurs : blanc
- Hauteur : 11 mètres
- Couleur des fruits : jaune au rouge et noir



1.2.1.2. Aspects pharmaceutiques

Des études approfondies ont montré que la cerise présente diverses activités biologiques, notamment des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimutagènes, anti-ulcératives et anticancéreuses [105]. De plus, la cerise a plusieurs effets pharmaceutiques positifs sur l'athérosclérose, les lésions oculaires, les lésions cardiaques, les lésions neuronales [106], l'anxiété, la goutte et le diabète [107]. Les cerises contiennent divers composés phénoliques qui contribuent aux qualités sensorielles et organoleptiques des fruits, telles que la couleur et le goût [108]. D'autre part, les composés phénoliques jouent un rôle primordial sur l'activité antioxydante de la cerise [109] [110] [111].

1.2.1.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Les composés antioxydants tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes jouent un rôle important dans les effets pharmaceutiques de la cerise [112] [113]. Les principaux acides phénoliques des cerises douces sont les acides hydroxycinnamiques, comme l'acide *p*-coumaroylquinique [114]. Les études de Ferguson et al. en 2005 [115] montre que l'acide

p-coumaroylquinique a la capacité de protéger les cellules humaines contre le stress oxydatif et la génotoxicité. Parmi les flavan-3-ols, l'épicatéchine a été détectée comme le principal composé appartenant à cette classe (Figure 11) [116]. Les catéchines luttent contre les radicaux libres, elles peuvent améliorer la pression artérielle et réduire le risque de maladie cardiovasculaire [117].

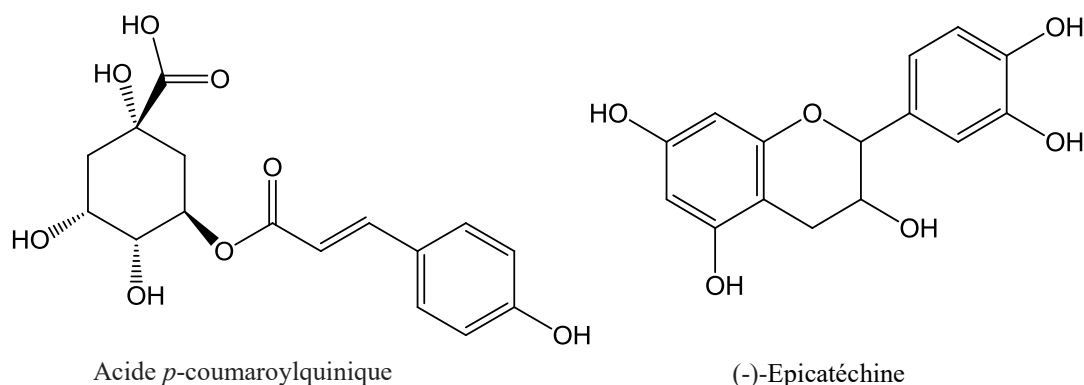


Figure 11 : Principaux composés antioxydants de la cerise

L'acide malique, un acide α -hydroxylé, est un composé caractéristique de la cerise [110]. Il existe également dans la pomme et son nom est dérivé du mot latin pour pomme (*Malus domestica*) [118]. Des études montrent que la consommation d'aliments riches en acide malique ou la supplémentation en acide malique peut aider à réduire les douleurs musculaires chez les personnes atteintes du syndrome de fatigue chronique [119]. L'autre composé caractéristique de la cerise douce est la procyanidine B2 (Figure 12) avec des activités pharmacologiques telles que antioxydantes [114].

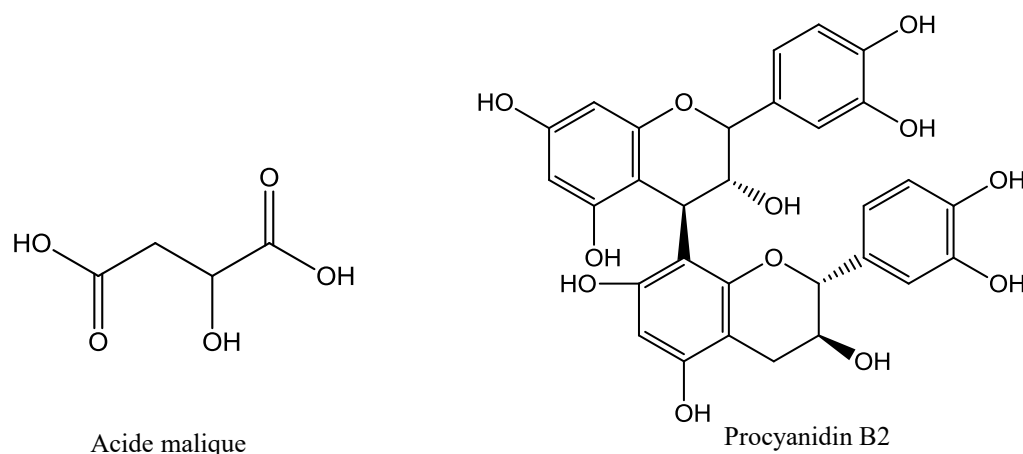


Figure 12 : Autres composés caractéristiques de la cerise

1.2.2. La pêche (*Prunus persica* L.)

1.2.2.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Prunus persica* L.
- Origine : Chine
- Famille : Rosacées
- Période de floraison : début du printemps
- Type de plante : arbre
- Couleur des fleurs : roses ou blanches
- Hauteur : de 2 à 7 mètres
- Couleur des fruits : jaune, orange ou rose



1.2.2.2. Aspects pharmaceutiques

Plusieurs études montrent que les activités pharmaceutiques de la pêche, telles que les activités antiallergiques, anti-inflammatoires [120], antibactériennes [121], hépatoprotectrices [122], chimiopréventives et anticancéreuses sont dues à la présence de composés phénoliques [123] [124].

1.2.2.3. Les composés bioactifs caractéristiques

La vitamine C et les caroténoïdes présents dans la pêche contribuent à augmenter ses capacités antioxydantes [125]. De plus, l'activité antioxydante de ce fruit est également grâce à sa teneur en composés phénoliques [126] [127]. Les acides hydroxycinnamiques tels que l'acide chlorogénique et les flavonols tels que le quercétine-3-glucoside ont été identifiés dans la pêche (Figure 13) [128] [129]. La quercétine-3-glucoside (Figure 13) possède une activité anti-inflammatoire [130]. Plus récemment, il a été rapporté que la quercétine-3-glucoside (Isoquercétine) a un potentiel prophylactique contre l'infection par le virus Ebola [131]. L'acide malique (Figure 12) est l'autre composé caractéristique dans la pêche [132].

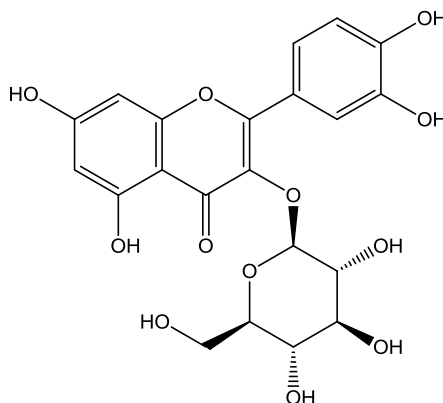


Figure 13 : Isoquercétine, le flavonoïde caractéristique de la pêche

1.2.3. La quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.)

1.2.3.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.
- Origine : Europe
- Famille : Rosacées
- Période de floraison : avril
- Type de plante : arbre
- Couleur des fleurs : blanches
- Hauteur : 6 mètres
- Couleur des fruits : violette



1.2.3.2. Aspects pharmaceutiques

Les quetsches sont connues pour diverses activités pharmaceutiques. Elles sont une source de la vitamine A, du calcium, du magnésium, du potassium et de fibres [133] et elles contiennent des quantités relativement importantes de glucides, constituant une source d'énergie. Elles sont utilisées en médecine comme sédatifs et pour la prévention de l'anémie, la maladie d'Alzheimer, l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires [134]. En plus, elles contiennent des quantités élevées d'antioxydantes [135] [136].

1.2.3.3. Les composés bioactifs caractéristiques

Les quetsches contiennent de grandes quantités de composés phénoliques, principalement de l'acide chlorogénique (Figure 5). Les composés phénoliques présents dans les quetsches peuvent servir d'agents préventifs contre les maladies chroniques telles que les maladies cardiaques et le cancer [137]. Les études de García-Mariño et al. en 2008 [138] montrent que la quetsche est riche de l'acide malique (Figure 12).

1.2.4. La mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*)

1.2.4.1. Aspects botaniques

- Nom latin : *Prunus domestica* subsp. *Syriaca*
- Origine : Europe
- Famille : Rosacées
- Période de floraison : début du printemps
- Type de plante : arbre
- Couleur des fleurs : blanches
- Hauteur : de 4 à 6 mètres
- Couleur des fruits : rouge ou jaune foncé



Ce fruit répandu spécialement en Région Lorraine. Près de 75% de la production mondiale de la mirabelle est originaire de Lorraine. En 1996, la mirabelle de Lorraine a obtenu le statut d'Indication Géographique Protégée (IGP), signe de la qualité du premier fruit étiqueté français.

1.2.4.2. Aspects pharmaceutiques

En raison de la rareté de ce fruit dans le monde, peu de recherches ont été menées à ce sujet. Cependant, il y a des études qui ont été effectuées sur les activités antioxydantes et antistress de ce fruit [139]. Certaines études ont confirmé les effets positifs de la mirabelle, des flavonoïdes présents dans les fruits, sur l'apprentissage et la mémoire [140] [141].

1.2.4.3. Les composés bioactifs caractéristiques

L'acide chlorogénique est l'un des composés phénoliques de la mirabelle, qui possède l'activité antioxydante [142] et l'activité anti-anxiété [139]. De plus, la présence des acides organiques tel que l'acide malique a été signalée. La mirabelle est riche en sucres et le contenu et les types de sucres contenus dans ce fruit ont été déterminés [138].

2. Les métabolites

Une cellule végétale produit deux types de métabolites pouvant être divisés en deux catégories principales selon l'origine et la fonction ; à savoir, les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont impliqués directement dans la croissance et le métabolisme, tandis que les métabolites secondaires sont considérés comme des produits finaux du métabolisme primaire et ne sont pas impliqués dans l'activité métabolique.

2.1. Les métabolites primaires

Les molécules indispensables à la croissance physiologique normale des plantes composent le métabolisme primaire. Le métabolite primaire est généralement un élément clé dans le maintien des processus physiologiques normaux et il est souvent appelé métabolite central. Les métabolites primaires sont largement répandus dans la nature et sont également utilisés comme nourriture par l'homme. Ce sont des produits fabriqués en continu pendant la phase de croissance exponentielle. Ils interviennent dans les processus métaboliques primaires tels que la respiration et la photosynthèse. Les principaux métabolites primaires sont les lipides, les sucres et les acides α -aminés [143].

2.1.1. Les lipides

Ce sont des molécules organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène, le chloroforme ou l'éther. Ils sont caractérisés par la présence de différents résidus d'acides gras conduisant à la variation structurelle des lipides. Parmi les lipides, on compte également les cécides, les stérols, les vitamines liposolubles (telles que les vitamines A, D, E et K), les glycérides et les phospholipides.

En général, les cinq types différents de classes de lipides sont :

- Les triacylglycérols : ils rassemblent les triglycérides qui sont des triesters du glycérol et d'acides gras.
- Les cécides : ce sont des lipides naturels constitués d'un ester d'acide gras et d'alcools aliphatiques. Les deux parties (l'acide gras et l'alcools) sont généralement de longues chaînes (C16 et C18) [144].

- Les phosphoglycérider : un phosphoglycérider ou un phosphatide est un phospholipide constitué de deux résidus d'acide gras estérifiant un résidu de glycérol lié à un résidu de phosphate [145].
- Les sphingolipides : ils sont constitués d'un squelette à base de sphingosine et d'un acide gras qui est rattaché à la sphingosine par une liaison amide [146].
- Les stérols : l'anneau des stérols est commun à tous les stérols et les différences sont dans la chaîne latérale. Le cholestérol est exclusivement un stérol animal. Plus de 40 stérols végétaux (ou phytostérols) ont été identifiés [147].

2.1.2. Les sucres

Les sucres, également appelés hydrates de carbone, sont constitués de monomères appelés saccharides, parmi ces saccharides les plus courants sont les hexoses composés de six atomes de carbone : le D-glucose, le D-fructose, le D-galactose. Suivant le nombre de monomères polymérisés on parle d'oligosaccharides ($n \leq 10$) tels que le verbascose, la raffinose ou le saccharose et de polysaccharides ($n > 10$) tels que la cellulose ou l'amidon. Les sucres à longues chaînes ou polysaccharides, n'ont pas de saveur sucrée en raison de leur taille. Les sucres sont comme les éléments de structure chez les plantes et servent de réserves d'énergie naturelle dans les organismes vivants. D'autre part, ils jouent un rôle important dans la structuration et le fonctionnement des cellules. Les monosaccharides se convertissent en polysaccharides (la cellulose et la pectine) pour la construction de la paroi cellulaire [148].

2.1.3. Les acides α -aminés

Leur nom provient du fait qu'ils possèdent une fonction amine et une fonction acide carboxylique. Lorsque la fonction amine et la fonction acide carboxylique sont portées par le même atome de carbone, on parle d'acide α -aminé. Ils se distinguent par leur chaîne latérale, R, qui peut être un simple atome d'hydrogène (c'est la glycine), ou bien plus complexe. Les acides α -aminés jouent un rôle décisif dans la structure, le métabolisme et la physiologie des cellules, en tant que constituants des peptides (polymères d'acides α -aminés) et des protéines (d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques). Environ 500 acides α -aminés sont connus mais les protéines sont fabriquées uniquement à partir de 20 d'acides α -aminés [149]. Parmi les 20 acides α -aminés normalement incorporés dans les protéines, seulement 11 peuvent être synthétisés par des animaux adultes. Les 9 acides α -aminés restants, qui sont "essentiels",

doivent être apportés par le régime alimentaire. Les plantes et la majorité des bactéries et des champignons ont la capacité de synthèse des 20 acides α -aminés [150]. Certains acides α -aminés sont utilisés dans les plantes comme moyen de défense contre les herbivores [151].

2.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés qui ne jouent aucun rôle fondamental dans le maintien des processus vitaux des plantes, mais ils sont importants pour que la plante interagisse avec son environnement [152]. Les plantes se protègent en produisant des métabolites secondaires qui défendent la plante contre une variété d'herbivores et de microorganismes pathogènes, ainsi que contre divers types de stress environnementaux [153]. Ils sont largement utilisés à des fins médicales, pharmaceutiques ou agricoles [154]. Les métabolites secondaires peuvent être classés en 4 groupes chez les plantes : les alcaloïdes, les terpénoïdes, les saponines et les composés phénoliques.

2.2.1. Les alcaloïdes

2.2.1.1. Généralités

Les alcaloïdes sont un groupe de composés chimiques naturels existant dans une grande variété d'organismes, y compris les plantes. Ils sont principalement impliqués dans la défense des plantes contre les herbivores et les agents pathogènes [155]. Le nom d'alcaloïde vient de "alcalin" qui a été utilisé pour décrire tout composés contenant de l'azote. Ils ont un goût amer et sont souvent des substances optiquement actives, incolores, cristallines ou liquides à la température ambiante. Au 19ème siècle, Friedrich Serturmer a isolé la morphine et ceci a conduit à l'isolation et à la découverte des autres alcaloïdes comme la caféine et la nicotine (Figure 14) [156].

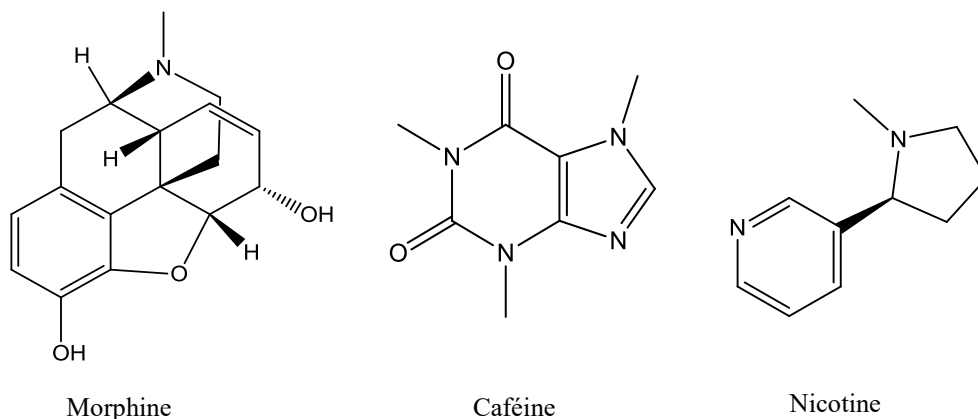


Figure 14 : Exemples d'alcaloïdes

Aujourd'hui, environ 12000 alcaloïdes sont connus [157]. La classification des alcaloïdes dépend de deux paramètres : la position de l'atome d'azote dans la structure (les différentes fonctions qui en résultent) et la famille de plantes dont ils sont extraits (90% des alcaloïdes sont dérivés des plantes). En total, trois grands groupes d'alcaloïdes sont classifiés puis divisés en plusieurs sous familles (Figure 15) :

- Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. La cocaïne est le plus connu de cette catégorie.
- Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. La conine est un pseudo-alcaloïde.
- Les proto-alcaloïdes sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Un alcaloïde connu de cette classe est l'adrénaline.

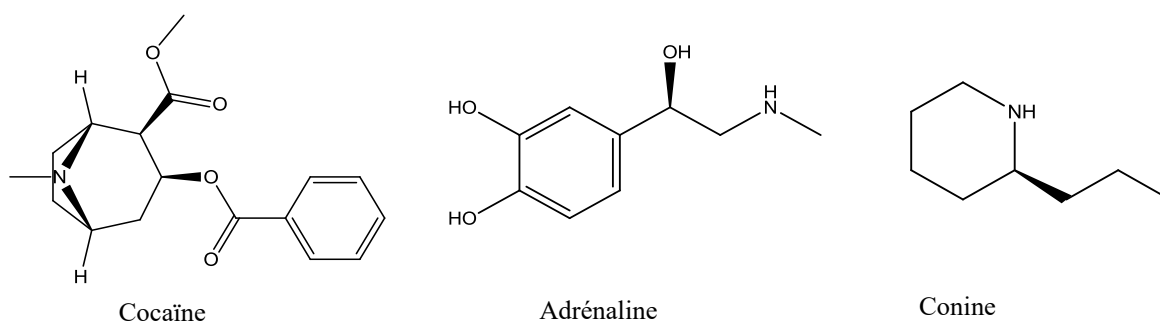


Figure 15 : Exemples d'alcaloïde vrai (Cocaïne), de pseudo-alcaloïde (Conine) et de proto-alcaloïde (Adrénaline)

2.2.1.2. Aspects biologiques

La plupart des alcaloïdes possèdent une action biologique, le plus souvent sur le système nerveux. Les anciens utilisaient des extraits de plantes contenant des alcaloïdes pour traiter un grand nombre d'affections, notamment : morsure de serpent ou fièvre. Les alcaloïdes ont profondément influencé l'histoire humaine en raison de leur large gamme d'effets physiologiques et de leur propriétés pharmacologiques [158] ; par exemple, les alcaloïdes sont connus pour leurs propriétés myorelaxantes [159]. En plus, ils possèdent également des activités antioxydantes [160] [161], anticancéreuses [162], antimicrobiennes [158] et anti-hyperglycémiques [163]. Les alcaloïdes végétaux purs et isolés et leurs dérivés synthétiques sont utilisés comme agents médicaux fondamentaux dans le monde entier pour la production de produits pharmaceutiques dérivés de plantes [164].

2.2.2. Les terpénoïdes

2.2.2.1. Généralités

Les terpénoïdes, également connus sous le nom d'isoprénoïdes, constituent la classe de métabolites secondaires la plus vaste et la plus répandue, principalement chez les plantes [165]. La majorité de ces composés possèdent des structures cycliques différentes les unes des autres. Leur différence provient non seulement des groupes fonctionnels mais également de la structure de leur squelette hydrocarboné. Tous les terpénoïdes peuvent être considérés comme dérivés de l'isoprène (ramifié C5 de base). Selon le nombre d'unités d'isoprène (C5) présentes dans la molécule, les terpénoïdes sont classés en :

- Hémiterpénoïdes
- Monoterpénoïdes avec 10 atomes de carbone comme le menthol ($C_{10}H_{20}O$).
- Sesquiterpénoïdes avec 15 atomes de carbone comme le cadinène ($C_{15}H_{24}$).
- Diterpénoïdes avec 20 atomes de carbone comme le cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$).
- Triterpénoïdes avec 30 atomes de carbone comme l'hopane ($C_{30}H_{52}$).
- Tétraterpénoïdes avec 40 atomes de carbone comme la cryptoxanthine ($C_{40}H_{56}O$).
- Polyterpénoïdes un plus grand nombre d'unités d'isoprène.

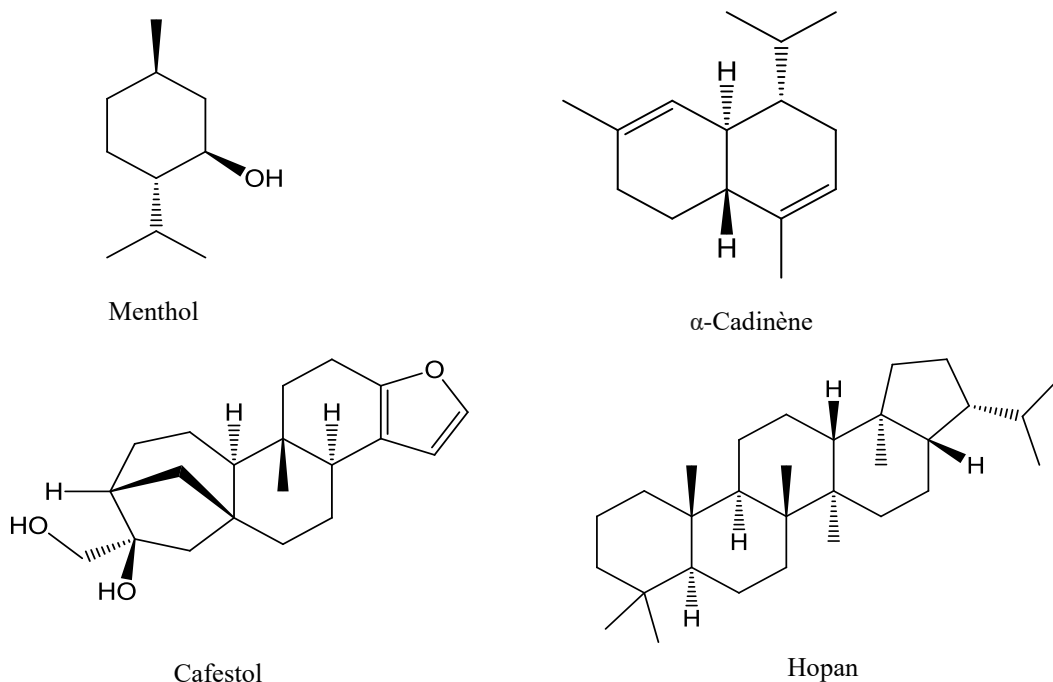


Figure 16 : Exemples de terpénoïdes

2.2.2.2. Aspects biologiques

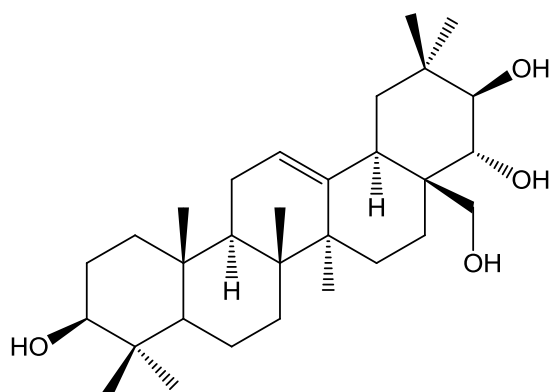
Plusieurs études in vitro, précliniques et cliniques, ont confirmé que les différents terpénoïdes contribuent aux différentes activités pharmaceutiques. Des études montrent que les terpénoïdes possèdent une activité antibactérienne [166]. Les diterpénoïdes présentent un large éventail de propriétés pharmacologiques [167] notamment anti-inflammatoires [168], antivirales et anticancéreuses [169]. Les phénols terpénoïdes montrent une activité antifongique [170].

2.2.3. Les saponines

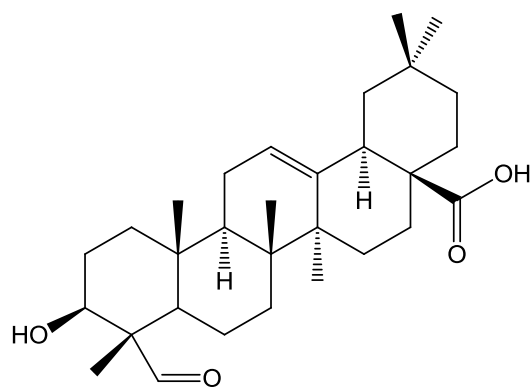
2.2.3.1. Généralités

Les saponines sont des composés phytochimiques qui peuvent être trouvés dans la plupart des légumes et des herbes. Elles font partie des métabolites secondaires et servent de défense à la plante. Elles sont principalement distribuées dans le règne végétal [171] mais sont également présentes dans les organismes marins comme le concombre de mer [172]. Les saponines sont des composés non-volatils et stables au traitement thermique. Le nom saponine est dérivé du mot latin *Sapo*, qui signifie savon ; les saponines dans l'eau forment une solution moussante. L'utilisation multiséculaire de certaines plantes contenant des saponines comme la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) est due à leur tensioactivité [173].

Les saponines sont composées d'une unité aglycone ou sapogénine liée à une ou plusieurs chaînes glucidiques. La sapogénine peut être constituée d'un stérol ou d'un triterpène ; les saponines sont donc classées en deux groupes selon leur sapogénine : les saponines triterpéniques et les saponines stéroïdiennes. Les saponines triterpéniques possèdent un sapogénine à 30 atomes de carbone avec une double liaison qui est habituellement présente entre le carbone 12 et 13. Le saniculagenine C ($C_{30}H_{50}O_4$) et le gypsogénine ($C_{30}H_{46}O_4$) sont deux sapogénines triterpéniques (Figure 17). Les saponines stéroïdiennes possèdent une sapogénine à 27 atomes de carbone, qui comportent phytostérol. Le furostanole ($C_{27}H_{46}O_3$) et le spirostanole ($C_{27}H_{44}O_3$) sont deux sapogénines stéroïdiennes (Figure 18).

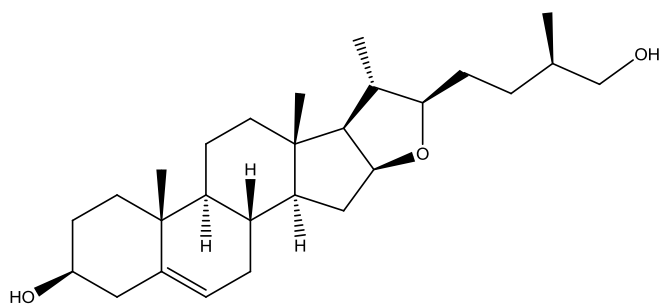


Saniculagenine C

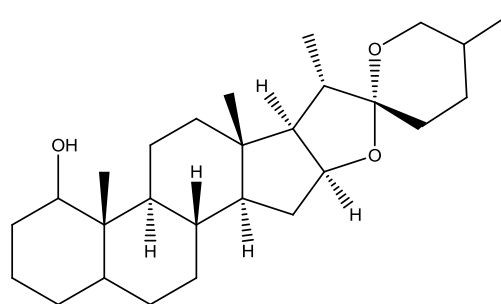


Gypsogenine

Figure 17 : Exemples de sapogénines triterpéniques



Furostanole



Spirostanole

Figure 18 : Exemples de sapogénines stéroïdiennes

Les sucres dans la structure des saponines peuvent être constitués d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Le glucose et le galactose sont parmi les sucres les plus communs de ces chaînes latérales. Une autre classification de la saponine est basée sur le nombre de sites de la sapogénine qui se sont liés aux oligosaccharides. Les monodesmosides n'ont qu'un site de sapogénine qui se lie aux chaînes de saccharides (l' α -hédérine) alors que les bidesmosides possèdent deux sites de sapogénine qui se lient aux chaînes de saccharide (l'hédéracosite C) (Figure 10).

Les propriétés tensioactives ou détergentes des saponines peuvent être expliquées par l'aglycone qui constitue la partie hydrophobe (ou liposoluble) des saponines et les sucres constituent la partie hydrophile.

L'intérêt croissant des saponines qui sont des produits naturels, est dû à leurs propriétés physicochimiques (surfactant) ainsi qu'à leurs activités biologiques (telles que l'activité anticancéreuse et anti cholestérol). Ceci explique l'émergence des saponines en tant que composés commercialement importants avec des applications en expansion dans les secteurs alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [174].

2.2.3.2. *Aspects biologiques*

De nombreuses espèces de plantes à forte teneur en saponine sont utilisées en médecine traditionnelle [173]. Selon Newman et al. en 1958 [175] et Malinow et al. en 1977 [176], les saponines réduisent les risques d'accidents cardiovasculaires en raison de leur capacité à diminuer les taux de cholestérol et de graisse corporelle. De plus, elles possèdent des propriétés pharmaceutiques, elles sont connues pour leur activité anticancéreuse car elles éliminent les bactéries pathogènes, atténuent le stress oxydatif et inhibent la croissance tumorale [177] [178]. Les saponines peuvent être directement toxiques pour les cellules cancéreuses [179]. L'effet anti-inflammatoire et l'activité antimicrobienne sont les deux autres propriétés pharmaceutiques importantes des saponines [180] [181].

2.2.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules organiques qui sont très représentées dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par des composés aromatiques portant un groupe hydroxyle comme les phénols simples ou plusieurs groupes hydroxyles comme les polyphénols. Les acides polyphénoliques, les flavonoïdes et les tanins font partis de la famille des composés polyphénoliques [182] (Figure 19).

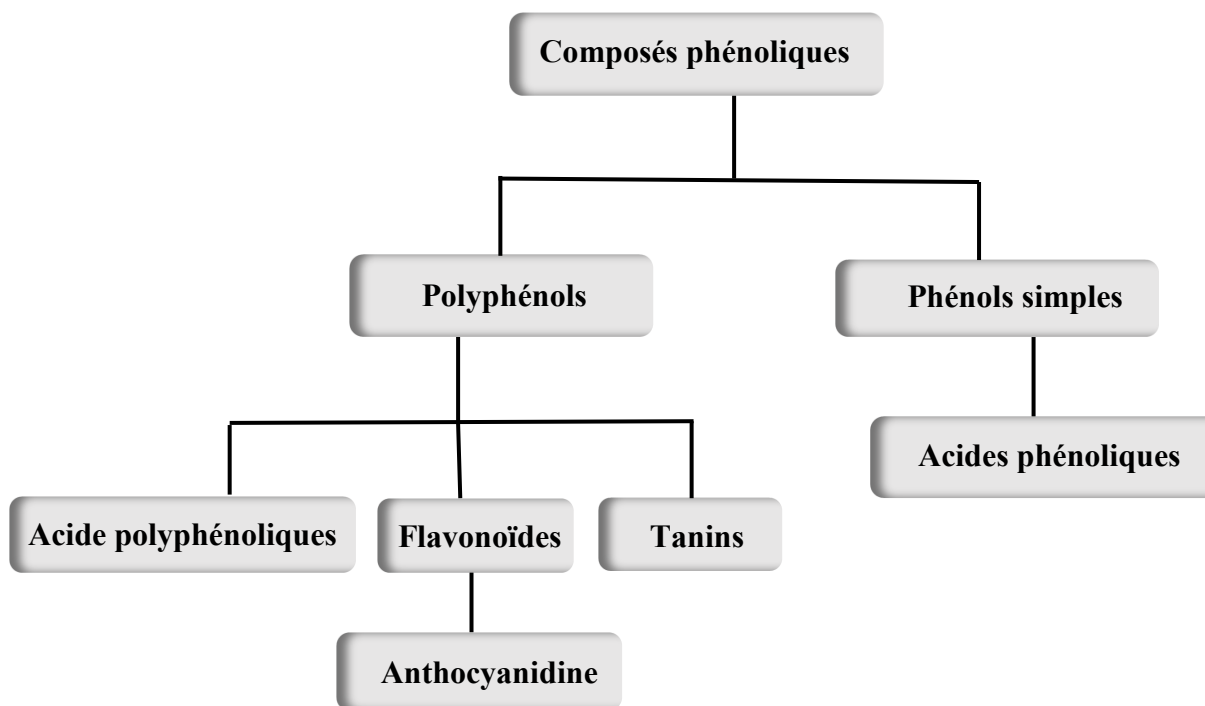


Figure 19 : Famille des composés phénoliques

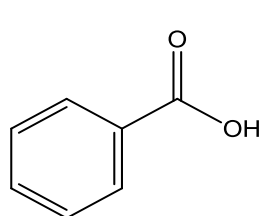
2.2.4.A. Les acides phénoliques et polyphénoliques

2.2.4.A.1. Généralités

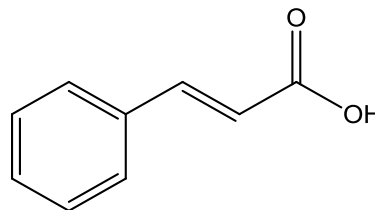
Les acides phénoliques (ou acides phénolcarboxyliques) sont les principaux composés phénoliques produits par les plantes. Ces composés possèdent un cycle phénolique et au moins une fonction acide carboxylique. Ils sont une sous-classe de la catégorie des composés phénoliques, présents dans les plantes sous forme d'esters ou de glycosides conjugués à d'autres composés naturels tels que les flavonoïdes, les alcools, les acides gras hydroxylés, les stérols et les glucosides. Ils sont présents sous forme d'aglycones libres et liés sous forme conjuguée, souvent avec un hydrate de carbone [183]. Selon le nombre d'unités de carbone de la chaîne latérale liées au cycle phénolique, les acides phénoliques peuvent être divisés en composés C6 – C3, C6 – C2 et C6 – C1.

Un groupe important mais souvent négligé des acides phénoliques correspond aux dérivés de l'acide hydroxycinnamique ou l'acide coumarique (C6 – C3), que l'on trouve dans presque toutes les plantes et qui font donc partie intégrante de notre régime [184]. Le principal acide hydroxycinnamique est l'acide férulique (Figure 21).

Les acides hydroxybenzoïques (C6 – C1), sont une autre classe d'acides phénoliques relativement courants dans les plantes [185]. Dans l'alimentation, les 2 principaux acides hydroxybenzoïques sont l'acide vanillique et l'acide salicylique (Figure 21).

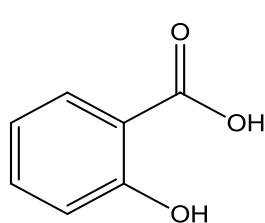


Acide benzoïque

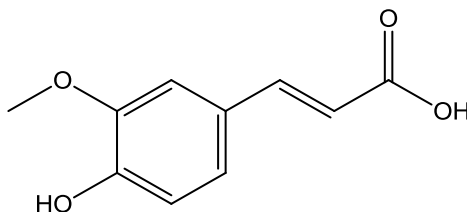


Acide cinnamique

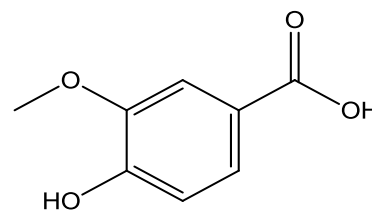
Figure 20 : Molécules de base permettant la synthèse d'acides phénoliques



Acide salicylique



Acide férulique



Acide vanillique

Figure 21 : Exemples d'acides phénoliques

Les acides polyphenoliques possèdent un cycle phénolique avec plus qu'un group hydroxyle et au moins une fonction acide carboxylique. Ils sont également une sous-classe de la catégorie des composés phénoliques. Comme les acides phénoliques, ils sont classifiés en deux groupes suivants :

- Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique comme l'acide caféique et l'acide chlorogénique (Figure 22).
- Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque comme l'acide gallique (Figure 22).

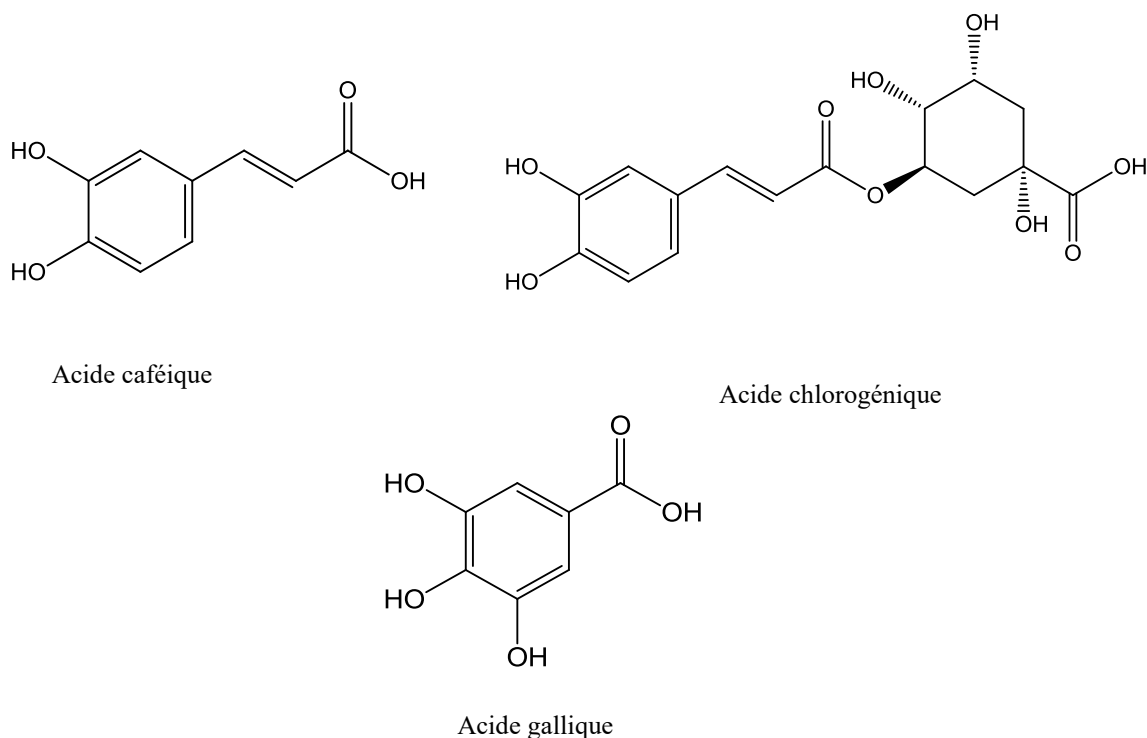


Figure 22 : Exemples d'acides polyphénoliques

2.2.4.A.2. Aspects biologiques

De nombreux effets biologiques de ces composés ont déjà été signalés, tels que des propriétés anti-inflammatoires [186], antivirales, antibactériennes [187], anti-radicalaires [188] et anti-carcinogènes. Les polyphénols sont très importants en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils agissent en tant qu'antioxydants naturels et ont plus d'intérêt en tant qu'anticarcinogène, ils sont utilisés pour la prévention et le traitement des cancers [189]. D'autre part, leur effet inflammatoire est prouvé [190]. Les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique utilisent également les polyphénols comme additifs [191] [192].

2.2.4.B. Les flavonoïdes

2.2.4.B.1. Généralités

Les flavonoïdes fournissent une grande partie de l'arôme et de la couleur des fruits et légumes. Plus de 5000 flavonoïdes différents ont été décrits dans la littérature [193]. Les flavonoïdes appartiennent à un groupe de substances naturelles aux structures phénoliques variables et se trouvent dans les fruits, les légumes, les céréales, l'écorce, les racines, les tiges et les fleurs [194].

En 1930, une nouvelle substance a été isolée à partir d'oranges, elle a été nommée vitamine P. Quand il est devenu évident que cette substance était un flavonoïde (rutine), des recherches ont commencé pour tenter d'isoler les différents flavonoïdes et étudier leurs propriétés [195]. Les flavonoïdes possèdent un squelette de base phényl-benzopyrone en C15. Ils désignent une série de composés dans lesquels deux cycles benzéniques (les cycles A et B) sont reliés l'un à l'autre par 3 atomes de carbone. Selon la position relative des deux cycles aromatiques C6 (les cycles A et B), il existe deux familles d'isomères naturels : les isoflavonoïdes et les néoflavonoïdes (Figure 23).

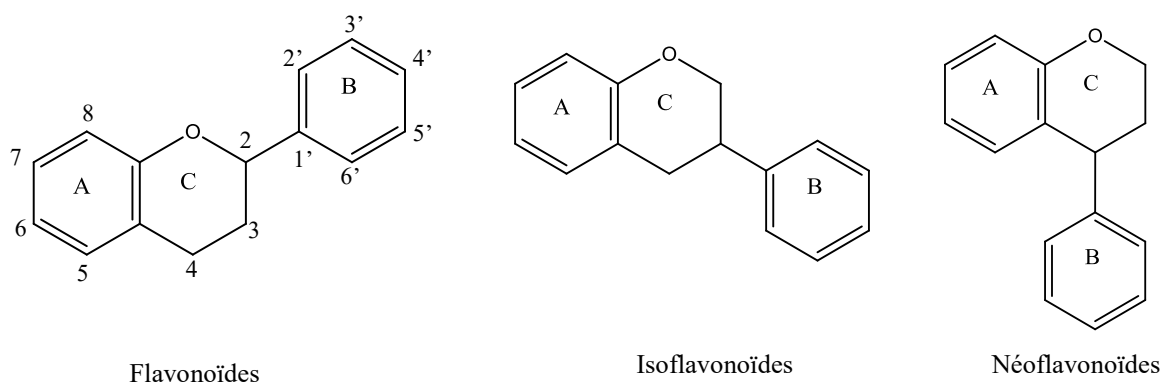


Figure 23 : Flavonoïdes et ses isomères naturels

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en différentes classes (Figure 24), telles que les flavanols (flavan-3-ol, flavan-4-ol et flavan-3,4-diol), les flavanones, les flavanonols, les flavones et les flavonols. Les flavonols et les flavones sont caractérisés par une structure plane en raison d'une double liaison dans le cycle aromatique central (C). Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et / ou 5'. Généralement, un ou plusieurs de ces

groupes hydroxyles sont méthylés, acétylés, prénylés ou portent un sulfate. La plupart des flavonoïdes présents dans les plantes sont liés aux sucres (glycosides), bien qu'ils se retrouvent parfois sous forme aglycone. Les anthocyanidines sont des sels de flavonoïdes (flavylium).

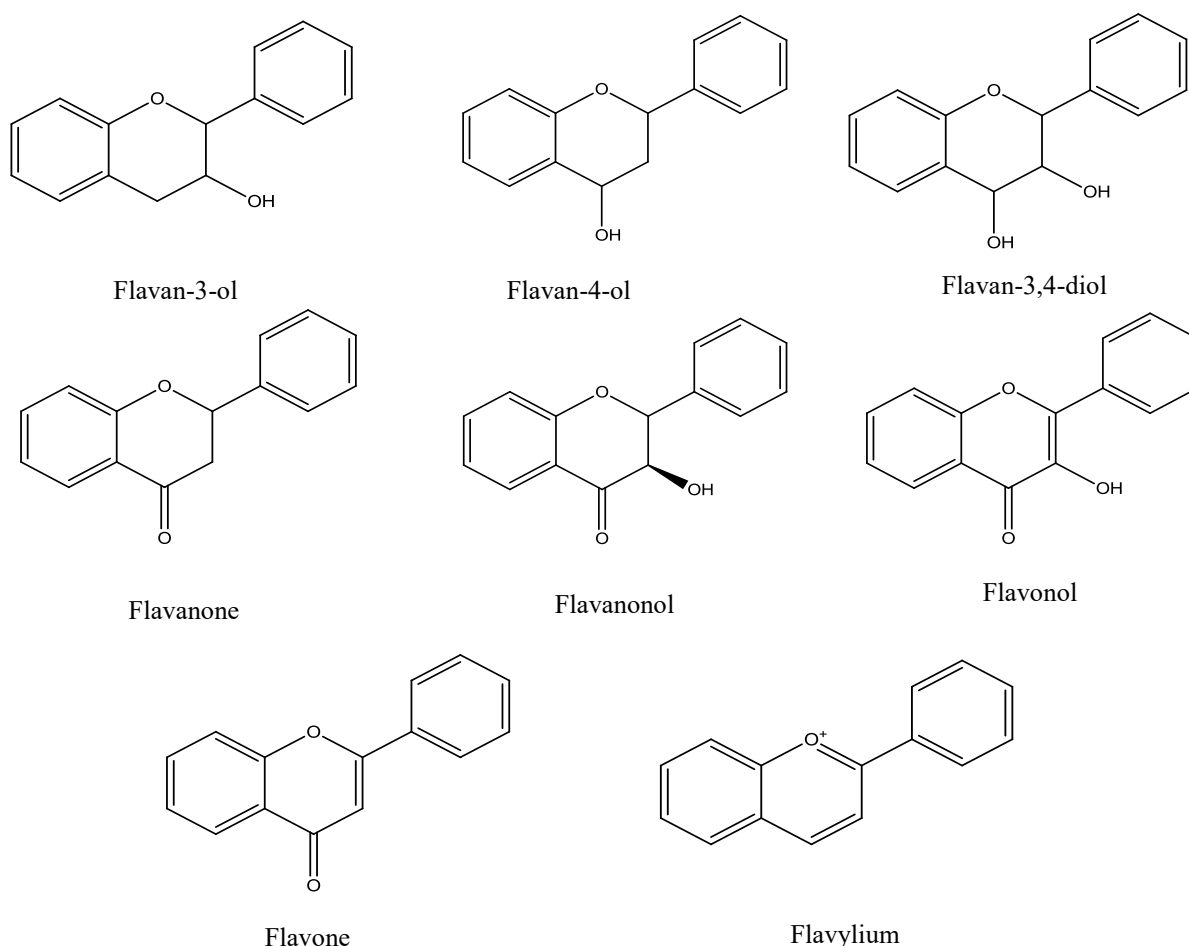


Figure 24 : Différentes classes des flavonoïdes

2.2.4.B.2. Aspects biologiques

Les flavonoïdes ont un potentiel élevé d'activité biologique. Les effets thérapeutiques supposés de nombreux médicaments traditionnels peuvent être attribués à la présence de flavonoïdes. On suppose que les effets biologiques et surtout pharmacologiques des flavonoïdes résultent principalement de deux propriétés, l'une inhibe certaines enzymes et l'autre manifeste une activité antioxydante [196]. La propriété la plus étudiée des flavonoïdes est leur capacité à agir en tant qu'antioxydants par le piégeage des radicaux libres, surtout ceux qui dérivent de l'oxygène [197] [198].

Les flavonoïdes possèdent aussi des effets anticancéreux et antitumoraux [199] [200]. Les systèmes expérimentaux *in vitro* ont également révélé que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antiallergique, antihémorragiques et hépatoprotecteurs [201] [202]. Des études épidémiologiques suggèrent un rôle protecteur des flavonoïdes alimentaires contre les maladies coronariennes. L'association entre la consommation de flavonoïdes et les effets à long terme sur la mortalité a été étudiée et il a été suggéré que la consommation de flavonoïdes est inversement corrélée à la mortalité par maladie coronarienne [203]. L'activité antivirale des flavonoïdes a été démontrée dans une étude par Wang et al. en 1998 [204] et aujourd'hui, en raison de la propagation du VIH, les recherches sur l'activité antivirale des flavonoïdes porte principalement sur ce virus.

2.2.4.B.3. Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont des flavonoïdes qui portent une charge positive sur l'oxygène de l'hétérocycle central, cette charge peut être délocalisée par effet mésomère sur la majeure partie du squelette du flavonoïde. Ils représentent une sous-classe des flavonoïdes. Ce sont des pigments naturels, basés sur la structure de l'ion flavylum. Ils se trouvent dans les feuilles, les pétales et les fruits tels que la myrtille, la mûre, la cerise, le raisin noir, l'orange sanguine et la prune. Les anthocyanidines jouent un rôle important dans la protection de la plante contre les rayons UV [205]. Leurs dérivés hétérosides sont appelés anthocyanes, anthocyanosides ou encore anthocyanines et plus de 540 pigments d'anthocyanines ont été identifiés dans la nature [206]. La cyanidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine sont les anthocyanidines les plus connus (Figure 25).

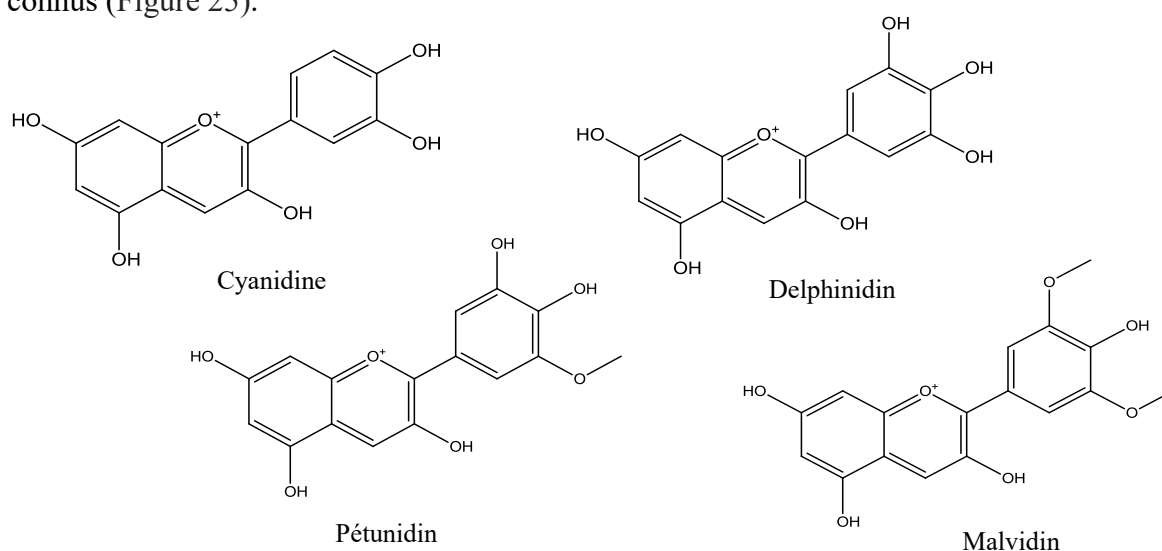


Figure 25 : Exemples d'anthocyanidines

2.2.4.B.4. Les chalcones et les aurones

D'autres composés naturels possédant une structure C6-C3-C6 sont considérés comme des flavonoïdes mineurs, ce sont les chalcones et les aurones (Figure 26).

Les aurones sont des composés naturels ou synthétiques, elles sont isomères aux flavones et donnent une couleur jaune vif aux plantes dans lesquelles elles se produisent [207].

La chalcone est une cétone aromatique, c'est une molécule à chaîne ouverte portant deux cycles aromatiques liés par un fragment énone à trois carbones. Les variétés de chalcone appelées chalconoïdes sont des composés biologiques importants. Nombre de ces molécules présentent des activités biologiques bénéfiques, notamment des propriétés antibactériennes [208], anti-inflammatoires [209], anti-tumorales [210] et antimutagènes [211].

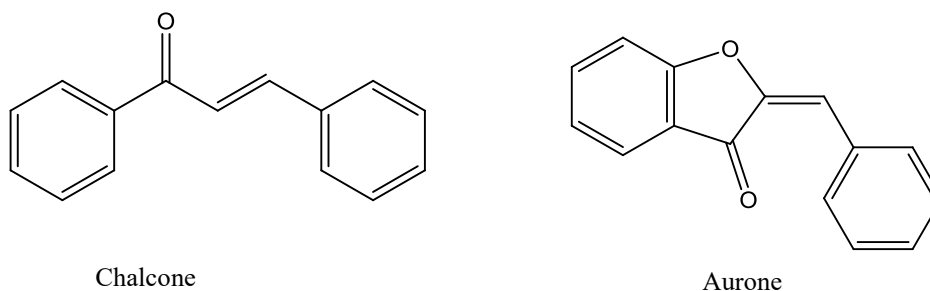


Figure 26 : Structure générale d'une chalcone et d'une aurone

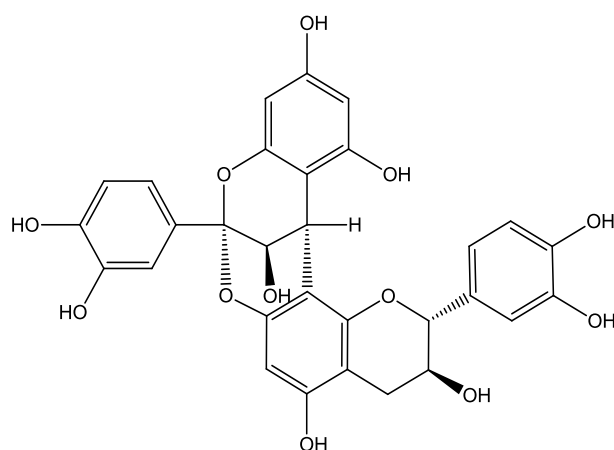
2.2.4.C. Les tanins

2.2.4.C.1. Généralités

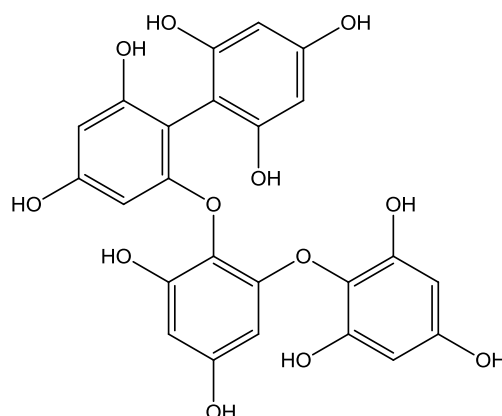
Le groupe de composés phénoliques appelés tanins se distingue nettement des autres composés phénoliques végétaux secondaires par leur activité chimique et leur activité biologique. Les tanins sont largement présents dans différentes parties des plantes ; ils jouent un rôle important dans la protection de la plante contre la prédation (y compris sous la forme de pesticides) et peuvent aider à la croissance des plantes. Haslam a substitué en 1989 le terme polyphénols au terme tanins [212]. Donc, ils sont considérés comme des polyphénols en raison du grand nombre de groupes phénoliques dans leurs structures [213]. Les tanins peuvent être classés en fonction de leurs structures chimiques ou de leur solubilité en milieu aqueux.

Selon la structure des tanins, ceux-ci sont classés en proanthocyanidines (ou tanins condensés), en tanins hydrolysables, en tannins complexes et en phlorotannins.

- Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont non hydrolysables, ce sont des polymères de dérivés flavonols, ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons C-C, leur poids moléculaire peut varier de 3000 à plus de 30000 [214]. L'un des tanins condensés qui est un dimer de flavan-3-ols est la procyanidine A1 (Figure 27).
- Les tanins hydrolysables (décomposables dans l'eau, avec laquelle ils réagissent pour former d'autres substances) sont des acides phénoliques liés à un saccharide par un lien ester (donc hydrolysable). Ce sont des composés polyphénoliques de poids moléculaires compris entre 500 et plus de 3000 [214]. Les tannins hydrolysables sont :
 - Les gallotanins : Ils sont formés autour d'un sucre comportant plusieurs liaisons esters avec des acides galliques, le phénol lié à un résidu sucré est l'acide gallique.
 - Les ellagitanins : Ils sont formés d'au moins deux unités d'acide gallique C-C couplées entre elles (l'acide hexahydroxydiphénique).
- Les tanins complexes : Ils sont formés par une unité gallotanin ou ellagitanin comportant une liaison glycosidique.
- Les phlorotannins qui se trouvent dans les algues marines comme le fucodiphlorethol G [215] (Figure 27).



Procyanidine A1



Fucodiphlorethol G

Figure 27 : Exemples des tanins condensés et des phlorotannins

2.2.4.C.2. *Aspects biologiques*

Les recherches montrent que certains cancers, tels que le cancer de l'œsophage, sont liés à la consommation d'aliments riches en tanins, suggérant que les tanins pourraient être cancérigènes [216]. Cependant, le potentiel anticancéreux et antimutagènes des tanins peuvent être liés à leur propriété antioxydante, qui est importante pour la protection des dommages oxydatifs cellulaires [217]. Les activités antimicrobiennes des tanins sont également détaillées dans la littérature [218] [219].

3. Activité antioxydante

Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les espèces réactives de l'azote (RNS) sont des molécules hautement réactives qui sont générés par les processus cellulaires normaux, les contraintes environnementales et l'irradiation UV. Les radicaux libres réagissent avec les composants cellulaires, l'ADN, les glucides, les protéines et les lipides et causent divers troubles dégénératifs, tels que la mutagenèse, la carcinogenèse, les troubles cardiovasculaires et le vieillissement [220].

Les antioxydants sont des composés qui inhibent l'oxydation et combattent les radicaux libres en intervenant sur le déroulement du processus oxydatif, à savoir l'initiation, la propagation et la terminaison [221]. Les défenses endogènes contre les radicaux libres ne suffisent pas pour rétablir la balance homéostatique, d'où la nécessité d'un apport d'antioxydants complémentaires à l'aide d'un régime alimentaire ou pharmaceutique. Cependant, certains antioxydants synthétiques sont suspectés de présenter des effets négatifs sur la santé humaine. Par conséquent, consommer des antioxydants provenant de matrices alimentaires est la meilleure façon de rétablir l'homéostasie [222].

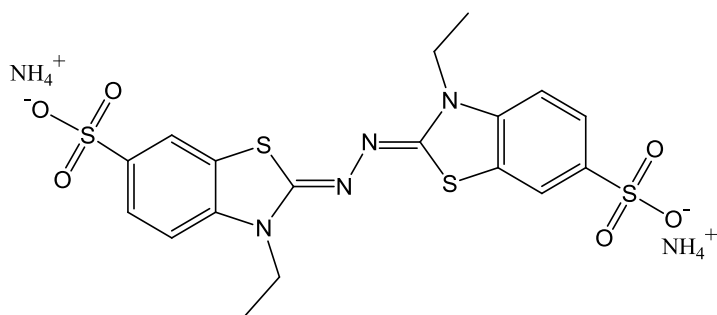
De nombreuses sources d'antioxydants d'origine végétale ont été étudiées ces dernières années. Il est important d'identifier les antioxydants contenus dans les aliments afin d'évaluer leur efficacité à nous protéger contre les dommages oxydatifs. Parmi les différentes méthodes qui permettent d'évaluer l'activité antioxydante [223], il existe deux dosages couramment utilisés, celui du radical-cation de l'ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) et celui du radical du DPPH[•] (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) [224].

3.1. Dosage du radical-cation de l'ABTS^{•+}

Le test ABTS^{•+} peut être utilisé pour déterminer la capacité antioxydante totale de fluides biologiques, de cellules et de tissus. Il peut également être utilisé pour doser l'activité antioxydante de substances naturelles issues de matrices végétales ou de composés synthétiques destinés à être utilisés comme compléments alimentaires. La méthode peut être utilisée pour une large gamme de pH. De plus, le radical ABTS^{•+} est stable et soluble dans l'eau et les solvants organiques, ce qui permet de déterminer la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles.

La méthode consiste à produire le radical cationique ABTS^{•+} par oxydation du sel ABTS à l'aide du AAPH (chlorhydrate de 2,2'-azobis (2-amidinopropane)) (Figure 28). La solution de l'ABTS^{•+} avec la couleur bleu/vert a une forte absorption à des longueurs d'onde longues. La réaction de ce radical sur des antioxydants peut être facilement observée par la diminution de l'absorbance de la solution à 735 nm [225].

L'évaluation de l'activité antioxydante avec le test de l'ABTS^{•+} est basée sur le contrôle spectrophotométrique de la réduction du radical de l'ABTS^{•+} par réaction énergétique avec des molécules capables de donner des atomes d'hydrogène ou des électrons, tels que des composés phénoliques. Pendant cette réaction, par piégeage d'un proton de l'antioxydant par l'ABTS^{•+}, le radical cationique se réduit en cation ABTS⁺ (une solution incolore). Différents antioxydants tels que le trolox ou la vitamine C peuvent être utilisés comme étalon. En construisant une gamme étalon puis en rapportant l'absorbance de l'échantillon sur la courbe d'étalonnage, la capacité antioxydante de l'échantillon est déterminée en milligrammes d'équivalent d'étalon par gramme de matériel sèche [226]. La Figure 28 montre le mécanisme de la réaction l'ABTS^{•+} avec le trolox.



ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiaziline-6-sulfonate)
(Incolore)

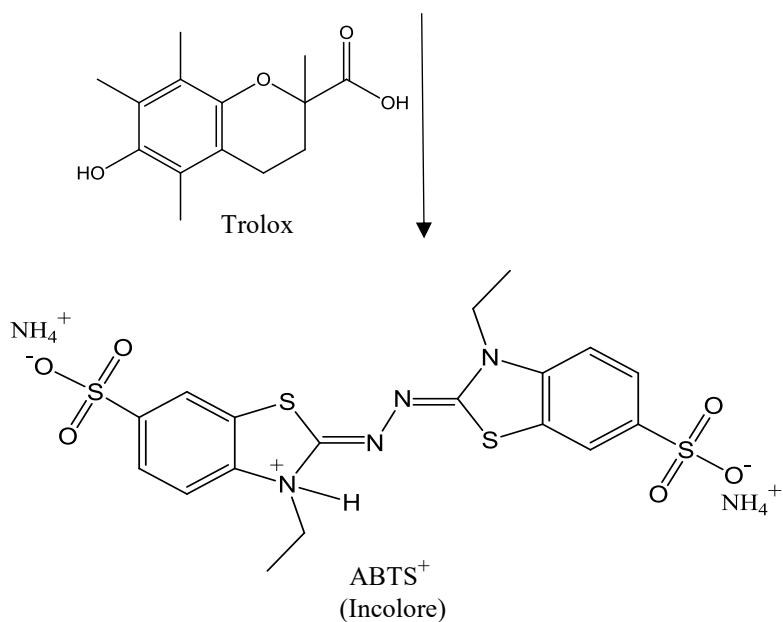
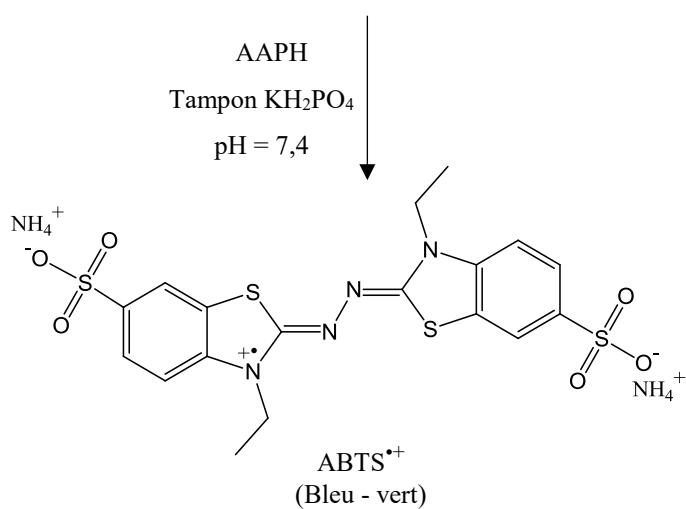


Figure 28 : Réaction entre l' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ et le trolox

3.2. Dosage du radical du DPPH

La méthodologie DPPH a été développée par Brand-Williams et al. en 1995 [227]. Le DPPH[•] est caractérisé comme un radical libre stable en raison de la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule, de sorte que les molécules ne dimérisent pas, comme ce serait le cas avec la plupart des autres radicaux libres. La délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée autour de 520 nm [228].

En présence de composés capables de transférer un électron ou de donner un hydrogène, au cours d'une réaction de réduction-oxydation, le DPPH[•] se réduira avec la perte de cette couleur violette (Figure 29). Le DPPH[•] est utilisé actuellement pour mesurer l'activité antioxydante des composées. L'antioxydant (comme trolox) va réagir avec le DPPH[•], en lui transférant un radical hydrogène H[•]. En mesurant l'absorbance de la solution, l'activité antioxydante sera évaluée sur la courbe d'étalonnage et les résultats seront exprimés en milligrammes d'équivalent de trolox par gramme de matière sèche.

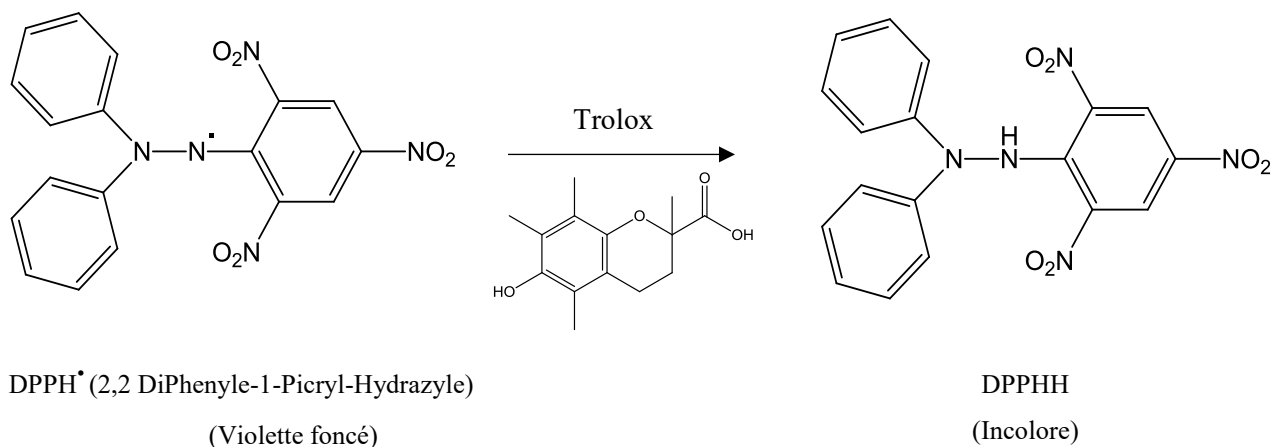


Figure 29 : Réaction entre le DPPH[•] et le trolox

4. Production de poudres

4.1. Broyage et tamisage

Le broyage et le tamisage de matières sèches sont des méthodes connues pour la production de poudres de granulométrie définie généralement employés dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou en cosmétique.

Les avantages du broyage et du tamisage sont :

- La création de particules, en effet, c'est une opération qui consiste à fractionner un solide entraînant une augmentation de la surface spécifique du solide. L'augmentation de la surface spécifique a pour effet d'accroître la réactivité physique, chimique ou enzymatique des particules [229].
- Le broyage, en détruisant la matrice végétale, favorise la libération des métabolites se trouvant dans des vacuoles ou dans des vésicules qui sont protégées par la membrane cellulaire constituée de macromolécules tels que les polysaccharides.
- Le tamisage permet de sélectionner une taille de particules définie dans laquelle les métabolites d'intérêt sont concentrés.

L'énergie utilisée pour fractionner le solide entraîne une élévation de température ce qui peut induire un risque de dégradation des métabolites sensibles à la température. Pour cela, des paramètres spécifiques ont été utilisés pour préserver les produits actifs tels que le temps et la vitesse de broyage [230] [231]. En effet, un des inconvénients majeurs du broyage est le risque de dégradation des métabolites.

4.1.1. Broyage

Il existe plusieurs méthodes de broyage telles que : la compression, l'impact, l'attrition ou la découpe. Dans le cas du broyage de végétaux deux catégories peuvent être différenciés : le broyage classique et la micronisation.

- Le broyage classique implique des broyeurs à marteaux, à disques ou à broches, ce qui permet d'obtenir des poudres dont la taille de particules peut varier de quelques microns à plusieurs millimètres.

- La micronisation implique des broyeurs à billes, à jet ou encore à haute pression ce qui permet d'obtenir des poudres dont la taille de particules est inférieure à 10 μm [232].

Les poudres sur lesquelles cette étude porte sont produites de manière classique par un broyeur à disque.

4.1.2. Tamisage

Le tamisage est une technique utilisée pour fractionner un mélange pulvérulent en fonction de la granulométrie. La technique du tamisage est utilisée depuis longtemps néanmoins peu d'études y sont consacrées. Zhao et al. en 2015 [233] ont décrit l'effet positif du broyage et du tamisage sur les propriétés phytochimiques du riz.

Le tamis est un dispositif composé soit : d'un écran tissé en métal dont la dimension des mailles est fixée, soit d'un cyclone centrifugeur à vitesse variable. Dans ce dernier cas, les particules sont triées en fonction de leur masse.

4.2. Pulvérisation et tamisage différentiel contrôlés (PTC)

La procédure PTC est décrite dans le brevet 'PCT/FR2011/000561' [234]. Le procédé PTC est une nouvelle méthode qui permet le fractionnement des poudres des plantes afin d'extraire par voie sèche les ingrédients actifs présents dans les différents organes des plantes. La différence entre cette méthode et les méthodes anciennes est que le PTC est une méthode d'extraction à sec sans utiliser de solvant. Il peut également être utilisé en tant que méthode d'assistance à l'extraction pour obtenir une gamme plus étendue d'ingrédients actifs.

Dans cette procédure, lors de la mise en œuvre du procédé, l'organe de la plante subit tout d'abord une dessiccation qui conduit à l'obtention d'un produit sec par élimination de l'eau ou tout autre fluide présent dans le composé. Ensuite, le produit sec est pulvérisé pour individualiser ses constituants sous forme de micro/nanoparticules. Enfin, le tamisage différentiel contrôlé du produit permet de séparer les microparticules en fonction de leur taille granulométrique. Récemment, cette procédure a connu un regain d'intérêt en raison de la volonté croissante de développer des technologies d'extraction écologiques d'ingrédients naturels sans aucun solvant [235][229].

5. Méthodes d'extraction

Pendant de nombreuses années, les plantes ont été utilisées à des fins médicinales. Les papyrus égyptiens décrivent des milliers de recettes montrant que les huiles essentielles sont utilisées à des fins médicinales et cosmétiques. Un manuscrit chinois décrit plus de 2000 herbes utilisées encore de nos jours [236].

Actuellement, compte tenu des contre effets liés à l'utilisation des médicaments de synthèse, il y a une augmentation de l'intérêt vis-à-vis des remèdes naturels et de l'utilisation des plantes pour leur intérêt médicinal. Pour atteindre les substances d'intérêt, l'extraction est la première étape expérimentale, elle joue un rôle important sur les résultats finaux [237].

Le rendement d'extraction des métabolites à partir de matières végétales reposent principalement sur le choix approprié de la méthode d'extraction. L'extraction peut se faire en fonction de différents paramètres selon les molécules ciblées. Les principaux facteurs, qui affectent le processus d'extraction en fonction du type de métabolites, sont : le solvant employé, la température, la pression et la durée d'extraction [238]. Par ailleurs, la polarité du composé cible à extraire est l'un des paramètres importants pour le choix de la méthode d'extraction.

Les métabolites dans les matières végétales peuvent être obtenus en extrayant différents organes de plantes fraîches ou séchées tels que les feuilles, les fleurs, les graines, les racines et les écorces. Les méthodes d'extraction des métabolites peuvent être classées en deux catégories : les méthodes dites conventionnelles (ou classiques) et celles plus récentes qui respectent « la chimie verte » dites non conventionnelles.

5.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles

Les méthodes d'extractions conventionnelles (ou classiques) sont basées sur une opération de séparation solide – liquide : un objet solide est mis en contact avec un fluide liquide (ou gazeux). Les composants d'intérêt du solide sont transférés par solubilisation dans le fluide. Les méthodes d'extractions conventionnelles ont plusieurs inconvénients tels que : les résistances de transfert de masse dans des milieux hétérogènes [239] ou les difficultés rencontrées lors de l'élimination du fluide qui risque d'entraîner la perte de composés volatils [240].

Cependant, malgré ces inconvénients, les techniques d'extraction conventionnelles demeurent des procédures d'extraction couramment utilisées. Pendant de nombreuses années, les techniques conventionnelles ont été largement acceptées, principalement en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité et de leur applicabilité étendue [241]. Les procédures générales d'extraction classiques solide - liquide sont : la macération, l'hydrodistillation et le Soxhlet. Pour augmenter le rendement d'extraction, ces méthodes peuvent être combinées entre elles.

5.1.1. La macération

La macération est une technique très ancienne d'extraction de principes actifs de diverses matrices, elle est encore très usitée car son application est simple et économique. La technique consiste à laisser reposer un solide (le matériel végétal) dans un liquide (eau, huile, alcool, etc.) pendant un certain temps. En fonction de la nature chimique des composés à extraire, les paramètres suivants : la taille des particules, le solvant et le temps d'extraction sont sélectionnés [242].

La macération est une technique d'extraction qui est conduite à la température ambiante, donc, cette méthode est moins susceptible d'entraîner la dégradation des métabolites thermolabiles [243]. Pour augmenter le contact entre le matériel végétal et le solvant afin d'augmenter le rendement d'extraction, il est nécessaire de couper la plante en petits morceaux ; la meilleure façon est de broyer la plante sèche afin d'augmenter la surface spécifique pour un meilleur échange soluté/solvant [244].

Malgré cet avantage, la méthode présente plusieurs inconvénients tels que : une étape de filtration du mélange, un temps d'extraction long, une grande quantité de solvant [245]. De plus, certains métabolites peuvent ne pas être extraits efficacement s'ils sont peu solubles à la température ambiante.

5.1.2. L'hydrodistillation

Une autre méthode permettant d'extraire les produits actifs du matériel végétal est l'hydrodistillation. C'est une méthode très efficace pour l'extraction des huiles essentielles et des composés odorants de la matière végétale [246].

Lors de l'extraction par hydrodistillation, les processus physicochimiques qui se produisent sont : l'hydrodiffusion qui correspond à la pénétration de l'eau bouillante dans le matériel végétal, l'hydrolyse des parois cellulaires ainsi que leur décomposition par la chaleur, conduisant à la libération de l'huile essentielle du tissu végétal. Le mélange de vapeur d'eau et d'huile est ensuite condensé par refroidissement indirect. Le distillat s'écoule dans un séparateur, dans lequel l'huile est automatiquement séparé de l'eau distillée [247].

Parmi les avantages de cette méthode, il y a l'utilisation simplement de l'eau comme solvant d'extraction et la possibilité de la réaliser avant ou après la déshydratation de la plante. Les principaux inconvénients de l'hydrodistillation sont que la température élevée peut provoquer une dégradation partielle ou totale des constituants naturels, que certains composés peuvent être partiellement hydrolysés et que des substances sensibles telles que les aldéhydes ont tendance à polymériser [248].

Il existe un autre type d'hydrodistillation : *la distillation directe à la vapeur*.

La distillation directe à la vapeur est le processus de distillation du matériel végétal avec de la vapeur produite à l'extérieur de l'alambic dans un générateur de vapeur. Par rapport aux deux autres processus, pour établir cette méthode, des dépenses en capital beaucoup plus élevées sont nécessaires [249].

5.1.3. Le Soxhlet

La méthode bien connue d'extraction par Soxhlet a été proposée pour la première fois en 1879 par le chimiste agricole allemand, Franz Ritter von Soxhlet pour l'extraction de lipides [250]. Cette méthode d'extraction est utilisée depuis longtemps. C'est une méthode classique d'extraction solide - liquide dans laquelle l'échantillon est en contact avec une portion de solvant pur au point d'ébullition du solvant. En fait, c'est une méthode simple dans laquelle, en répétant plusieurs cycles d'extraction avec un solvant, l'épuisement complet du soluté est effectué.

Cette méthode présente certains avantages tels que : l'échantillon est mis à plusieurs reprises en contact avec le solvant pur qui est continuellement distillé, ce qui facilite le déplacement de l'équilibre de transfert [251]. De plus, cette méthode permet d'utiliser une

grande quantité d'échantillon (par exemple 10-30 g) et aucune filtration n'est nécessaire après l'extraction.

Les inconvénients les plus importants de l'extraction par Soxhlet par rapport à d'autres techniques d'extraction conventionnelle sont : le temps long requis pour l'extraction et l'utilisation d'une grande quantité de solvant qui est non seulement coûteux, mais qui peut être la source de problèmes environnementaux. D'autre part, la méthode est réalisée au point d'ébullition du solvant sur de longues périodes, ce qui peut entraîner la décomposition thermique des espèces thermolabiles cibles. En outre, un dispositif Soxhlet conventionnel ne fournit aucune agitation, ce qui aiderait à accélérer le processus [252].

5.2. Les technologies vertes

Les tendances récentes en matière de techniques d'extraction se sont largement concentrées sur l'innovation technologique et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction qui s'inscrivent dans une démarche de « chimie verte » ainsi que dans le respect de l'environnement. L'extraction verte est basée sur la conception de procédés d'extraction qui réduisent la consommation de solvants organiques toxiques ainsi que la consommation d'énergie et qui garantissent un haut rendement d'extraction. Le but principal de l'extraction verte est d'extraire les substances actives stockées dans les matrices végétales en diminuant le plus possible le nombre d'étapes permettant d'atteindre les molécules d'intérêt exploitables dans les secteurs de l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmaceutique [253].

Aujourd'hui, les méthodes classiques peuvent être assistées par micro-ondes ou d'ultrasons afin d'augmenter leur rendement d'extraction [254] [255]. Par ailleurs, une nouvelle procédure d'extraction des métabolites secondaires, basée sur la Pulvérisation et le Tamisage Différentiel Contrôlé (PTC) a été récemment mise en place [1].

5.2.1. **Extraction assistée par micro-ondes**

Des études préliminaires réalisées à la fin des années 1980 à l'aide de fours domestiques ont montré le grand potentiel d'extraction des micro-ondes [256]. L'extraction assistée par micro-ondes, considérée comme une extraction verte, est largement utilisée et est efficace pour la préparation des extraits lors de leur analyse [257].

La nature du solvant est d'une importance primordiale dans cette méthode. Comme avec d'autres techniques, le solvant (ou le mélange de solvants) devrait solubiliser efficacement les analytes d'intérêt sans extraire le matériau de la matrice (extraction sélective). De plus, les propriétés d'absorption des micro-ondes des solvants sont d'une grande importance car un chauffage suffisant est requis [256].

Cette technique présente plusieurs avantages, tels qu'une faible consommation de solvant, une durée d'extraction très courte (généralement comprise entre quelques secondes et quelques minutes) et un rendement d'extraction élevé [258]. Les résultats obtenus par cette méthode, montrent que le rayonnement micro-ondes ne provoque aucune dégradation des composés extraits [259], mais l'élévation de température conduit à une dégradation ou une oxydation de certains composés actifs. Le but principal dans ce type de procédure d'extraction est de réduire sa durée [260].

5.2.2. Extraction Assistée par Ultrasons (EAU)

L'utilisation des ultrasons pour améliorer le rendement d'extraction est une technique qui a débuté dans les années 1950 [261]. Depuis lors, différents articles ont été publiés sur l'extraction assistée par ultrasons de différentes matrices végétales [262] [263].

Le procédé EAU implique l'utilisation d'ultrasons allant de 20 kHz à 2 000 kHz. L'effet mécanique de la cavitation acoustique augmente la perméabilité des parois cellulaires ainsi que le contact entre les solvants et les échantillons. En effet, les ultrasons agissent directement sur la cellule de la plante pour libérer les métabolites [264]. La procédure est une technologie simple et relativement peu coûteuse qui facilite l'extraction par solvant lors d'extractions phytochimiques à petite ou à grande échelle [252]. Il a été démontré que les ultrasons optimisent l'extraction des métabolites en réduisant la consommation de solvant et en augmentant les rendements d'extraction [265] [266].

Le choix de la fréquence des ultrasons dépend de la nature du métabolite à extraire. Il a été étudié qu'en utilisant des ultrasons à haute fréquence, le rendement d'extraction n'a pas augmenté de manière significative, mais le risque de dégradation des métabolites a été réduit. D'autre part, l'utilisation d'une énergie ultrasonore supérieure à 20 kHz peut avoir un effet négatif sur les composés phytochimiques actifs en raison de la formation de radicaux libres. Par

exemple, la sonication de l'eau entraîne la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs qui peuvent se combiner pour former du peroxyde d'hydrogène [267] [254].

Des études montrent que les basses fréquences ont tendance à détruire les alcaloïdes. Cet effet est utilisé pour l'extraction de composés médicinaux sans être contaminés par les alcaloïdes [261].

5.2.3. PTC

Le procédé de Pulvérisation et Tamisage Différentiel Contrôlé (PTC) pour l'extraction de principes actifs d'origine végétale est une nouvelle méthode d'extraction, comme le montre les derniers travaux de Becker et al. en 2016 [229] et Zaiter et al. en 2016 [235]. Le PTC est une technique d'extraction verte qui se fait par voie sèche, sans utiliser de solvants [268]. Le broyage du matériel végétal séché est réalisé afin de le pulvériser finement pour concentrer les métabolites dans les poudres résiduelles. En fait, le but de la procédure PTC est d'enrichir en métabolites différentes fractions des poudres [1].

6. Extraction des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être extraits à partir d'échantillons de plantes fraîches, congelées ou séchées. Avant extraction, le matériau est prétraité par broyage, séchage et homogénéisation. Le rendement de l'extraction des métabolites secondaires est lié aux caractères des composés et des solvants.

6.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont extraits en traitant le matériel végétal avec des solutions alcalines, puis effectuant l'extraction dans des solvants organiques comme le chloroforme, le benzène, le 1,2-dichloroéthane, l'éther diéthylique et etc. [256].

L'extraction des alcaloïdes avec les solvants ioniques est plus efficace. Une nouvelle méthode d'extraction des alcaloïdes avec extraction de paires d'ions a été publiée par Bugatti et al. en 1991 [269]. Ces dernières années, les liquides ioniques ont montré un potentiel en tant que solvants pour l'extraction d'alcaloïdes [270]. L'extraction assistée par ultrasons (EAU) ou

l'extraction assistée par micro-ondes, en utilisant des liquides ioniques comme solvant, sont les techniques d'extractions utilisées pour les alcaloïdes avec des temps d'extraction courts et un meilleur rendement [261] [271] [272].

6.2. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes se présentent généralement sous forme de mélanges complexes et peuvent être extraits de la source naturelle par une grande variété de méthodes. Pour l'extraction des terpénoïdes, les plantes sont généralement séchées, broyées puis extraites dans un Soxhlet ou laissées à macérer à température ambiante [165]. En général, l'extraction des terpénoïdes à partir de matières végétales est effectuée par extraction successive par solvant en considérant la polarité des terpénoïdes d'intérêt ou par séparation liquide - liquide à partir d'un premier extrait acétonique ou alcoolique [273]. Les huiles essentielles sont couramment extraites par hydrodistillation ou par une distillation à la vapeur [274] [275]. Les études montrent également des extractions efficaces des huiles essentielles par les méthodes vertes comme l'extraction par micro-ondes sans utilisation des solvants [276] [277].

6.3. Les saponines

En général, les techniques d'extraction des saponines sont regroupées en deux catégories : des technologies conventionnelles et des technologies vertes. Avant la méthode moderne, l'extraction des saponines était effectuée dans un appareil de Soxhlet ou simplement par macération en utilisant un solvant polaire ou des solvants de polarités croissantes (méthanol/eau). En extrayant avec un mélange eau/butanol (extraction liquide-liquide), la phase butanol obtenue contient les saponines [278]. Les technologies vertes les plus utilisées pour l'extraction des saponines sont l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes [279] [280] [281].

6.4. Les composés phénoliques

Les études montrent que les solvants polaires comme le méthanol sont plus efficaces pour l'extraction des composés phénoliques de poids moléculaire inférieur, tandis que l'acétone en solution aqueuse convient mieux à l'extraction des polyphénols de poids moléculaire élevé.

De plus, en utilisant des solvants organiques purs, les acides phénoliques très polaires ne peuvent pas être extraits complètement. Dans certains cas, des mélanges alcool/eau ou acétone/eau sont suggérés. Au cours du processus d'extraction des composés phénoliques, il convient d'éviter les températures élevées afin de limiter le risque de dégradation des molécules telles que les anthocyanes, l'extraction est généralement effectuée à des températures allant de 20 °C à 50 °C [282].

Il existe de nombreuses études sur les méthodes d'extraction des polyphénols : les méthodes classiques, les méthodes modernes [283] et leur combinaison. D'autres études portent sur la comparaison du rendement d'extraction entre ces méthodes [284]. En comparant les méthodes conventionnelles et les méthodes vertes, on peut observer que les méthodes d'extractions assistées par micro-ondes et les méthodes d'extraction assistées par ultrasons sont considérées comme des techniques beaucoup plus efficaces. De plus, elles montrent un plus grand potentiel et de meilleurs rendements pour l'extraction des polyphénols [285].

6.5. Les tanins

Les espèces végétales, le type de tissu végétal, la teneur en humidité et les conditions d'extraction ont une influence déterminante sur l'extraction des tanins [286]. La plupart du temps, une seule étape d'extraction n'est pas suffisante pour une extraction complète des tanins et il convient de combiner les différentes méthodes [287].

Il est nécessaire de choisir le meilleur solvant d'extraction pour les tanins en fonction de l'hydrosolubilité de ceux-ci. Lorsque les tanins hydrolysables sont extraits, il convient d'éviter les solvants alcooliques en raison de la substitution rapide des groupes hydroxyle pour former les esters de gallate correspondants. D'après les études, sur l'utilisation des différents solvants et des procédures d'extraction des tanins condensés et hydrolysables, il a été constaté que le mélange acétone/eau (rapport 70/30) était un agent d'extraction plus efficace que les solvants alcooliques, même lorsque ces derniers étaient acidifiés ou chauffés [288] [238].

La température d'extraction est également un paramètre important, car les tanins hydrolysables se décomposent facilement à des températures supérieures à 50 °C [289]. Par contre, Ping et al. en 2011 [290] ont rapporté que dans le cas des tanins condensés, l'augmentation de la température avait un effet significatif sur la croissance du rendement

d'extraction. Les méthodes conventionnelles telle que la macération et le Soxhlet sont utilisées pour l'extraction des tanins [288]. D'autre part, des études montrent également de meilleurs résultats lors du remplacement des méthodes anciennes par les méthodes vertes [291].

7. Chromatographie

La chromatographie est une technique de séparation de composés chimiques, dans un mélange homogène liquide ou gazeux. Cette méthode est basée sur les différences d'interaction entre une phase mobile contenant des composés chimiques et une phase stationnaire. La phase stationnaire est un solide et le mécanisme de la séparation est basé sur une adsorption à la surface de la phase stationnaire d'un mélange de solutés, suivi d'une désorption différentielle des solutés entraînés par un éluant.

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature des phases utilisées : la phase stationnaire peut être solide ou liquide et la phase mobile peut être gazeuse ou liquide :

- Chromatographie en phase gazeuse : la phase mobile est appelée gaz vecteur.
- Chromatographie en phase liquide : la phase mobile est appelée éluant.

De plus, les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction des phénomènes mis en jeu lors de la séparation.

7.1. Les mécanismes des séparations chromatographiques

En considérant la nature de la phase stationnaire et de la phase liquide, aussi bien leur interaction avec les solutés dans la phase mobile, les mécanismes des séparations chromatographiques peuvent être différents.

7.1.1. Chromatographie de partage

Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement non-miscibles. Dans cette chromatographie, la phase stationnaire est un film liquide imprégné sur un support solide ou sur une phase organique greffée par liaison covalente. La phase mobile est aussi un liquide. Le mécanisme de séparation des solutés par cette

chromatographie est basé sur la distribution d'un soluté entre deux solvants non-miscibles, l'un aqueux et l'autre organique [292].

7.1.2. Chromatographie d'adsorption en phase normale ou inverse

Le mécanisme de séparation par chromatographie d'adsorption est basé sur la polarité de la phase stationnaire et de la phase mobile et sur l'interaction hydrophile entre chaque soluté et l'éluant [293]. Selon ce concept, deux variantes de colonne sont utilisées :

- Chromatographie en phase normal : la phase stationnaire est polaire, de nature hydrophile, avec des groupements amine ($-NH_2$), nitrile ($-CN$), dialcool ou diol ($-(CHOH)-CH_2OH$) greffés sur la silice. La phase mobile est un solvant apolaire, de nature lipophile comme l'hexane. Les composés polaires du mélange sont plus retenus sur la phase stationnaire polaire que les composés apolaires, par conséquent, les composés apolaires sont élués plus rapidement.
- Chromatographie en phase inverse : la phase stationnaire est constituée généralement d'un hydrocarbure apolaire, de nature lipophile, composé de chaînes alkyles de C_4 à C_{30} et de groupements propyle, phényle ou diphényle greffés sur la silice. La phase mobile est un solvant polaire, tel que l'eau ou le méthanol. Dans ce cas, les composés polaires sont élués plus rapidement que les composés apolaires.

7.1.3. Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire est un solide possédant des pores uniformes est stocké dans une colonne et la phase mobile peut être soit une solution aqueuse, soit un solvant organique. Le mécanisme de la séparation est réalisé selon la taille ou le poids moléculaire des composés chimiques. Les molécules de taille supérieure à celle des pores des particules de la phase stationnaire pénètrent plus difficilement dans les pores ; par contre, les molécules avec une taille inférieure à celle des pores pénètrent plus facilement. Dans certain cas, l'ordre d'élution suit généralement la masse moléculaire. Les molécules dont la masse moléculaire est la plus élevée éluent en premier [294].

7.1.4. Chromatographie sur échangeur d'ions

Dans cette méthode, la phase stationnaire est un solide sur lequel sont greffés des sites anioniques ou cationiques :

- La colonne cationique : la phase stationnaire est constituée d'un polymère organique greffé avec des groupements acides sulfonique $\text{-SO}_3\text{H}$ (acide fort) ou acide carboxylique -COOH (acide faible).
- La colonne anionique : la phase stationnaire est greffée avec des groupements ammonium.

Le mécanisme de séparation est une interaction électrostatique (dipolaire) entre les ions des composés chimiques dissous dans la phase mobile et les ions de la phase stationnaire. La charge plus élevée portée par une molécule conduit à la retenue par la phase stationnaire. La désorption se fait en fonction du pH de l'éluant [295].

7.1.5. Electrochromatographie capillaire

Le mécanisme de séparation est un entraînement de la phase mobile dans un champ électrique le long de colonnes capillaires. C'est une technique hybride de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie en phase liquide, qui associe l'électromigration des ions dans un champ électrique comme dans l'électrophorèse et les processus de partage entre phases comme dans la chromatographie [296].

7.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est de nos jours l'un des outils les plus puissants de la chimie analytique. C'est une technique de chromatographie sur colonne simple hautement améliorée. Au lieu de laisser l'éluant s'égoutter à travers une colonne par gravité, l'éluant est introduit dans la colonne sous haute pression. Un appareil de HPLC est composé d'une pompe qui délivre l'éluant en suppression et une colonne couplée à un détecteur.

7.2.1. L'injecteur et la pompe

L'injecteur est une vanne qui comporte une boucle d'injection de taille définie (10 et 100 μL) et qui permet de placer une quantité finie de l'échantillon à analyser en tête de colonne.

Une pompe pouvant atteindre des pressions élevées d'environ 200 bars (20 000 kPa) ou plus qui permet de distribuer l'éluant dans la colonne. Elle peut délivrer un éluant soit de composition fixe en mode isocratique, soit de composition variable en mode gradient.

7.2.2. La colonne

Généralement, le diamètre intérieur des colonnes conventionnelles varie de 4 à 10 mm et la longueur est d'environ 5 à 30 cm. Elles peuvent être allongées en couplant une ou plusieurs colonnes. La taille des particules de la phase stationnaire est d'environ 2 à 10 μm .

La colonne est remplie par la phase stationnaire qui est choisie en fonction de la nature des solutés et de la polarité relative de l'éluant. Afin de réaliser notre étude, nous avons opté pour l'utilisation d'une colonne inverse C18.

Des solvants polaires sont utilisés comme éluant. Il n'y aura pas autant d'attraction entre les chaînes hydrocarbonées attachées à la silice et les molécules polaires dans la solution. Les molécules polaires du mélange passent donc la plupart de leur temps à se déplacer avec le solvant et elles sont éluées de la colonne plus tôt que les molécules non polaires.

7.2.3. Le détecteur

En HPLC, les détecteurs sont spécifiques à chaque application. Le choix d'un détecteur dépend des caractères et des concentrations des composés à séparer et à analyser.

Les différents détecteurs qui sont utilisés en HPLC sont : détecteur d'absorption UV, détecteurs d'absorbance infrarouge, détecteurs de fluorescence, détecteurs électrochimiques, détecteurs réfractométriques et détecteurs par spectrométrie de masse. La détection est souvent multiple par le couplage de deux détecteurs [297]. Le couplage d'un détecteur UV et d'un détecteur de spectrométrie de masse a été utilisé lors de nos analyses.

7.2.3.1. Détecteur d'absorption UV

Le détecteur d'absorption UV est plus couramment utilisé aujourd'hui comme détecteur HPLC car de nombreux composés absorbent dans la région UV (ou visible) (de 190 à 600 nm) [298]. L'absorbance est déterminée par la fraction de lumière transmise à travers une cellule de détection. Selon la loi de Beer – Lambert, elle est proportionnelle à la longueur du trajet de la cellule en cm (b), au coefficient d'extinction molaire de l'analyte (ϵ), et à sa concentration molaire (c).

$$A = \log I_0/I = \epsilon.b.c$$

Où « A » est l'absorbance, « I_0 » l'intensité de la lumière incidente, « I » l'intensité de la lumière transmise.

Il existe trois types de détecteurs UV différents :

- Les détecteurs à longueur d'onde fixe qui reposent sur des longueurs d'onde distinctes.
- Les détecteurs à longueur d'onde variable qui peuvent être réglés pour fonctionner au maximum d'absorbance d'un analyte ou à une longueur d'onde offrant une plus grande sélectivité.
- Les détecteurs à matrice de photodiodes (PDA) qui ont un chemin optique similaire à celui des détecteurs à longueur d'onde variable, à l'exception du fait que la lumière traverse la cellule d'écoulement avant de frapper le réseau, ce qui lui permet d'étaler le spectre sur une matrice de photodiodes [299].

7.2.3.2. Détecteur par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qualitative et quantitative permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par la mesure de leur rapport masse sur charge (m/z) et ainsi de caractériser leur structure chimique. Il fournit une spécificité en raison de : sa capacité à donner accès à la masse sélectionnée de la forme ionisée de l'analyte sous la forme d'un rapport (m/z), sa sensibilité en raison de l'amélioration du rapport sur bruit et sa vitesse d'analyse [300].

Le couplage d'une HPLC avec un détecteur de spectrométrie masse augmente considérablement la sensibilité de détection, ce qui fournit un outil d'analyse particulièrement puissant [301].

Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation, d'un analyseur de masse et d'un détecteur d'ions :

- **Source d'ionisation** : La source d'ionisation par électrospray ou électronébulisation (ESI) est l'une des techniques d'ionisation adaptée pour les échantillons sous forme liquide [302].

Un électrospray est produit en appliquant un fort champ électrique, à pression atmosphérique, à un liquide passant à travers un tube capillaire métallique (75 μm) avec un faible débit (100 à 3000 nl/min). Le champ électrique est obtenu en appliquant une différence de potentiel d'environ 3 à 6000 V entre ce capillaire et une contre-électrode (entrée du spectromètre de masse). Au cours de ce champ, le diamètre du flux du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, diminue et conduit à la formation d'un cône dit « cône de Taylor ». Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette, combiné à l'évaporation des solvants (le solvant est progressivement évaporé par l'azote chauffé qui circule à contre-courant) conduit à l'explosion de ces gouttelettes en de plus petites. Lorsque le rapport charge/surface de la gouttelette devient trop élevé (limite de Raleigh), elle éclate en gouttelettes plus petites. Par conséquent, la liquide est vaporisé en un fin brouillard des nano-gouttelettes mono- ou poly-chargées [303] (Figure 30).

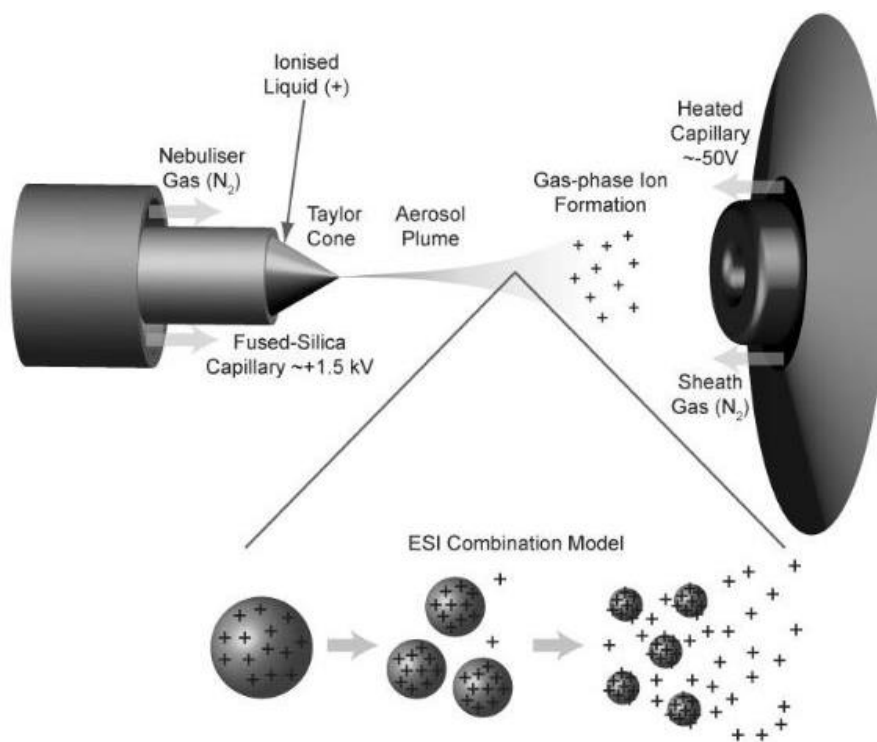


Figure 30 : Le principe de la source électrospray d'ionisation (ESI)

Les deux méthodes de génération d'ions sont [304] :

→ Le mode positif : protonation (les ions sont souvent du type $(M + nH)^{n+}$ où les charges sont données par les protons), cationisation et éjection d'électrons.

→ Le mode négatif : déprotonation et capture électronique.

- **Analyseur de masse** : L'un des analyseurs de masse est l'analyseur quadripolaire. L'analyseur quadripolaire est constitué de 4 barres parallèles ayant idéalement une section hyperbolique, disposées symétriquement autour d'un axe. Ces 4 barres sont associées électriquement 2 par 2 et créent ainsi un champ électrique d'oscillation laissant passer certaines masses tandis que d'autres sont sur une trajectoire instable qui ne leur permet pas d'atteindre le détecteur. Le quadripôle est donc un filtre de masse [305] (Figure 31).

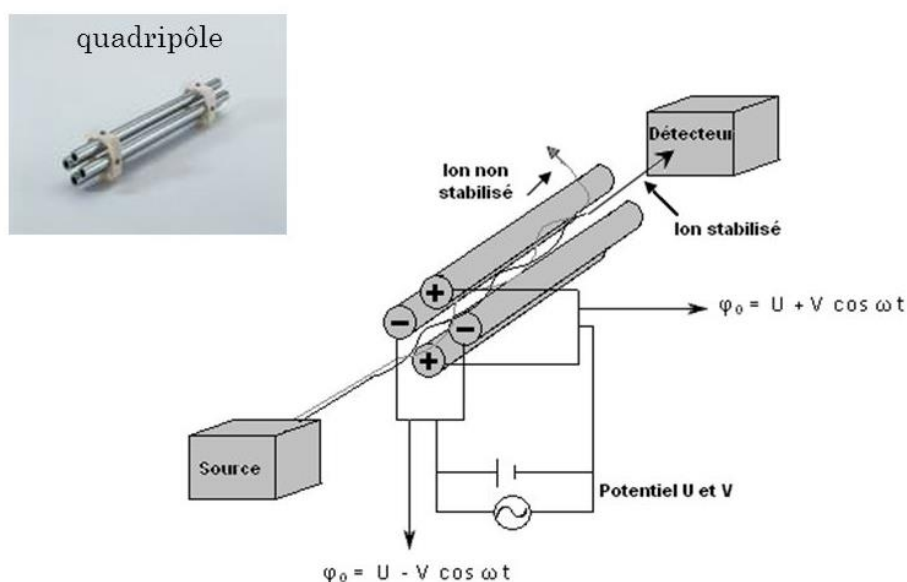


Figure 31 : Le principe d'analyseur quadripolaire

7.3. HPLC semi-préparative

La chromatographie liquide semi-préparative est basée sur le même principe que la chromatographie liquide analytique, mais elle diffère de cette dernière par la dimension de la colonne, la taille de la boucle d'injection, la vitesse d'élution. Ce qui permet ainsi d'isoler des quantités d'analyte suffisante pour effectuer leur caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C [306] .

Généralement, le diamètre intérieur des colonnes semi-préparatives varie de 10 mm à 15 mm, la longueur de 25 cm à 50 cm et la taille des particules de la phase stationnaire est comprise entre 5 μm et 50 μm .

Afin de déposer des quantités plus élevées d'échantillon, la boucle d'injection peut atteindre 500 μl .

Compte tenu de l'importance de la taille des particules de la phase stationnaire, le débit de l'éluant doit être relativement important de 4 ml/min à 10 ml/min afin d'établir une pression suffisante dans la colonne.

Il est important de noter que le détecteur choisi doit permettre de récupérer les analytes intacts après leur séparation à l'aide d'un collecteur de fractions.

Chapitre II.

ETUDES PHYTOCHIMIQUES

- 1. Isolement des métabolites secondaires**
- 2. Étude de la phytochimie de poudres**

1. Isolement de métabolites secondaires

L'utilisation de métabolites végétaux à des fins médicinales et cosmétiques gagne aujourd'hui en popularité. L'exploitation des métabolites passe nécessairement par leur isolement. La procédure d'isolement des métabolites secondaires comprend une étape d'extraction des composés d'intérêts, puis une étape de purification par chromatographie sur gel de silice [307] ou par HPLC-préparative [308] et enfin une étape de caractérisation par LC-MS et RMN.

Le travail présenté dans cette partie porte sur l'isolement de métabolites secondaires d'extraits de parties aériennes de deux plantes : le lierre (*Hedera helix* L.) et le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.).

- L'isolement de deux saponines triterpénoïdes : l'hédéracoside C et l' α -hédérine a été effectué dans les extraits du lierre. Les deux saponines ont non seulement des aspects pharmaceutiques très remarquables, mais elles peuvent être utilisées dans l'industrie cosmétique comme surfactant naturel [309]. Leur procédure d'isolement a été effectuée à l'aide d'une HPLC-semi préparative. Cette expérience a permis de mettre en place une méthodologie afin d'isoler d'autres composés d'intérêts issus d'extraits végétaux.
- L'isolement de l'hypéroside, l'un des flavonoïdes marqueurs du millepertuis a été réalisé en appliquant la méthodologie mise en place pour l'isolement des saponines du lierre. L'hypéroside est reconnu pour son intérêt pharmaceutique [310].

Les saponines et l'hypéroside isolés ont été caractérisés par LC-MS et la structure de l'hypéroside a été confirmée par RMN.

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Réactifs utilisés

L'eau distillée a été utilisée pour toutes les expériences. Le Tableau 1 regroupe les noms des différents solvants et des acides utilisés et leurs origines.

Tableau 1 : Les solvants et les acides utilisés lors des expériences et leurs origines.

Type	Nom	Fabricant
Solvants	Eau (HPLC)	Carlo Erba
	Méthanol (HPLC)	Carlo Erba
	Méthanol	Carlo Erba
	Acétonitrile (HPLC)	Fisher Scientific
	Cyclohexane	Fisher Scientific
	n-Butanol	Fisher Scientific
	Acétate d'éthyle	Fisher Scientific
	Dichlorométhane	Fisher Scientific
	Ethanol	Carlo Erba
Acides	Acide formique	Carlo Erba
	Acide sulfurique	Sigma – Aldrich
	Anhydride acétique	Sigma – Aldrich

1.1.2. Méthode d'extraction hydrométhanolique

La macération hydroalcoolique a l'avantage de permettre l'extraction de composés sensibles à la chaleur. La macération permet d'obtenir d'excellents résultats sur de longues durées (20 h), à température ambiante d'après l'étude de Rostagno et al. en 2013 [311].

Les poudres broyées (non-tamisées) de parties aériennes des plantes étudiées : lierre et millepertuis ont été macérées dans une solution méthanol/eau (70/30) sous agitation, pendant 24 heure à température ambiante. L'extrait obtenu est centrifugé pendant 20 min et filtré (papier filtre : 10 à 20 µm). Le filtrat obtenu est concentré sous vide afin d'éliminer le méthanol. Les métabolites secondaires concentrées dans la phase aqueuse sont extraits par un solvant organique le butanol dans le cas du lierre et l'acétate d'éthyle dans le cas du millepertuis. Après séparation, la phase organique est évaporée sous vide pour donner un résidu sous forme de poudre.

1.1.3. Séparation par chromatographie sur gel de silice

La procédure de séparation des composés dans les extraits obtenus a été effectuée par chromatographie sur gel de silice. Pour réaliser cette partie, une colonne avec 3 cm de diamètre interne et de 60 cm de longueur a été utilisée. La colonne a été remplie par du gel de silice qui a été préparé en utilisant 40 g de silice (0.040 - 0.063 mm) dans du cyclohexane. Les différents métabolites secondaires sont séparés à l'aide d'un gradient d'élution dichlorométhane/méthanol. Puis, les métabolites secondaires répartis dans les fractions collectées sont caractérisés par LC-MS.

1.1.4. Appareillage

1.1.4.1. LC-PDA/MS

L'appareil utilisé est un Shimadzu LC-MS 2020 associé à une colonne phase inverse "Ascentis C18" couplée à un détecteur PDA "SPD-M20A" et un détecteur SM montés en série (Figure 32).

- La colonne d'un diamètre interne de 4,6 mm et d'une longueur de 150 mm est remplie de silice greffée C18. La colonne est thermostatée à 30 °C.
- La boucle d'injection a un volume de 20 µL.
- L'éluant est délivré par une pompe quaternaire dont le débit est fixé à 0,6 mL/min. L'éluant constitué d'un mélange d'eau (de qualité HPLC) additionnée de 0,5% d'acide formique et d'acétonitrile (de qualité HPLC). Les gradients utilisés sont adaptés en fonction de la polarité des métabolites secondaires.
- Les différents composés sont identifiés par un détecteur PDA (détecteur à barrette de photodiodes). Leur identification est réalisée par la comparaison de leur temps de rétention (t_R) à celui de leur étalon correspondant.
- Les différents composés sont caractérisés à l'aide d'un détecteur SM. Le débit de gaz de nébulisation est réglé à 1,5 L/min et le débit de gaz de séchage est réglé à 10 L/min. La température de la ligne de désolvatation est fixée à 250 °C et la température de la source est fixée à 350 °C. La tension de la sonde est réglée à -4000 V et le mode d'ionisation par électrospray est négatif. Les composés sont caractérisés par leur rapport m/z des ions $[M-H]^-$.

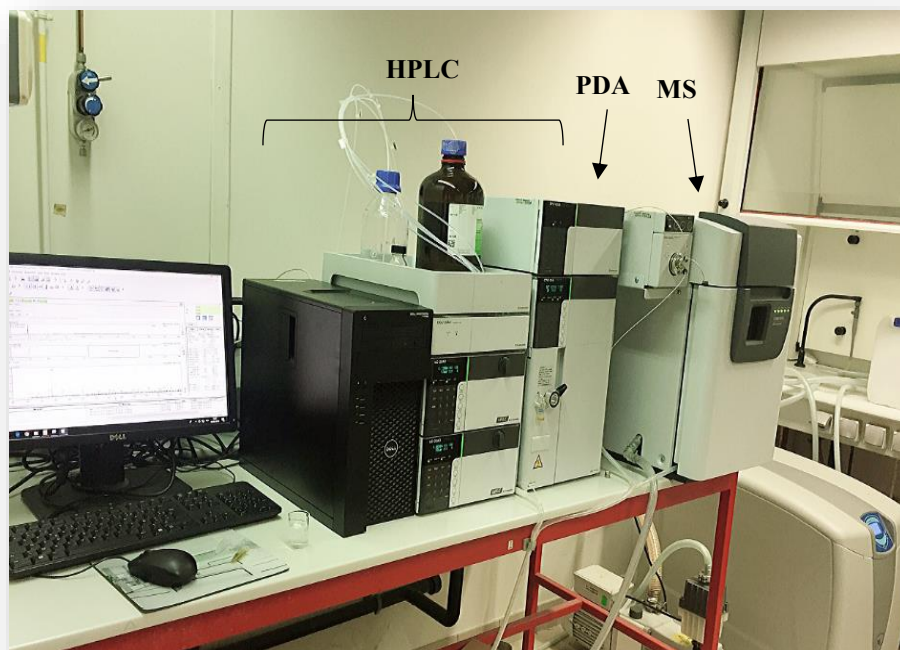


Figure 32 : Appareillage Shimadzu LC-MS-2020

1.1.4.2. HPLC semi-préparative

L'isolement des composés est réalisé à l'aide d'une HPLC semi-préparative Waters 600 équipée d'une colonne phase inverse "YMC-Pack ODS-A-HG (C18)" qui est couplée à un détecteur UV "Waters 486 tunable absorbance detector" (Figure 33).

- La colonne a un diamètre interne de 10 mm et une longueur de 250 mm, elle est remplie de silice greffée C18 dont la taille de particules est de 50 μm .
- La boucle d'injection a un volume de 100 μL .
- L'éluant est délivré par une pompe "Waters 600 Pump" dont le débit est fixé à 4 mL/min. L'éluant constitué d'un mélange d'eau (de qualité HPLC) additionnée de 0,5% d'acide formique et d'acétonitrile (de qualité HPLC). Les gradients utilisés sont adaptés en fonction de la polarité des composés à séparer.
- Les différents composés sont identifiés par un détecteur UV. Leur identification est réalisée par la comparaison de leur temps de rétention (t_R) à celui de leur étalon correspondant.



Figure 33 : HPLC semi-préparative Waters 600

1.1.4.3. RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la méthode la plus efficace pour élucider la structure d'un composé chimique [312].

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire ^1H et ^{13}C ont été réalisés avec un appareil Bruker Avance 400. Les analyses RMN ^1H et ^{13}C sont effectuées respectivement à 400 MHz et 100 MHz. La référence interne est donnée par le signal des protons résiduels du solvant (CHCl_3) pour les spectres RMN ^1H et le signal des solvants CDCl_3 et CD_3OD pour la RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques sont donnés en ppm, la multiplicité des signaux est notée par s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

1.2. Résultats

1.2.1. L'hédéracosite C et l' α -hédérine du lierre

Pour cette expérience, un échantillon broyé de parties aériennes du lierre a été choisi. 120 g de cet échantillon a été macéré dans un mélange méthanol/eau : 70/30 pendant 24h, puis le méthanol est évaporé sous vide. Ensuite, les composés organiques tels que les saponines sont extraits en phase organique par du n-butanol. Le n-butanol est évaporé sous vide pour donner un résidu sous forme de poudre de 10 g.

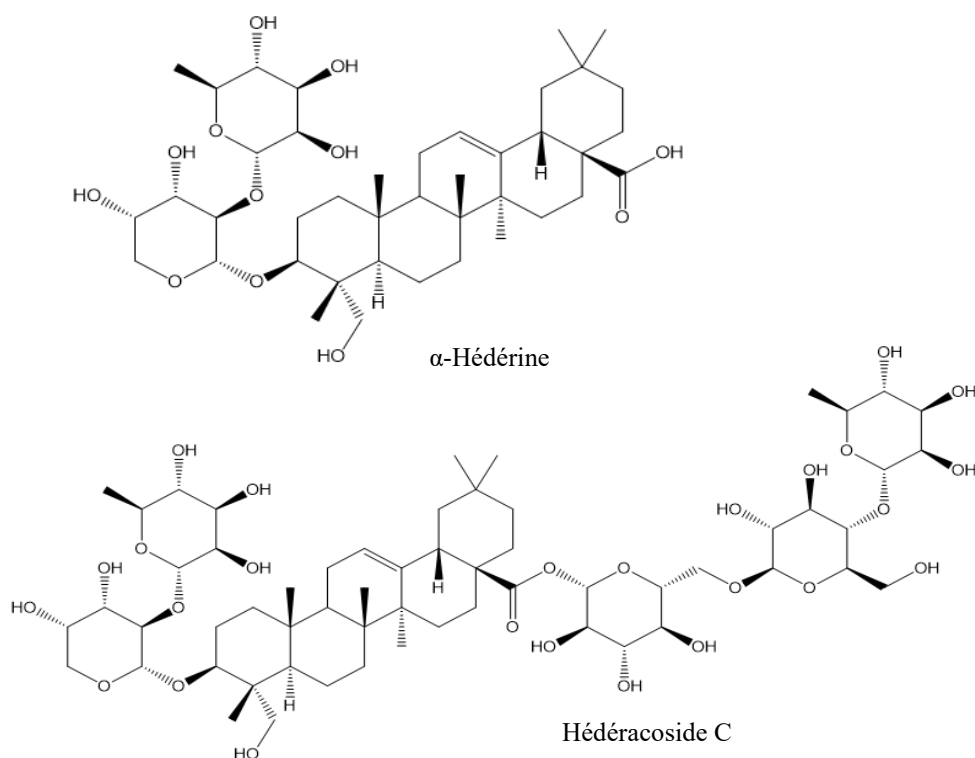


Figure 34 : Les deux saponines triterpénoïdes présentes dans le lierre

1.2.1.1. Chromatographie sur gel de silice et caractérisation par LC-MS

La séparation des deux saponines a été effectuée en deux étapes :

Etape 1 :

L'hédéracosite C et l' α -hédérine sont séparés par chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'élution dichlorométhane/méthanol (100/0 à 40/60) avec une pente de 10% et 10 mL par fraction (Figure 35).

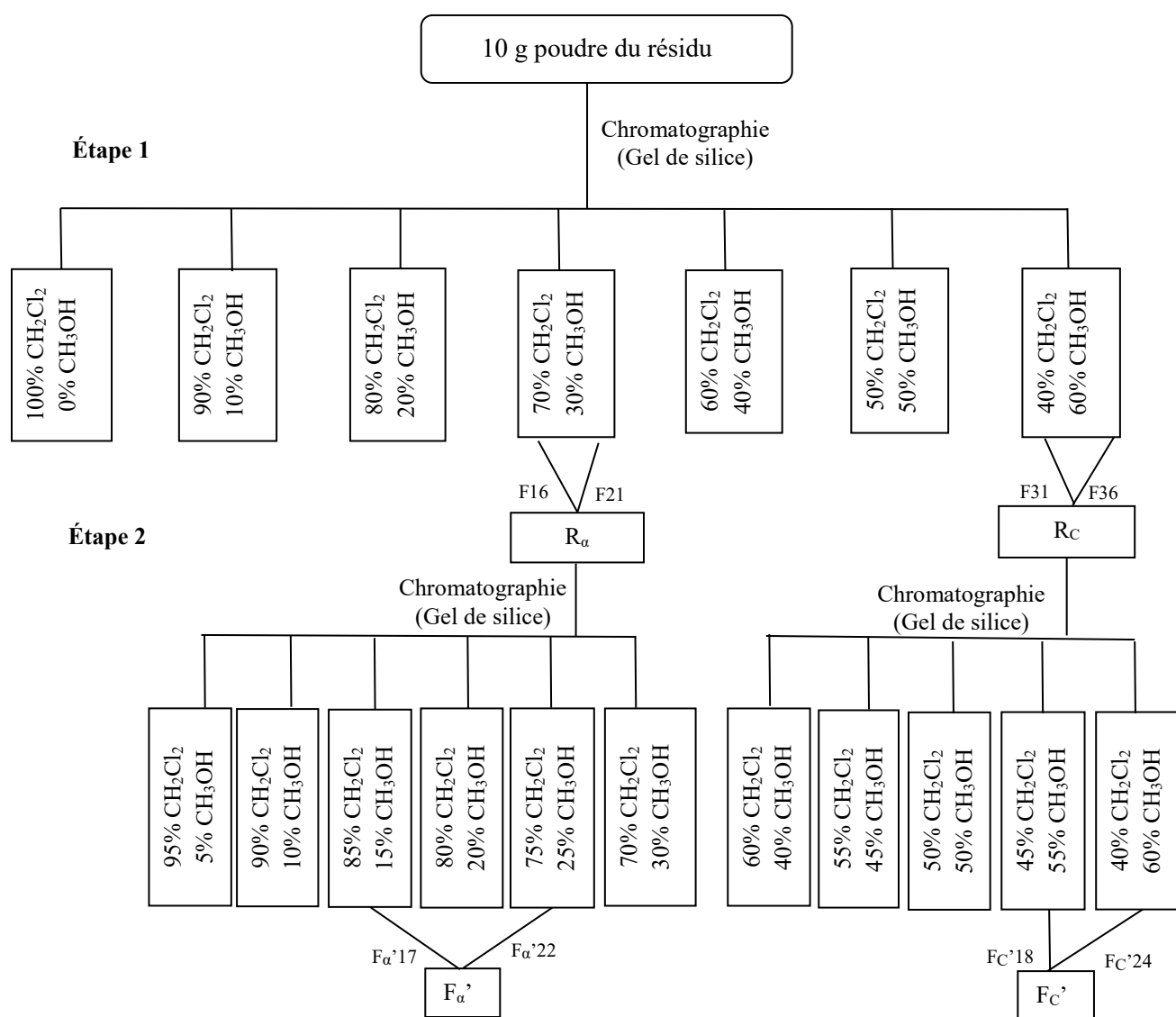


Figure 35 : Diagramme de fractionnement par chromatographie sur gel de silice

Ensuite, les saponines séparées dans les fractions collectées sont caractérisées par LC-MS. Le temps de rétention de l'hédéracose C est de 10,8 min et le temps de rétention de l' α -hédérine est de 17,3 min en utilisant le gradient d'élution (eau/acétonitrile (A/B)) suivant :

- 0-14 min de 90/10 à 35/65 (A/B)
- 14-14,50 min de 35/65 à 10/90
- 14,50-19,50 min, elution à 10/90 (pallier)
- 19,50-24 min de 10/90 à 90/10
- 24-26 min, elution à 90/10 (pallier)

Les rapports de m/z obtenus correspondent à la somme de la masse de la saponine additionnée à celle de l'acide formique qui forme un adduit. La Figure 36 montre le profil du chromatogramme (SIM) de l'hédéracoside C (m/z 1220) et de l' α -hédérine (m/z 750) additionnées de leur adduits (46).

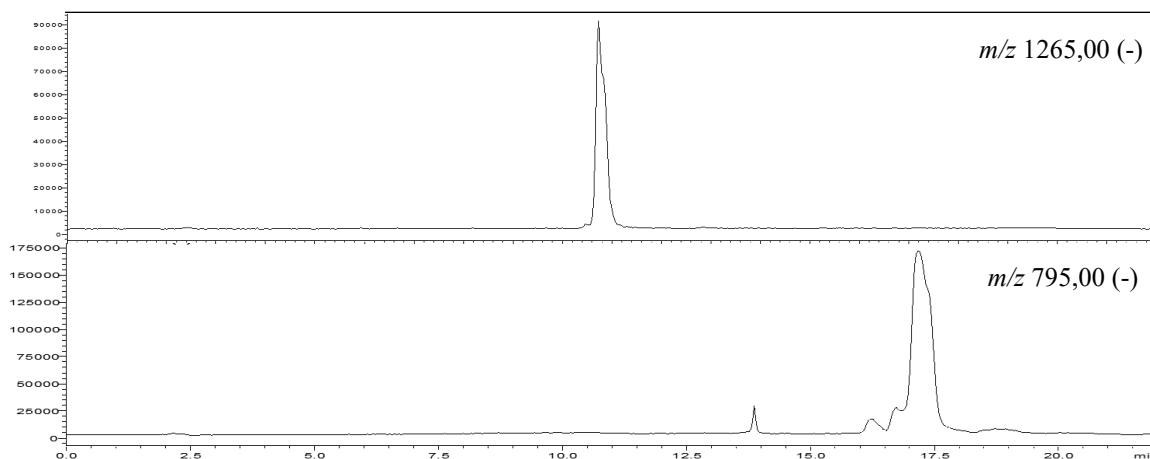


Figure 36 : Profil du chromatogramme d'ions extraits (SIM) de l'hédéracoside C et de l' α -hédérine additionnées de leur adduits (46) : m/z 1265 et m/z 795, respectivement.

Selon les analyses LC-MS, les fractions F16 à F21 contiennent de l' α -hédérine. Ces fractions sont réunies puis évaporées sous vide afin de récupérer le résidu R_α . De même, les fractions F31 à F36 qui contiennent de l'hédéracoside C sont réunies, puis évaporées pour donner le résidu R_C (Figure 35).

Etape 2 :

Le résidu R_α est à nouveau chromatographié sur gel de silice afin d'isoler l' α -hédérine, en utilisant comme système d'élution un gradient dichlorométhane/méthanol (95/5 à 70/30) avec une pente de 5% et 5 mL par fraction. Le résidu R_C est également chromatographié sur gel de silice afin d'isoler l'hédéracoside C, en utilisant comme système d'élution un gradient dichlorométhane/méthanol (60/40 à 40/60) avec une pente de 5% et 5 mL par fraction (Figure 35). L'identification de chacune des saponines collectées dans les différentes fractions a été effectuée par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Le système d'élution appliqué est : méthanol/dichlorométhane (35/65). Le manque de chromophores dans leurs structures limite leur détection par UV. Donc, les deux saponines sont révélées à l'aide du réactif de Liebermann-Burchard.

Le réactif de Liebermann-Burchard est préparé par addition de 5 mL d'anhydride acétique et 5 mL d'acide sulfurique concentré dans 50 mL d'éthanol. Ce réactif est pulvérisé sur la plaque. En chauffant la plaque à 100 °C pendant 5 à 10 minutes, les taches violettes correspondant aux saponines apparaissent. Les rapports frontaux (R_f) pour l' α -hédérine et l'hédéracoside C obtenus sont respectivement 0,56 et 0,34.

Selon les analyses CCM, l' α -hédérine est récupérée dans les fractions de F_{α} '17 à F_{α} '22 (F_{α}') et l'hédéracoside C est récupérée dans les fractions de F_C '18 à F_C '24 (F_C'), (Figure 35).

Chacune des saponines ainsi collectées est caractérisée par LC-MS. Cependant, le profil du TIC obtenu par LC-MS indique la présence d'autres composés, par conséquent pour isoler l' α -hédérine et l'hédéracoside C sous forme pure une expérience en HPLC semi-préparative a été effectuée.

1.2.1.2. Isolement par HPLC semi-préparative

Afin de récupérer les deux saponines pures, une expérience en HPLC semi-préparative a été réalisée. L'appareil de chromatographie HPLC semi-préparative était équipé d'une colonne phase inverse et du même gradient d'élution qui celui utilisé pour les deux saponines : (eau/acétonitrile (A/B)) : 85/15 (5 min), 80/20 (10,5 min), 60/40 (5 min) et rinçage 90/10 (5 min).

Les deux saponines ne portant pas de chromophore, elles ne peuvent pas être détectées par UV en HPLC-semi préparative. Donc, pour contourner cette difficulté, dans le cas de l'hédéracoside C, on a choisi deux étalons internes détectables par UV : l'acide chlorogénique ($t_R = 7,5$ min) et la quercétine ($t_R = 16,8$ min) caractérisés par LC-MS, qui encadrent le temps de rétention de l'hédéracoside C ($t_R = 10,8$ min). En effet, dans ces conditions d'élution, l'hédéracoside C est collectée après l'acide chlorogénique ($t_R = 5,05$ min) et avant la quercétine ($t_R = 15,5$ min) (Figure 37). A partir de cette procédure, on a réussi à isoler l'hédéracoside C sur la colonne phase inverse semi-préparative.

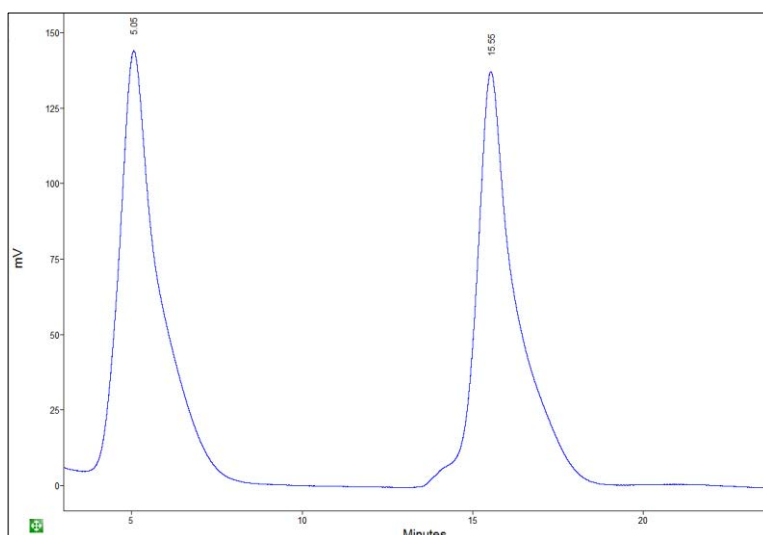


Figure 37 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de l'acide chlorogénique ($t_R = 5,05$ min) et la quercétine ($t_R = 15,5$ min) par HPLC-semi préparative.

Afin d'isoler de l' α -hédérine dont le temps de rétention ($t_R = 17,3$ min) est très proche de celui de la quercétine ($t_R = 16,8$ min), on a collecté les fractions à partir du temps de rétention de la quercétine ($t_R = 15,5$ min).

Le produit de cette expérience a permis de caractériser sans ambiguïté les deux saponines par leur rapport de m/z obtenu par LC-MS. Compte tenu de la masse initiale de poudre de lierre introduite au début de l'expérience, les masses des 2 saponines isolées se sont révélées trop faibles pour permettre une caractérisation par RMN. Cependant, cette expérience a permis de mettre en place une méthodologie afin d'isoler d'autres composés d'intérêts issus d'extraits végétaux.

1.2.2. L'hypéroside du millepertuis

La procédure d'extraction, d'isolement et de caractérisation des deux saponines précédentes a été appliquée pour isoler l'hypéroside contenu dans l'extrait des parties aériennes du millepertuis. Contrairement aux saponines, l'hypéroside est une flavone qui contient un chromophore détectable par UV (Figure 38).

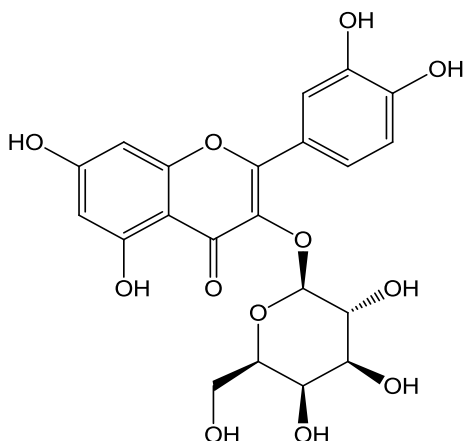


Figure 38 : *Hypéroside, le flavonoïde marqueur du millepertuis*

Dans cette expérience, nous avons utilisé deux fois plus de millepertuis séché que de lierre lors de l'expérience précédente. Donc, 300 g d'un échantillon broyé des parties aériennes du millepertuis a été utilisé. La macération de cet échantillon a été effectuée par une macération hydrométhanolique (méthanol/eau : 70/30). Le méthanol est évaporé sous vide. Ensuite les composés organiques tels que l'hypéroside sont extraits en phase organique par de l'acétate d'éthyle. Puis, l'acétate d'éthyle est évaporé sous vide pour donner un résidu sous forme de poudre de 17 g.

1.2.2.1. Chromatographie sur gel de silice et caractérisation par LC-MS

L'hypéroside est séparé par chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'élution dichlorométhane/méthanol (100/0 à 40/60) avec une pente de 10% et 10 mL par fraction (Figure 39).

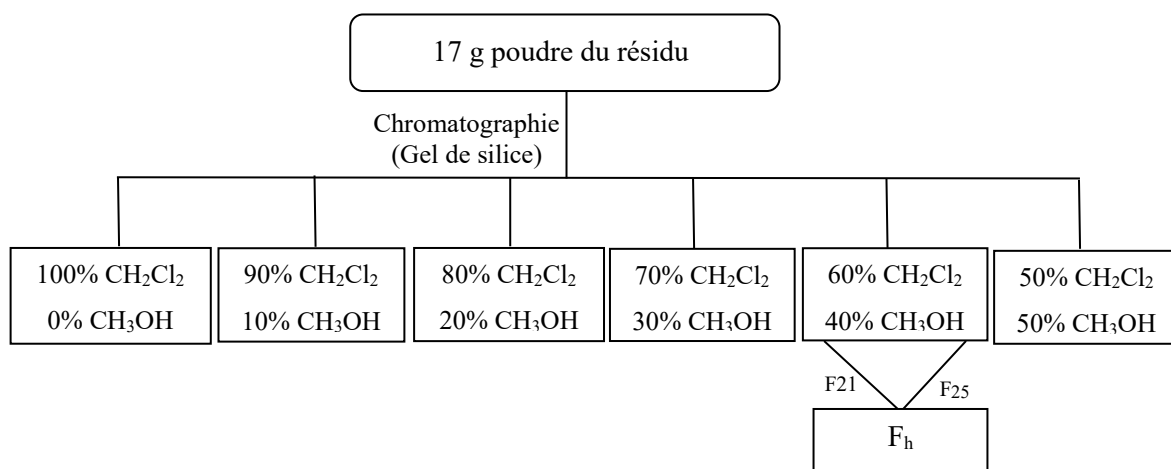


Figure 39 : *Diagramme de fractionnement par chromatographie sur gel de silice*

L'hypéroside contenu dans les fractions collectées est révélé par CCM et détecté à 254 nm. Le système d'élution était : méthanol/dichlorométhane (35/65). Le rapport frontal (R_f) obtenu est 0,56. Ensuite, l'hypéroside contenu dans les fractions collectées est caractérisé par LC-MS. Le temps de rétention de l'hypéroside est 11,7 min en utilisant un gradient d'élution (eau/acétonitrile (A/B)) suivant :

- 0-15 min de 90/10 à 60/40 (A/B)
- 15-15,5 min de 60/40 à 5/95
- 15,5-17 min, élution à 5/95 (pallier)
- 17-18,5 min de 5/95 à 90/10
- 18,5-22 min, élution à 90/10 (pallier)

La Figure 40 montre le profil de m/z 463 correspondant à l'hypéroside.

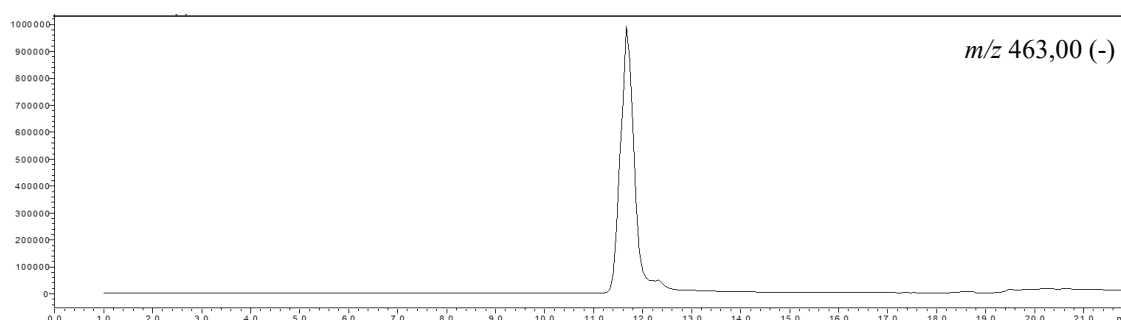


Figure 40 : Profil du chromatogramme d'ions extraits (SIM) de l'hypéroside (m/z 463)

Ces analyses montrent que l'hypéroside est élué dans les fractions de F21 à F25 en utilisant le mélange d'éluant dichlorométhane/méthanol : 60/40. Puis, les fractions de F21 à F25 sont rassemblées pour donner le mélange F_h (Figure 40). Ensuite, les solvants sont évaporés sous vide pour donner un résidu sous forme de poudre de 3,28 g.

1.2.2.2. Isolement par HPLC- semi préparative

Dans la dernière étape de l'isolement, un appareil HPLC semi-préparative équipé d'une colonne phase inverse a été utilisé. Comme cela a été décrit précédemment, l'hypéroside est détectable par UV et il peut être récupéré directement à partir du temps de rétention de son étalon interne. En utilisant le gradient d'élution : eau/acétonitrile (A/B) : 85/15 (5 min), 80/20 (10,5 min), 60/40 (5 min) et rinçage 90/10 (5 min), l'hypéroside est élué à $t_R = 16,45$ min.

Une solution méthanolique d'une concentration de 646 mg/mL préparée à partir de la poudre obtenue (3,28 g) est chromatographiée par HPLC semi-préparative. La Figure 41 montre le profil du chromatogramme UV à 240 nm de notre solution qui contient de l'hypéroside. Le pic intense du temps de rétention 16,45 min est celui de l'hypéroside. Dans ces conditions, après 20 injections successives, 3,71 mg d'hypéroside pur ont été récupérés sous forme de poudre.

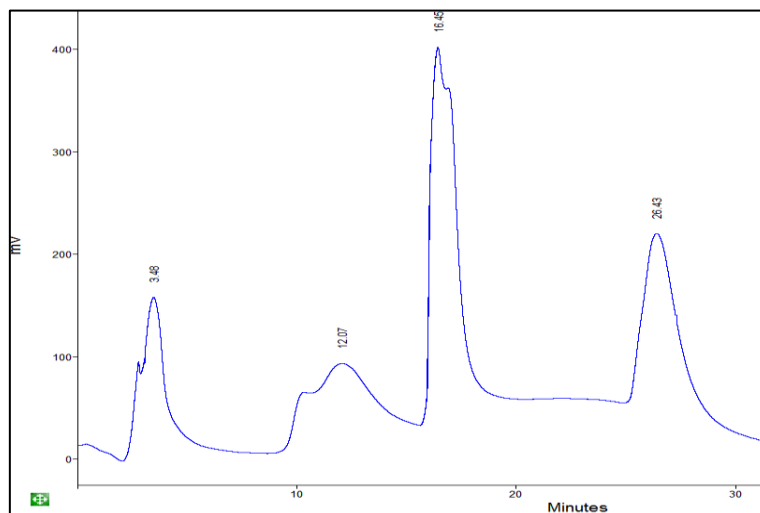


Figure 41 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de la solution contient l'hypéroside

1.2.2.3. Identification par LC-UV-ESI / MS

L'hypéroside isolé est identifié par PDA. La Figure 42 montre le profil du chromatogramme UV de ce flavonoïde à 240 nm.

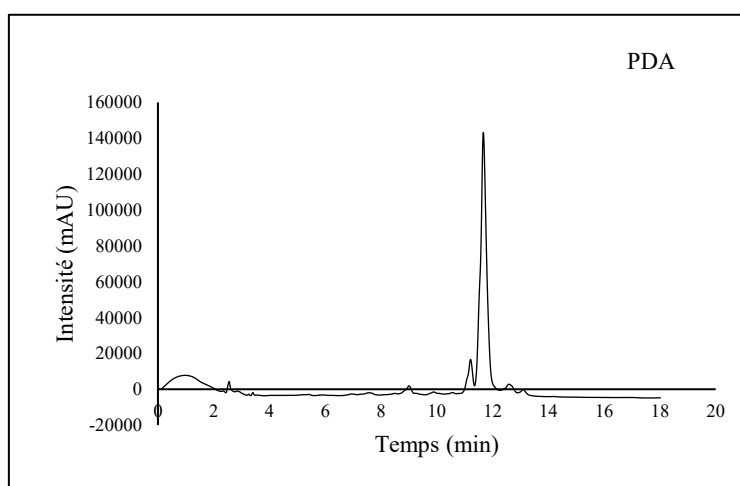


Figure 42 : Profil du chromatogramme UV à 240 nm de l'hypéroside isolé

De plus, l'hypéroside isolé est caractérisé par ESI/MS. Les profils des chromatogrammes : TIC (total ion current) et SIM (select ion monitoring) correspondant à l'hypéroside (m/z 463) isolé sont présentés sur la Figure 43. Ces chromatogrammes indiquent la pureté de notre échantillon.

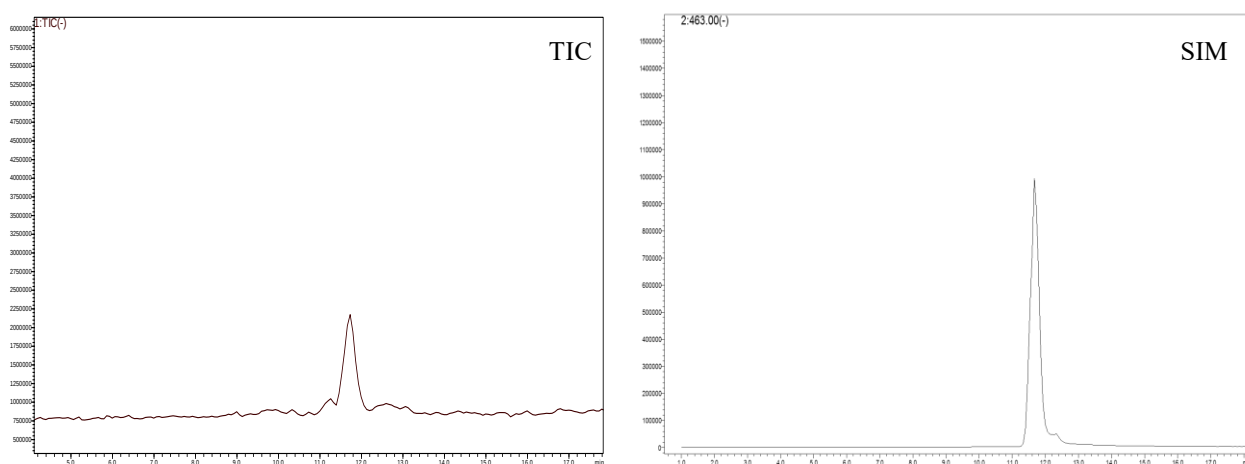


Figure 43 : Profils des chromatogrammes : TIC et SIM de l'hypéroside isolé

1.2.2.4. Caractérisation par RMN

La RMN permet de préciser la structure de l'hypéroside isolé. Les deux analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été effectuées. La Figure 44 montre les spectres RMN ^1H et ^{13}C de ce composé.

RMN ^1H (δ en ppm dans CDCl_3 et CD_3OD) de la partie aglycone :

7,9 (1 H, d, $J = 4,5$ Hz, H-2'), 7,6 (1 H, dd, $J = 2,23/2,38$ Hz, H-5'), 6,9 (1 H, d, $J = 10,5$ Hz, H-6'), 6,4 (1 H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8) et 6,2 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H-6).

RMN ^{13}C (δ en ppm dans CDCl_3 et CD_3OD) de la partie aglycone :

172,87 (C-4), 165,82 (C-7), 163,08 (C-5), 158,46 (C-9), 149,87 (C-4'), 145,98 (C-2), 145,98 (C-3'), 123,31 (C-3), 117,83 (C-1'), 116,48 (C-6'), 105,36 (C-5'), 103,56 (C-2'), 101,75 (C-10), 99,99 (C-6), 94,83 (C-8).



Figure 44 : Profils des RMN ¹H et ¹³C de l'hypéroside

2. Étude de la phytochimie de poudres

Les poudres (fournies par Libio) des neuf plantes ont été préparées selon le procédé PTC à l'aide d'un Pilote à l'échelle industrielle. Le Tableau 2 regroupe le nom des plantes sélectionnées et leurs parties d'intérêts qui sont utilisées. Les poudres sont classées en quatre fractions granulométriques : < 180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm, > 500 µm et la fraction non-tamisée. Pour la majorité de ces plantes, les analyse phytochimiques des poudres préparées à l'échelle du laboratoire ont été déjà effectuées [2]. Il est à noter que les échantillons de solidage et ceux de griffe du diable non pas été à l'échelle du laboratoire.

Tableau 2 : Les plantes sélectionnées et leurs parties d'intérêts

Plante	Partie d'intérêt
Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	Fruit
Rosier des chien (<i>Rosa canina</i> L.)	
Saule blanc (<i>Salix alba</i> L.)	Écorce
Millepertuis (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	Parties aériennes
Ortie (<i>Urtica dioica</i> L.)	
Piloselle (<i>Hieracium pilosella</i> Vaill.)	
Lierre (<i>Hedera helix</i> L.)	
Solidage (<i>Solidage</i> L.)	
Griffe du diable (<i>Harpagophytum</i> DC.)	Racine

Compte tenu de l'intérêt des résultats enregistrés en appliquant le procédé PTC à l'échelle du laboratoire sur différentes parties de plantes, il nous a paru important d'appliquer cette procédure à des fruits de la Région Lorraine. Donc, pour la première fois, nous avons étudié l'effet de la procédure PTC, à l'échelle du laboratoire, sur les propriétés phytochimiques de fruits en fonction de la granulométrie des échantillons. A cet effet, des poudres de quatre fruits de la Région Lorraine : la cerise (*Prunus avium* L.), la pêche (*Prunus persica* L.), la quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) et la mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*) ont été fournies par Libio. Les poudres sont classées en quatre classes granulométriques : < 180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm, > 500 µm et la fraction non-tamisée.

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Réactifs utilisés

Le Tableau 3 regroupe les noms des différents sels et des réactifs utilisés lors des expériences et leurs origines.

Tableau 3 : Les sels et les réactifs utilisés lors des expériences et leurs origines

Type	Nom	Fabricant
Sels	Carbonate de sodium	Acros Organics
	Nitrite de sodium	Acros Organics
	Chlorure d'aluminium	Acros Organics
	Hydroxyde de sodium	Acros Organics
Réactifs	Folin-Ciocalteu	Sigma - Aldrich
	DPPH [•]	Sigma - Aldrich
	ABTS	Sigma - Aldrich
	AAPH	Sigma - Aldrich

2.1.2. Préparation des poudres

2.1.2.1. Préparation de poudres des fruits à l'échelle du laboratoire

Les poudres des 4 fruits : la cerise, la pêche, la quetsche et la mirabelle ont été préparés en utilisant les appareils à l'échelle du laboratoire et fournies par Libio.

Le broyeur ultra-centrifuge Retsch ZM 200 (Haan, Allemagne) (Figure 45) est utilisé pour broyer les fruits séchés à une vitesse de 12 000 rpm. Cette vitesse est un compromis entre la finesse des poudres et la protection des principes actifs. Ensuite, une tamiseuse à vibrations ANALYSETTE 3 SPARTAN (Idar-Oberstein, Allemagne) (Figure 45) est utilisée pour fractionner les poudres en quatre classes granulométriques : < 180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm, > 500 µm et la fraction non-tamisée. Les poudres sont tamisées en mode vibration permanente pendant 10 min.



Broyeur ultra-centrifuge ZM



Tamiseuse ANALYSETTE 3 SPARTAN

Figure 45 : Le broyeur et la tamiseuse utilisé pour fractionner les poudres dans l'échelle du laboratoire

2.1.2.2. Préparation de poudres des plantes à l'échelle industrielle

Les poudres des 9 plantes sélectionnées (Tableau 2) ont été préparées par Pilote à l'échelle industrielle et fournies par la société AGRITECH dans le cadre du projet EXTRAPOLE.



Figure 46 : Une tamiseuse industrielle

2.1.3. Extraction hydroalcoolique des métabolites secondaires

L'extraction de métabolites secondaires de toutes les classes granulométriques des fruits et des plantes est effectuée par macération hydrométhanolique à partir de la méthode décrite par Zaiter et al. en 2016 [2], avec une légère modification.

Deux grammes de chaque fraction granulométrique est mise à macérer dans 20 mL d'une solution méthanol/eau 70/30 (v/v) pendant 24 heure à température ambiante sous agitation. L'extrait obtenu est centrifugé pendant 20 min et le surnageant est filtré (papier filtre : 10 à 20 μ m) et stocké dans des flacons ambrés scellés à 4 °C jusqu'à utilisation.

2.1.4. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante

Le dosage colorimétrique des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) et la détermination de l'activité antioxydante (AA) sont réalisés avec un spectrophotomètre UV-Vis, Scan.50 (Agilent, Santa Clara, Californie, USA). Les valeurs rapportées sont une moyenne et un écart-type de trois mesures ($n = 3$). L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel SAS (v8,2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les valeurs moyennes sont comparées en utilisant le test t de Student et considérées avec $p < 0,05$ comme significatives.

2.1.4.1. *Polyphénols totaux (PPT)*

La teneur en polyphénols totaux est déterminée selon la méthode décrite par Becker et al. en 2017 [313] en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu avec de petites modifications. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange de couleur jaune, d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les polyphénols et conduit à la formation d'un complexe de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), de coloration blue qui absorbe à une longueur d'onde de 750 nm.

Dans cette méthode, l'acide gallique est utilisé comme étalon. 100 μ L de chaque solution d'acide gallique ou 100 μ L d'extrait de chaque fraction granulométrique des plantes ou des fruits est ajouté à un tube contenant 6 mL d'eau distillée et 5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (1 N). Après 5 min, 5 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7%

est ajoutée. Le mélange est agité et maintenu à l'abri de la lumière à température ambiante pendant une heure. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

A partir des mesures effectuées avec l'acide gallique, une courbe d'étalonnage est tracée avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0,98$ (Figure 47). En utilisant la courbe d'étalonnage obtenue, la teneur en polyphénols totaux de chaque fraction granulométrique est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g MS).

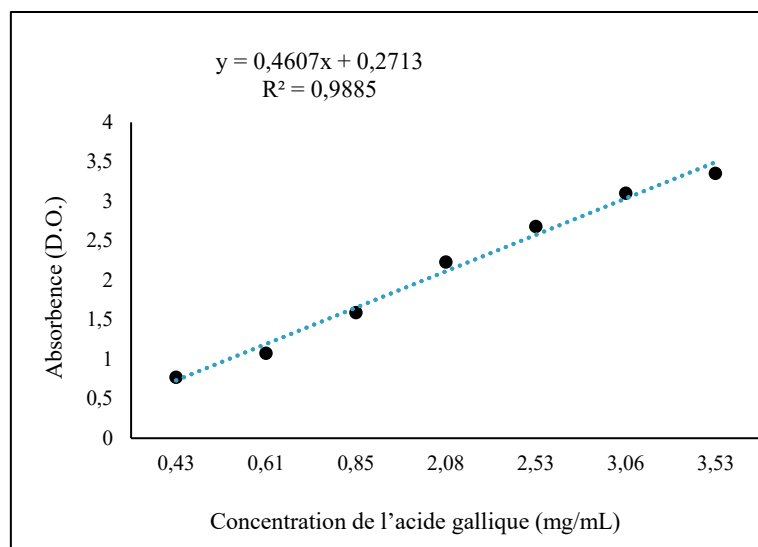


Figure 47 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique

2.1.4.2. Flavonoïdes totaux (FVT)

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée selon la méthode décrite par Zaiter et al. en 2016 [2] avec de petites modifications. Dans cette méthode, les réactifs sont des solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%) et chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%). La réaction d'oxydation des flavonoïdes entraîne la formation d'un complexe qui absorbe à 510 nm.

Dans cette méthode, la catéchine est utilisée comme étalon. 100 μL d'extrait de chaque solution de catéchine ou 100 μL d'extrait de chaque fraction granulométrique des plantes ou des fruits est ajouté dans un tube contenant 6 mL d'eau distillée et 300 μL de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5%. Après 5 minutes, 300 μL du chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) est ajouté et le mélange est agité. Ensuite, 1 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M est ajouté. L'absorbance est mesurée à 510 nm.

A partir des mesures effectuées avec la catéchine, une courbe d'étalonnage est tracée avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0,98$ (Figure 48). En utilisant la courbe d'étalonnage obtenue, la teneur en flavonoïdes totaux de chaque fraction granulométrique est exprimée en mg d'équivalent de catéchine par g de matière sèche (mg EC/g MS).

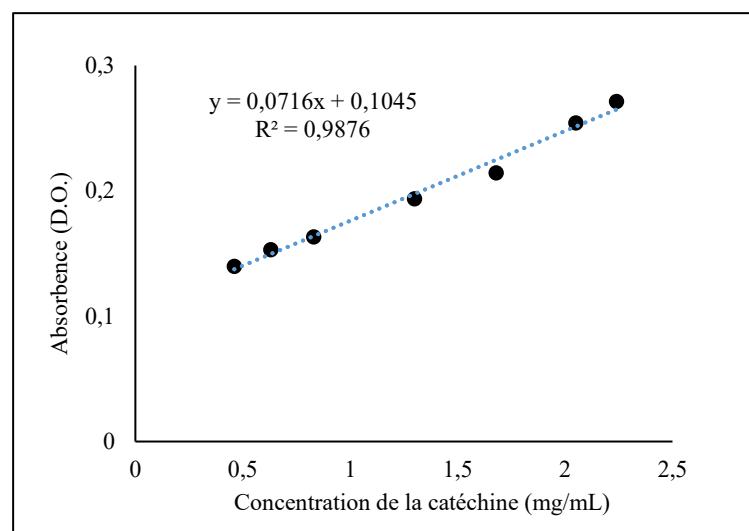


Figure 48 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de catéchine

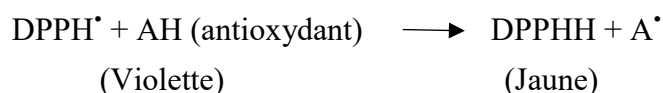
2.1.4.3. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de chaque fraction granulométrique des plantes et des fruits est réalisée selon la méthode décrite par Becker et al. en 2016 [313] en utilisant le radical DPPH[•] (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) avec de petites modifications.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante des fruits, le radical cation ABTS^{•+} est plus adapté. En effet, il est bien connu que les fruits sont riches en anthocyanines [314] [315]. Les anthocyanidines possèdent la même absorbance que le DPPH[•] (517 nm), donc la présence d'anthocyanines perturbe la lecture de l'absorbance du radical DPPH[•] [314]. Par conséquent, l'activité antioxydante des fruits est également évaluée par le test d'ABTS^{•+} selon la méthode décrite par Mousavi et al. en 2019 [268].

- Test DPPH

Le DPPH[•] est un radical libre de couleur violette avec une absorbance à 517 nm, qui est réduit en DPPHH de couleur jaune par des composés antioxydants. La décroissance de l'absorbance mesurée reflète la capacité antioxydante à capturer le radical libre DPPH[•].



Dans cette méthode, le trolox est utilisé comme étalonne. Une solution de 200 µM du DPPH[•] est préparée dans du méthanol et elle est gardée à l'abri de la lumière. Ensuite, 3 mL de cette solution de DPPH[•] (200 µM) est mélangé avec 100 µL d'extrait de chaque fraction granulométrique ou 100 µL de chaque solution de trolox. Le mélange réactionnel est maintenu dans l'obscurité pendant 30 minutes et l'absorbance est mesurée à 517 nm.

A partir des mesures effectuées avec le trolox, une courbe d'étalonnage est établie avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$ (Figure 49). En utilisant la courbe d'étalonnage obtenue, l'activité antioxydante (AA) est exprimée en mg d'équivalent de trolox par g de matière sèche (mg ET/g MS).

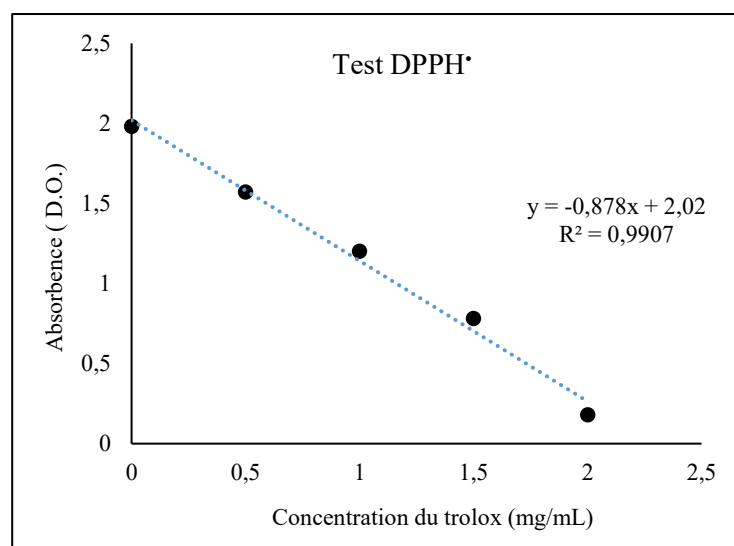
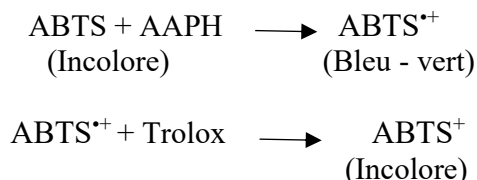


Figure 49 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du trolox

- Test ABTS

Dans ce test, l'antioxydant réduit le radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (bleu-vert) avec une absorbance à 734 nm en un cation ABTS^+ qui est incolore. La décroissance de l'absorbance mesurée reflète la capacité de capture du radical libre par l'antioxydant.



Pour préparer le tampon nécessaire une solution contenant 100 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) est préparée. Ensuite, une solution de 150 mM de NaOH est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH = 7,4. Deux différentes solutions constituées de 1 mM d'AAPH (2,2'-Azobis(2-méthylpropionamidine) dihydrochloride) et de 2,5 mM d'ABTS (l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) sont séparément préparées en utilisant la solution tampon préparée initialement. Puis, les deux solutions sont mélangées et incubées à l'abri de la lumière à 68 °C pendant 20 min. L'ABTS incolore vire au bleu-vert lorsqu'il est oxydé en $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par l'AAPH. La solution obtenue de l' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ doit être filtrée. Cette solution donne une absorbance comprise entre $0,65 \pm 0,02$ à 734 nm à température ambiante.

Dans cette méthode le trolox est utilisé comme étalon. 60 μL d'extrait de chaque fraction granulométrique de fruits ou 60 μL de chaque solution de trolox est ajouté à 2,94 mL de la solution d' $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Le mélange est incubé à 37 °C durant 30 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 734 nm. A partir des mesures effectuées avec le trolox, une courbe d'étalonnage est établie avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0,98$ (Figure 50). En utilisant la courbe d'étalonnage obtenue, l'activité antioxydante (AA) est exprimée en mg d'équivalent de trolox par g de matière sèche (mg ET/g MS).

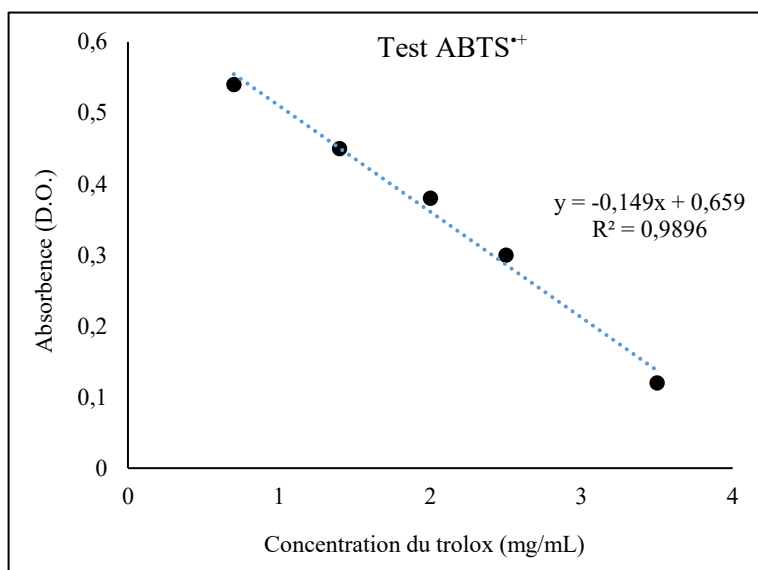


Figure 50 : La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du trolox

2.1.5. Analyses par chromatographie LC-UV-ESI/MS

2.1.5.1. Conditions analytiques

Les composés bioactifs sont identifiés et caractérisés l'aide d'un appareil Shimadzu LC-MS 2020 muni d'une colonne phase inverse "Ascentis C18" couplé en série à un détecteur PDA "SPD-M20A" et SM Quadripôle (Figure 33).

Les détails sur cet appareil ont été expliqués en partie : « 1.1.4. Appareillage ». Les deux solvants d'élution sont l'eau (A) (acidifiée à 0,5% avec de l'acide formique) et l'acétonitrile (B). Le gradient utilisé pour analyser nos extraits de plantes est le suivant :

- 0-10 min de 90/10 à 55/45 (A/B)
- 10-11 min de 55/45 à 40/60
- 11-15 min, élution à 40/60 (pallier)
- 15-15,50 min de 40/60 à 10/90
- 15,50-20 min, élution à 10/90 (pallier)
- 20-20,50 min de 10/90 à 90/10
- 20,50-25 min, élution à 90/10 (pallier)

Ce gradient est adapté à chaque extrait de plante afin d'optimiser la séparation des composés ciblés et afin d'obtenir la meilleure séparation possible.

Le gradient utilisé pour une séparation optimale des différents composés contenus dans nos extraits de fruits est le suivant :

- 0-15,50 min de 90/10 à 50/50 (A/B)
- 15,50-16 min de 50/50 à 10/90
- 16-20,50 min, élution à 10/90 (pallier)
- 20,50-21 min de 10/90 à 90/10
- 21-24 min, élution à 90/10 (pallier)

2.1.5.2. Courbe d'étalonnage

La quantification de chacun des composés a été effectuée à l'aide d'une courbe d'étalonnage à partir de son étalon externe. Cette courbe d'étalonnage peut être établie soit par PDA, soit par ESI/MS en mode SIM. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser le détecteur masse en mode SIM compte tenu de sa haute sensibilité. Cette sensibilité est déterminée par les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ), définies comme étant respectivement 3 fois et 10 fois la valeur du rapport signal sur bruit du fond.

Les formules utilisées pour le calcul sont les suivantes : $LOD = 3\sigma/a$ et $LOQ = 10\sigma/a$

Avec : $\sigma = \sqrt{\sum (Y - Y_i)^2 / n-1}$

- a : pente de la courbe de calibration des aires en fonction de la concentration ;
- Y : aire moyenne ;
- Y_i : aire moyenne recalculée avec les coefficients de la droite de régression ;
- n : nombre des dilutions réalisées.

A noter que ces calculs sont automatisés grâce à la méthode d'analyse utilisée pour chaque plante et les analyses sont réalisées trois fois.

2.2. Résultats et discussions

A. Echelle industrielle – Pilote

2.A.1. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydant

Les dosages en teneur de polyphénols totaux (PPT), en teneur de flavonoïdes totaux (FVT) ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante (AA) des différentes classes granulométriques : < 180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm et > 500 µm et de la fraction non-tamisée correspondant de chaque plante ont été effectuées. Les valeurs rapportées sont une moyenne et un écart-type de trois mesures (n = 3). Pour chaque analyse, les valeurs surmontées de lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$). Afin de vérifier que le procédé PTC appliqué à l'échelle industrielle améliore les propriétés phytochimiques des poudres, les teneurs en PPT et en FVT ainsi que l'AA des fractions tamisées sont comparées à celles des fractions broyées mais non- tamisées.

2.A.1.1. Graines du fenouil

Les teneurs obtenues en polyphénols totaux (PPT) et en flavonoïdes totaux (FVT) et les valeurs enregistrées des activités antioxydantes (AA) pour les quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée sont présentées sur l'histogramme de la Figure 51.

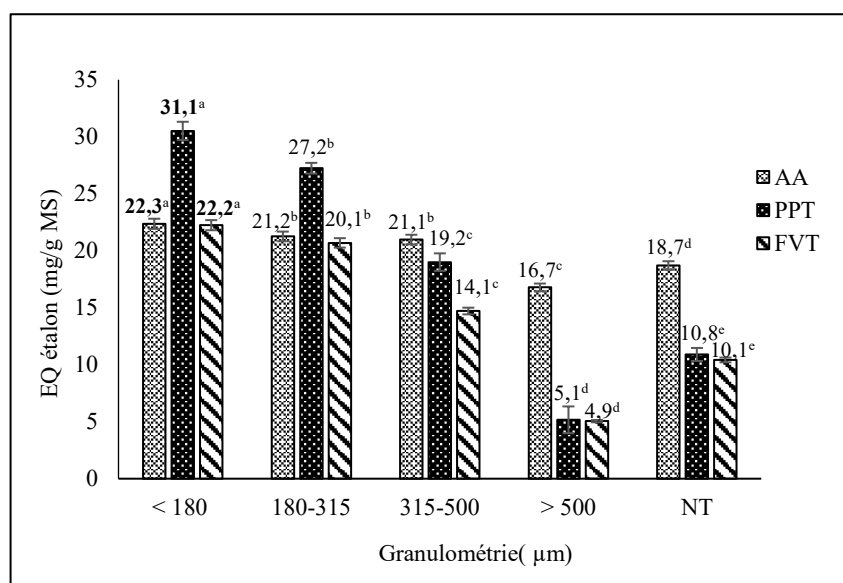


Figure 51 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du fenouil

Cet histogramme montre les différences significatives des PPT et également des FVT en fonction des fractions granulométriques. Les valeurs maximales de PPT et FVT ont été obtenues pour la fraction < 180 µm avec 31,15 ± 0,02 mg EAG/g MS et 22,26 ± 0,01 mg EC/g MS, respectivement. La teneur de PPT dans la fraction < 180 µm est 2,8 fois plus que celle de la fraction non-tamisée. Selon cet histogramme, les valeurs minimales de PPT et de FVT ont été obtenues pour la fraction > 500 µm. Il apparaît qu'en réduisant la taille des particules, la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux est augmentée de manière remarquable.

De plus, la taille des particules inférieure à 180 µm donne une valeur maximale d'activité antioxydante avec 22,35 ± 0,01 mg ET/g MS. Selon cet histogramme, il existe une corrélation positive entre l'AA et PPT ($R^2 = 0,91$). La fraction > 500 µm et la fraction NT possèdent les AA élevées, comparables aux différentes fractions granulométriques, pour un taux de PPT plus faible. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que d'autres antioxydants, comme la vitamine C [17], jouent un rôle important sur les activités antioxydantes de la fraction > 500 et la fraction NT.

2.A.1.2. *Ecorce du saule blanc*

La Figure 52 montre les teneurs en PPT et en FVT et les valeurs des activités antioxydantes des poudres de cette plante pour différentes classes granulométriques.

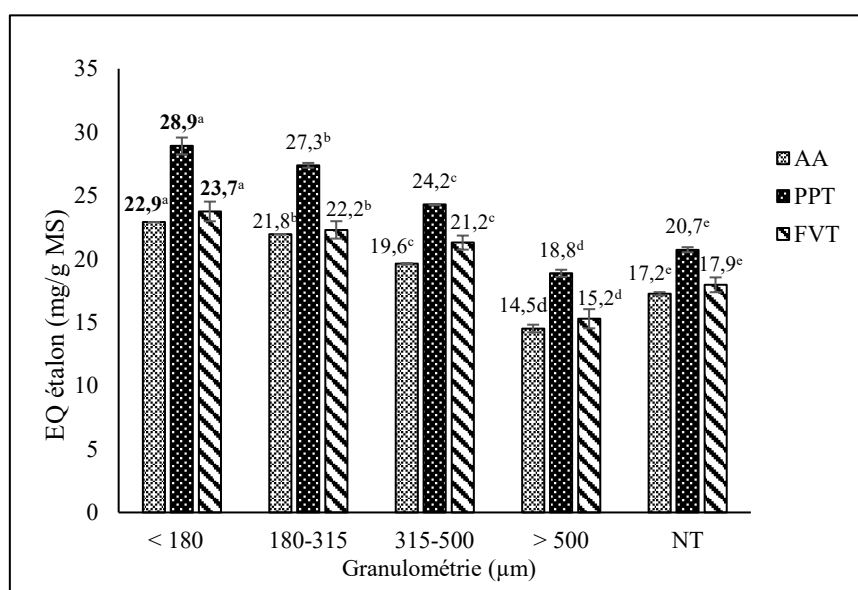


Figure 52 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et les activités antioxydants (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du saule blanc

Les résultats obtenus montrent que les teneurs en polyphénols totaux (PPT) et en flavonoïdes totaux (FVT) varient selon des tailles de particules. Les fractions granulométriques contenant les tailles de particules les plus fines sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes. La fraction < 180 µm possède les valeurs maximales de PPT et de FVT avec $28,91 \pm 0,03$ mg EAG/g MS et $23,75 \pm 0,01$ mg EC/g MS, respectivement. L'histogramme montre les valeurs minimales de PPT et FVT pour la fraction > 500 µm.

De plus, la valeur maximale de l'activité antioxydante est associée à la fraction < 180 µm avec $22,96 \pm 0,01$ mg ET/g MS qui présente une augmentation de 34% de l'AA par rapport à celle de la fraction non-tamisée. D'autre part, la fraction granulométrique supérieure à 500 µm possède une valeur minimale de l'activité antioxydante avec $14,54 \pm 0,01$ mg ET/g MS. Selon ces résultats, il existe une corrélation positive ($R^2 = 0,98$) entre l'AA et le PPT qui montre le rôle principal des polyphénols pour l'activité antioxydante de l'écorce du saule blanc.

2.A.1.3. *Parties aériennes du millepertuis*

L'histogramme en Figure 53 montre les teneurs de PPT et de FVT et les valeurs de l'AA des fractions tamisées et de la fraction non-tamisée de cette plante.

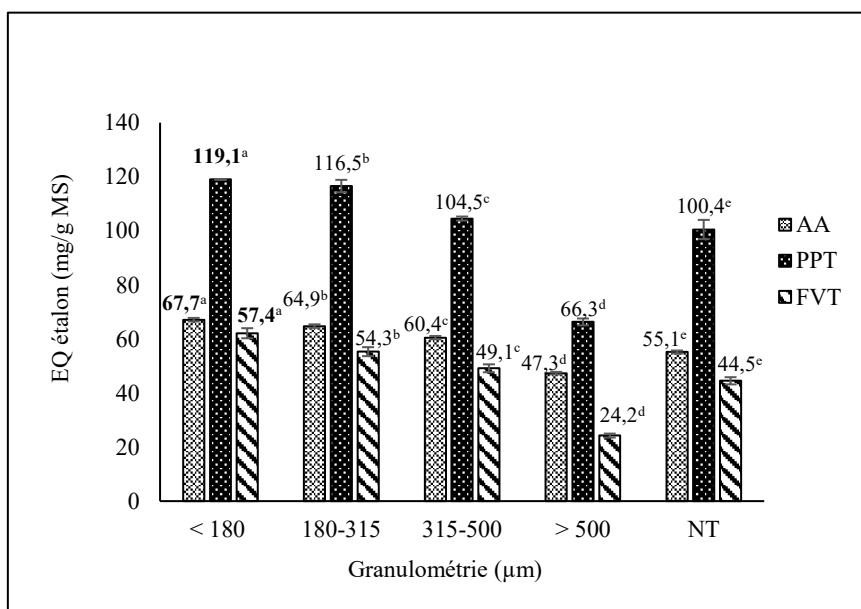


Figure 53 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du millepertuis.

Cet histogramme montre les variations significatives pour le PPT, le FVT et l'AA entre les différentes classes granulométriques. On observe la teneur très élevée en polyphénols dans toutes les fractions et la valeur maximale de $119,15 \pm 0,01$ mg EAG/g MS est atteinte pour la fraction $< 180 \mu\text{m}$. Une teneur maximale en FVT est également obtenue pour cette fraction avec $57,42 \pm 0,03$ mg EC/g MS.

Apparemment, la fraction $< 180 \mu\text{m}$ possède la meilleur d'activité antioxydante avec $67,73 \pm 0,01$ mg ET/g MS. Du plus, toutes les valeurs minimales du PPT, du FVT et de l'AA correspondent à la fraction contenant des particules de taille supérieure à $500 \mu\text{m}$.

Les teneurs de PPT des poudres en fonction de la granulométrie suivent la même tendance que la valeur des activités antioxydantes ($R^2 = 0,92$), qui montre le rôle principal des polyphénols pour l'AA des parties aériennes du millepertuis.

2.A.1.4. *Parties aériennes de l'ortie*

Les différentes classes granulométriques des poudres de cette plante donnent différentes teneurs en PPT et en FVT et les différentes valeurs des activités antioxydantes sont présentées en histogramme de la Figure 54.

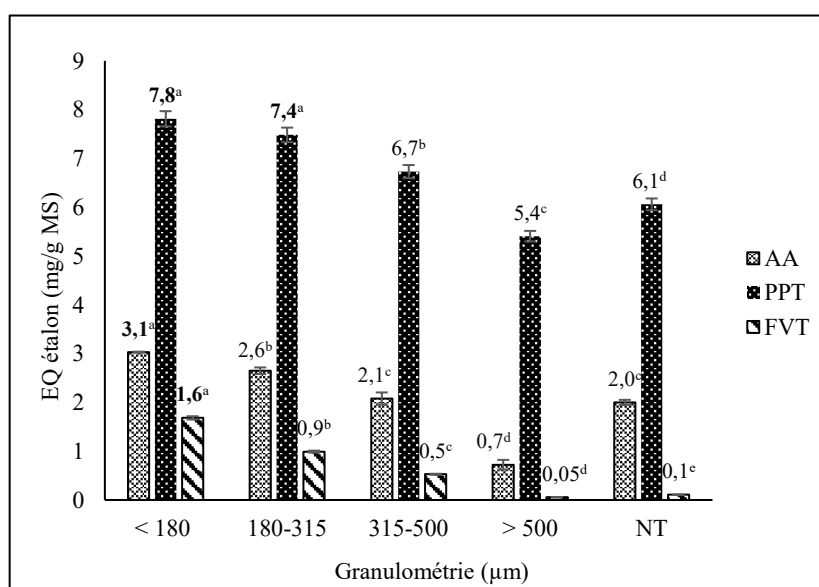


Figure 54 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de l'ortie

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux ainsi que les valeurs des activités antioxydantes sont très faibles.

Les poudres des deux fractions contenant des tailles de particules inférieures à 315 μm possèdent les valeurs maximales pour AA, PPT et FVT. L'analyse de la fraction 180-315 μm donne une AA très proches de celle de la fraction inférieure à 180 μm .

Selon ces résultats, grâce un procédé granulométrique différentiel, le PTC (Pilote), la fraction < 180 μm avec une activité antioxydante maximale de $7,84 \pm 0,03$ mg/g MS montre une augmentation de 50% de l'AA comparativement à la fraction non-tamisée.

De plus, l'échantillon non-tamisé donne des valeurs supérieures à celles obtenues avec une taille de particules supérieure à 500 μm . L'activité antioxydante des différentes fractions granulométriques est directement corrélée ($R^2 = 0,91$) à la teneur en polyphénols totaux.

2.A.1.5. *Parties aériennes de la solidage*

Pour les parties aériennes de cette plante, la détermination des PPT et des FVT et l'évaluation des activités antioxydantes en fonction de la granulométrie ont été réalisées. La Figure 55 présente les résultats obtenus.

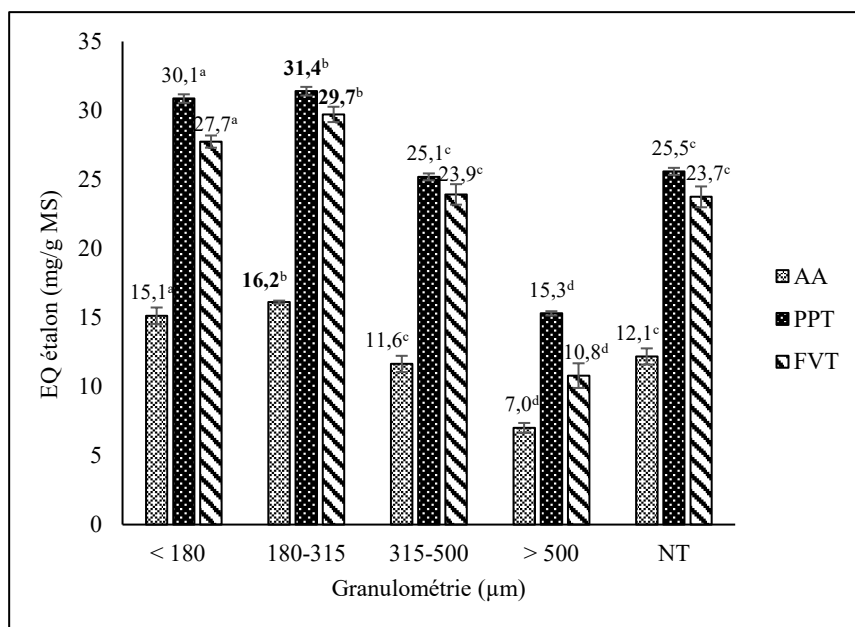


Figure 55 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la solidage

Les résultats enregistrés indiquent que les différentes fractions granulométriques possèdent des teneurs différentes en PPT et AA, qui suivent la même tendance ($R^2 = 0,99$).

À la vue de ces résultats, la fraction 180-315 μm possède les meilleurs teneurs en PPT et en FVT, avec respectivement $31,44 \pm 0,02$ mg EAG/g MS et $29,72 \pm 0,03$ mg EC/g MS. Ces résultats indiquent que le procédé PTC (Pilote) a un effet positif sur l'enrichissement en polyphénols dans une fraction spécifique (180-315 μm).

En revanche, les poudres dont la taille des particules est supérieure à 500 μm contiennent les niveaux les plus bas de PPT et de FVT.

La valeur maximale de l'activité antioxydante est également pour la fraction 180-315 μm avec $16,26 \pm 0,01$ mg ET/g MS, ce résultat est 2 fois plus élevé que celui obtenu pour la fraction > 500 μm .

2.A.1.6. *Parties aériennes de la piloselle*

La Figure 56 présente les résultats obtenus lors de la détermination des PPT, des FVT et de l'évaluation des activités antioxydantes des différentes classes granulométriques et de la fraction non-tamisée.

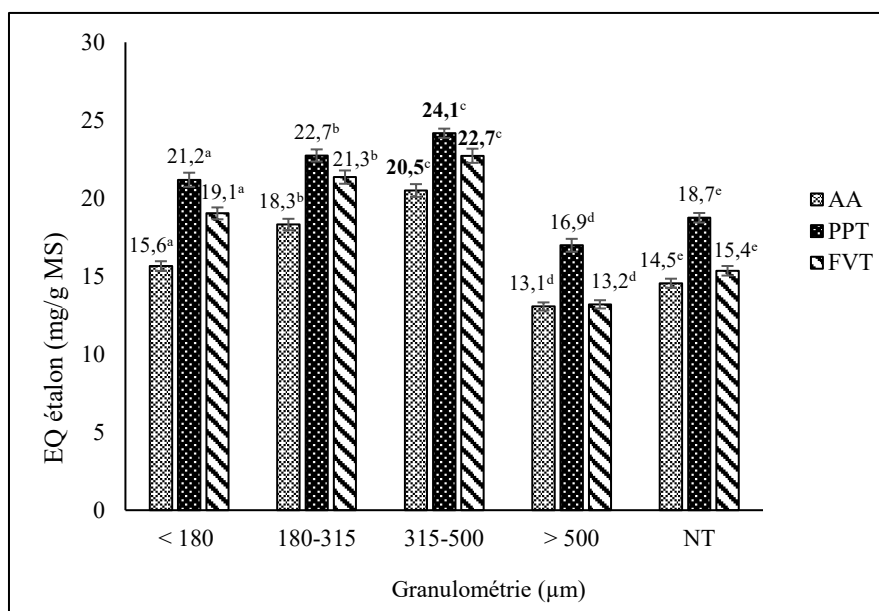


Figure 56 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la piloselle

Cet histogramme montre clairement une différence entre les teneurs de PPT et de FVT et les valeurs d'AA en fonction de la granulométrie. Il apparaît qu'il y a une corrélation positive ($R^2 = 0,93$) entre les teneurs en PPT et les activités antioxydantes des différentes fractions. Par conséquent, on peut noter que l'activité antioxydante est directement affectée par la teneur en polyphénols totaux.

Les valeurs maximales de PPT et de FVT sont relatives à la fraction 315-500 μm avec respectivement $24,13 \pm 0,02$ mg EAG/g MS et $22,73 \pm 0,02$ mg EC/g MS. De plus, la meilleure valeur pour l'AA est également obtenue pour cette fraction avec $20,57 \pm 0,04$ mg ET/g MS, ce qui correspond à 1,3 fois plus que la valeur de l'AA de la fraction non-tamisée.

De plus, la plante non-tamisée présente les plus faibles valeurs d'AA, PPT et FVT par rapport aux fractions tamisées, à l'exception de la fraction > 500 μm .

2.A.1.7. *Fruits du rosier des chiens*

Les résultats obtenus pour les analyses phytochimiques correspondant à la détermination des PPT, des FVT et à l'évaluation de l'AA des poudres sont rapportées en Figure 57.

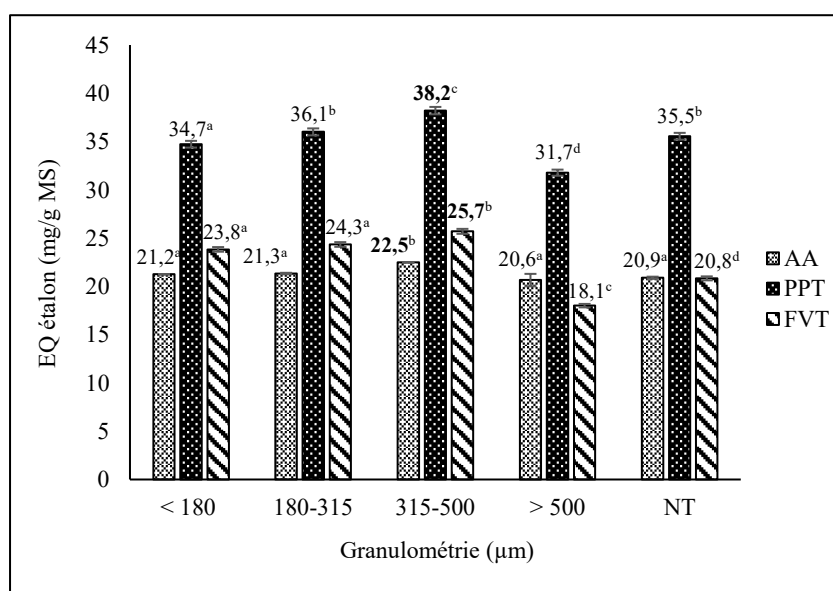


Figure 57 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du rosier des chiens

Selon cet histogramme, les valeurs maximales de polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux correspondent à la fraction 315-500 μm avec $38,21 \pm 0,02$ mg EAG/g MS et $25,77 \pm 0,02$ mg EC/g MS, respectivement.

Parmi toutes les fractions granulométriques, l'activité antioxydante est également la meilleure pour la fraction 315-500 μm avec une concentration maximale de $22,58 \pm 0,01$ mg ET/g MS.

Apparemment, il existe une corrélation positive entre les PPT et les AA de différentes fractions, mais avec un faible coefficient de détermination ($R^2 = 0,75$). On n'observe pas de variation remarquable entre les activités antioxydantes des différentes classes granulométriques. Cela peut être dû, d'une part, à la présence de la vitamine C qui a un effet essentiel sur l'AA du cynorhodon [67], et d'autre part, à la présence des anthocyanines [316] qui ont la même absorbance que le DPPH $\cdot$ (517 nm) ce qui entraîne une perturbation de la lecture de l'absorbance du radical DPPH $\cdot$.

2.A.1.8. Racine de la griffe du diable

L'histogramme en Figure 58 présente les résultats des PPT, des FVT ainsi que les valeurs l'AA obtenus pour la griffe du diable.

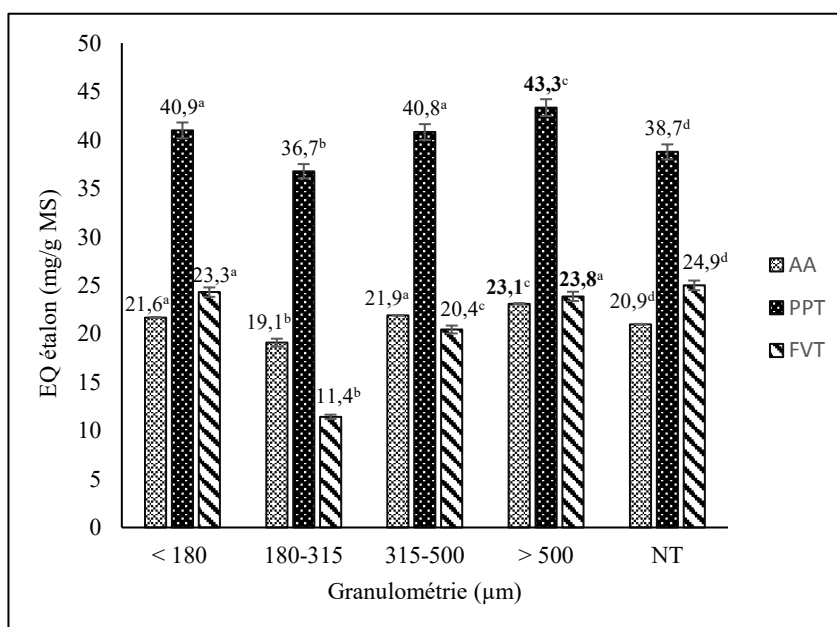


Figure 58 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la griffe du diable

La variation entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des différentes classes granulométriques peut être observée. La racine de la griffe du diable est le seul échantillon qui montre une activité antioxydante maximale pour la fraction $> 500 \mu\text{m}$ avec $23,16 \pm 0,01 \text{ mg ET/g MS}$. Du plus, la meilleure teneur en PPT appartient à la même fraction ($> 500 \mu\text{m}$) avec $43,35 \pm 0,03 \text{ mg EAG/g MS}$.

L'histogramme montre qu'il y a une corrélation positive entre l'AA, les PPT et les FVT ($R^2 = 0,96$). Selon ces résultats, dans la fraction des particules de taille comprise entre $180 \mu\text{m}$ et $315 \mu\text{m}$, on note une diminution en PPT et FVT, ceci n'est pas observé pour l'AA. Ces observations peuvent être expliquées par la présence d'autres antioxydants (tels que l'harpagoside [317]) qui influent sur la valeur de l'AA.

2.A.1.9. *Parties aériennes du lierre*

Les résultats obtenus lors des analyses phytochimiques (PPT, FVT et l'AA) des fractions granulométriques et la fraction non-tamisée sont présentées en Figure 59.

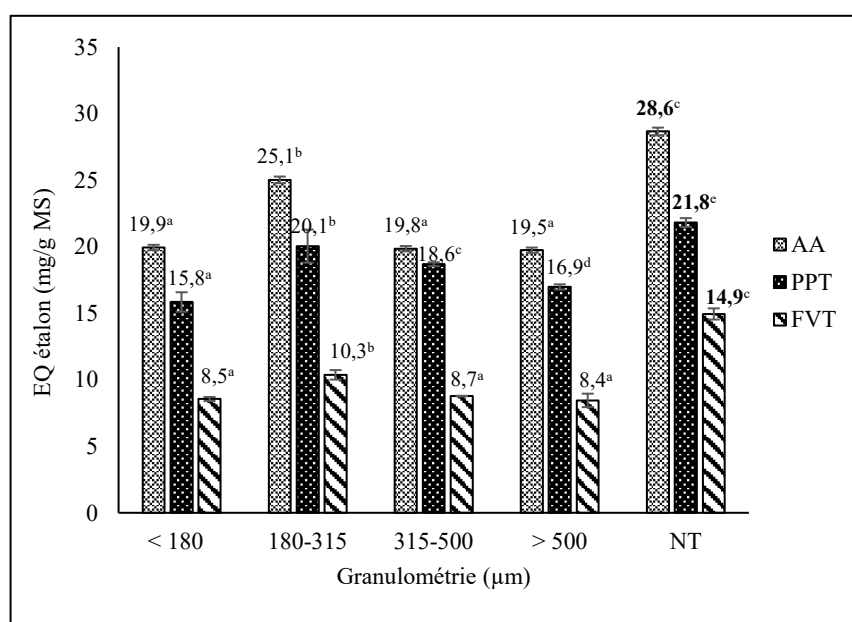


Figure 59 : Polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et activités antioxydantes (AA) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) du lierre

Cet histogramme montre clairement que les teneurs en flavonoïdes, en polyphénols et la valeur de l'activité antioxydante sont élevées dans la fraction non-tamisée avec respectivement $14,9 \pm 0,01$ mg EC/g MS, $21,8 \pm 0,01$ mg EAG/g MS et $28,6 \pm 0,01$ mg ET/g MS.

Contrairement aux résultats obtenus par le PTC à l'échelle du laboratoire [318], les résultats enregistrés pour la procédure PTC à l'échelle industrielle (Pilote) n'indiquent pas d'effets positifs ni sur l'extraction différentielle des polyphénols et flavonoïdes, ni sur améliorer de l'activité antioxydante des parties aériennes du lierre. Il semblerait, après analyse des tailles de particules que la fraction NT du lierre ne soit pas correcte et qu'une erreur se soit introduite dans la prise de l'échantillon.

2.A.1.10. Comparaison des résultats par PTC à l'échelle du laboratoire à celle obtenue par PTC à l'échelle industrielle

Les activités antioxydantes (AA), les teneurs en polyphénols totaux (PPT) et les teneurs en flavonoïde totaux (FVT) des 8 plantes en fonction de différentes classes granulométriques : $< 180 \mu\text{m}$, $180-315 \mu\text{m}$, $315-500 \mu\text{m}$, $> 500 \mu\text{m}$ ont été comparées avec celles obtenues pour les plantes non-tamisées afin de montrer l'efficacité du procédé PTC en mode Pilote. Le Tableau 4 montre pour chacune des plantes, le pourcentage d'augmentation de l'AA pour la fraction granulométrique qui présente la meilleure AA, comparée avec celle obtenue pour la fraction non-tamisée.

Tableau 4 : L'AA de la fraction granulométrique sélectionnée, l'AA de la fraction non-tamisée et le pourcentage d'augmentation de l'AA de chaque plante.

Plante	Granulométrie	L'AA (mg ET/g MS) Fractions granulométriques	L'AA (mg ET/g MS) Fractions Non Tamisée	%Augmentation
Fenouil	$< 180 \mu\text{m}$	$22,35 \pm 0,01$	$18,74 \pm 0,03$	19
Saule blanc	$< 180 \mu\text{m}$	$22,96 \pm 0,01$	$17,25 \pm 0,01$	33
Millepertuis	$< 180 \mu\text{m}$	$67,73 \pm 0,01$	$55,13 \pm 0,01$	23
Ortie	$< 180 \mu\text{m}$	$3,12 \pm 0,01$	$2,01 \pm 0,02$	55
Solidage	$180-315 \mu\text{m}$	$16,26 \pm 0,01$	$12,11 \pm 0,03$	35
Piloselle	$315-500 \mu\text{m}$	$20,57 \pm 0,04$	$15,18 \pm 0,01$	36
Rosier des chiens	$315-500 \mu\text{m}$	$22,58 \pm 0,01$	$20,91 \pm 0,01$	8
Griffe du diable	$> 500 \mu\text{m}$	$23,16 \pm 0,01$	$20,92 \pm 0,01$	11

Un calcul du pourcentage d'augmentation de l'activité antioxydante des fractions sélectionnées par PTC à l'échelle industrielle par rapport aux fractions non-tamisées révèle que dans tous les cas le procédé améliore cette activité mais avec différents pourcentages. En particulier, dans le cas de la fraction $< 180 \mu\text{m}$ de l'ortie dont le gain est de 55% plus grand que la fraction non-tamisée.

- Dans le cas des grains de fenouil, d'écorce du saule blanc, des parties aériennes du millepertuis et des parties aériennes de l'ortie, les meilleures valeurs des activités antioxydantes sont associées à la fraction $< 180 \mu\text{m}$.
- La solidage (les parties aériennes) est la seule plante dont la fraction granulométrique 180-315 μm possède une activité antioxydante maximale.
- Dans le cas des parties aériennes de la piloselle et des fruits du rosier des chiens (cynorhodon), la fraction 315-500 μm présente les meilleurs résultats pour l'activité antioxydante.
- Pour la racine de la griffe du diable, les poudres avec des tailles des particules supérieures à 500 μm montrent une valeur élevée pour l'AA.

Dans la majorité des résultats, les meilleures activités antioxydantes sont obtenues pour les fractions granulométriques inférieures à 500 μm . Dans le cas des fractions granulométriques supérieures à 500 μm , on observe une diminution de l'activité antioxydante ce qui serait dû à une forte proportion en fibres et en glucides.

De plus, le Tableau 5 présente pour chacune des plantes, une comparaison de la meilleure activité antioxydante de la fraction granulométrique obtenue par PTC à l'échelle du laboratoire à celle obtenue par PTC à l'échelle industrielle.

Il faut préciser que la solidage et la griffe du diable n'ont pas été étudiés à l'échelle du laboratoire et les études de la phytochimie ont été seulement effectuées sur leurs poudres en fonction de la granulométrie obtenue par le PTC à l'échelle industrielle.

Tableau 5 : Comparaison entre les granulométries des meilleures AA des six plantes

Plante	Granulométrie à l'échelle du laboratoire	Granulométrie à l'échelle industrielle
Fenouil	< 180 µm [319]	< 180 µm
Saule blanc	< 180 µm [320]	< 180 µm
Millepertuis	< 180 µm [229]	< 180 µm
Ortie	< 180 µm [2]	< 180 µm
Piloselle	315-500 µm [313]	315-500 µm
Rosier des chiens	315-500 µm [2]	315-500 µm

Comme le montre le Tableau 5, pour les 6 plantes sélectionnées, la meilleure d'activité antioxydante se révèle dans la même classe granulométrique.

Nos résultats confirment que, comme à l'échelle du laboratoire, le fractionnement des poudres par PTC à l'échelle industrielle est une méthode qui augmente considérablement le rendement d'extraction des métabolites secondaires par voie sèche.

On sait que la membrane cellulaire est constituée par des macromolécules telles que les polysaccharides qui protègent les vacuoles et les vésicules où se trouvent les métabolites secondaires. Comme le mentionne Zhao et al. en 2015 [233], la destruction de la membrane cellulaire au cours de la procédure de broyage entraîne la libération de certains composés phénoliques.

C'est en accord avec la bibliographie en effet, les fibres sont plus difficiles à broyer car elles ne sont pas cassées au cours du processus PTC. Donc, les molécules de grande taille telles que les glucides et les lignines sont retenues et leur teneur dans les poudres diminue ainsi, en diminuant la taille de particules, le taux en métabolites secondaires augmente. Par conséquent, les classes granulométriques plus petites révèlent une concentration plus élevée en composés bioactifs [229].

L'originalité des résultats à l'échelle du laboratoire sur le fenouil est validée par une publication intitulée : « *Optimisation of phytochemical characteristics and antioxidative properties of Foeniculum vulgare Mill. seeds and Ocimum basilicum L. leaves superfine powders using new parting process* » [317], dans la revue *Phytochemical Analysis*, Annex II.

2.A.2. Analyses par chromatographie LC-UV-ESI/MS

Les fractions granulométriques et la fraction non-tamisée de chaque plante ont été analysées par LC-UV-ESI/MS. Les métabolites secondaires de chaque plante ont été identifiés par PDA à l'aide des temps rétentions de leur étalon externe. De plus, ils ont été caractérisés par leurs rapports m/z en utilisant la spectroscopie de masse (SIM). Ils ont été également quantifiés à l'aide des courbes d'étalonnage de leur étalon respectif. Les concentrations rapportées sont une moyenne de trois mesures ($n = 3$). La concentration maximale de chaque composé est indiquée en gras.

2.A.2.1. *Graines du fenouil*

Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction $< 180 \mu\text{m}$ de cette plante est présenté en Figure 60.

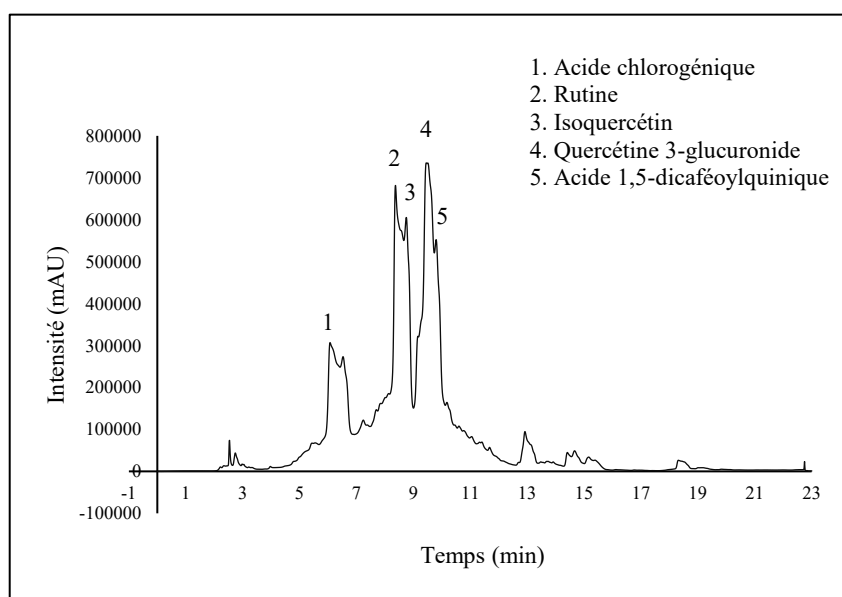


Figure 60 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction $< 180 \mu\text{m}$ du fenouil

Cinq composés phénoliques ont été identifiés en fonction de leur temps rétention. Le chromatogramme montre une coélution de la rutine et de l'isoquercétine ainsi que de la quercétine 3-glucuronide et de l'acide 1,5-dicaféoylquinique. Cette difficulté a été résolue par leur caractérisation à l'aide spectrométrie de masse (SIM). Les deux composés caractéristiques : la quercétine-3-glucuronide et l'acide 1,5-dicaféoylquinique (Figure 61) sont observés pour des temps de rétention respectivement de 8,6 min et de 9,5 min.

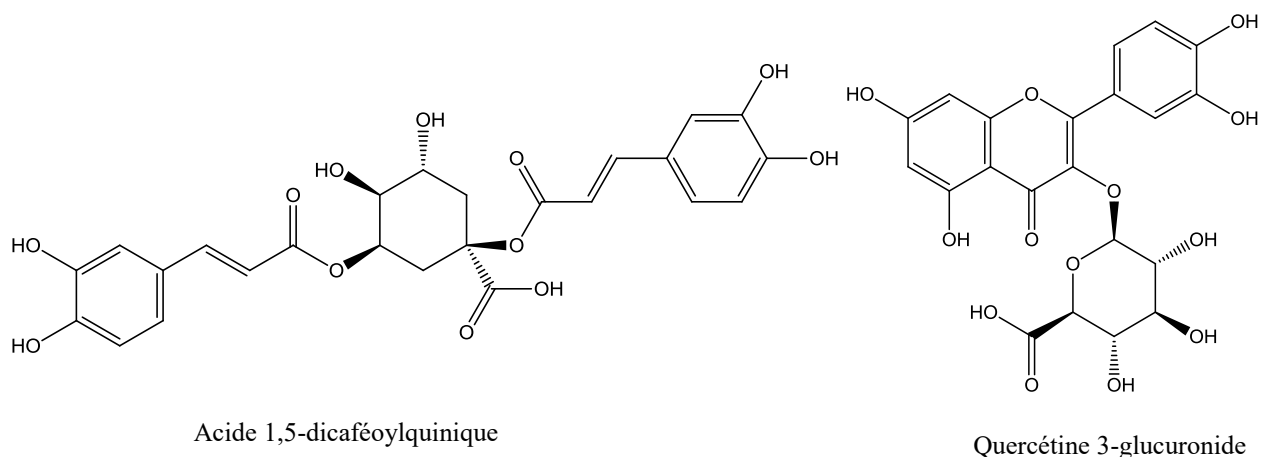


Figure 61 : Les marqueurs dans les grains du fenouil

Les profils des chromatogrammes en Figure 62 montrent les rapports m/z de la quercétine 3-glucuronide (m/z 477) et de l'acide 1,5-dicaféoylquinique (m/z 515). Les profils du chromatogramme d'ions extraits (SIM) des autres composés caractérisés sont en Figure 1, Annexe I.

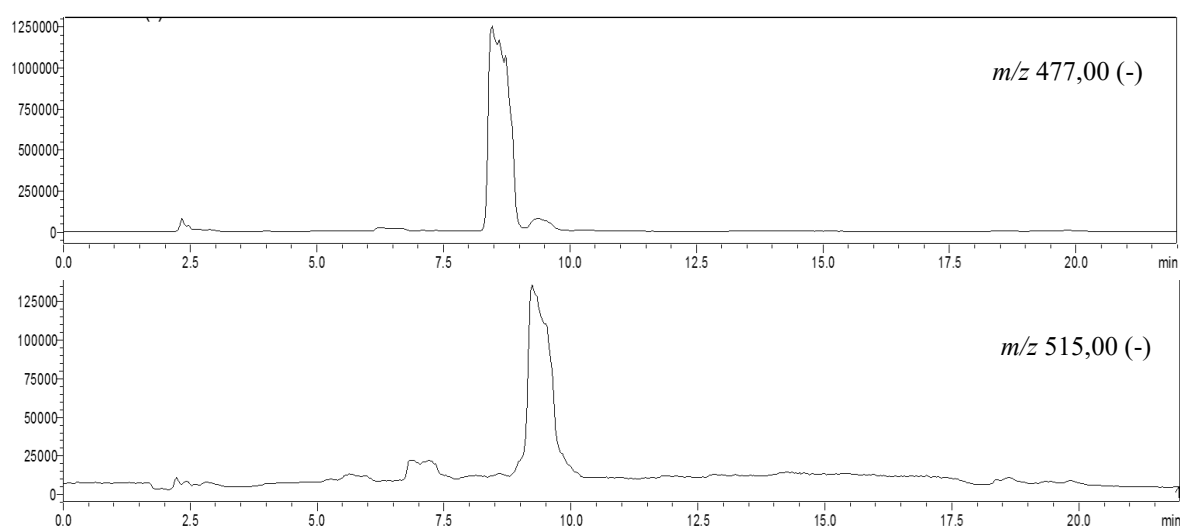


Figure 62 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la quercétine 3-glucuronide (m/z 477) et de l'acide 1,5-dicaféoylquinique (m/z 515) pour la fraction $< 180 \mu m$.

Les concentrations des cinq composés caractérisés par SIM en fonction de leur granulométrie ont été calculées à l'aide de leur courbe d'étalonnage. Le Tableau 6 montre les résultats.

Tableau 6 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée du fenouil.

Composé bioactif (<i>m/z</i>)	Famille Moléculaire	<i>t_R</i> (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 µm	180-315 µm	315-500 µm	> 500 µm	NT
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	6,2	1,41 ± 0,03	1,28 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,75 ± 0,01
Rutine (609)	Flavonoïde	8,2	0,81 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,36 ± 0,01
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	8,4	0,31 ± 0,01	0,25 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,12 ± 0,02
Quercétine 3-glucuronide (477)	Flavonoïde	8,6	3,04 ± 0,01	2,93 ± 0,01	1,41 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,83 ± 0,02
Acide 1,5-dicaféoylquinique (515)	Acide phénolique	9,5	0,88 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,01

La quercétine-3-glucuronide est le polyphénol majoritaire à une concentration maximale de $3,04 \pm 0,01$ mg/g MS dans la fraction < 180 µm. Les autres polyphénols caractérisés sont également concentrés dans la même fraction. Les teneurs des polyphénols dans la fraction > 500 µm sont les plus faibles. De ces résultats, il apparaît clairement que les concentrations des polyphénols dans la fraction < 180 µm sont supérieures de 30% à 50% à celles de la fraction NT. Ce qui prouve que le procédé PTC a un effet significatif sur l'enrichissement en polyphénols dans une des fractions granulométriques (< 180 µm) des graines du fenouil.

2.A.2.2. Écorce du saule blanc

Dans l'écorce du saule blanc le composé d'intérêt est la salicyline (Figure 63). L'identification de ce composé et des composés phénoliques dans les extraits a été réalisée par HPLC/UV et leur caractérisation a été effectuée par LC-ESI/MS.

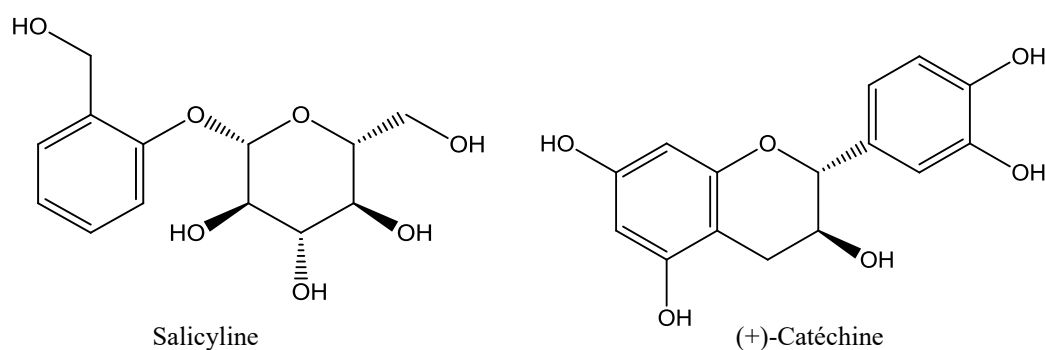


Figure 63 : Les composés bioactifs dans l'écorce du saule blanc

Le chromatogramme UV à 260 nm de la fraction < 180 μm est présenté en Figure 64. Le pic correspondant à la salicyline est indiqué à $t_R = 8$ min. De plus, le chromatogramme montre un pic intense pour un temps rétention de 9,2 min ce qui correspond à la (+)-catéchine (Figure 63).

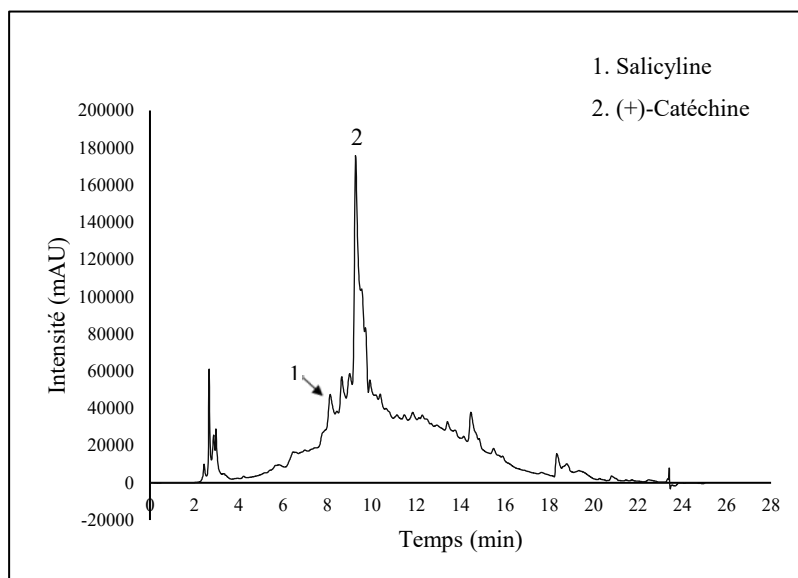


Figure 64 : Le profil du chromatogramme UV à 260 nm de la fraction < 180 μm du saule blanc

La Figure 65 présente le profil de masse de la (+)-catéchine (m/z 289) et le profil obtenu pour m/z 331 qui correspond à la somme de la masse de la salicyline (m/z 285) et de la masse d'un adduit (m/z 46), l'acide formique. Les profils du chromatogramme d'ions extraits (SIM) des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 2, Annexe I.

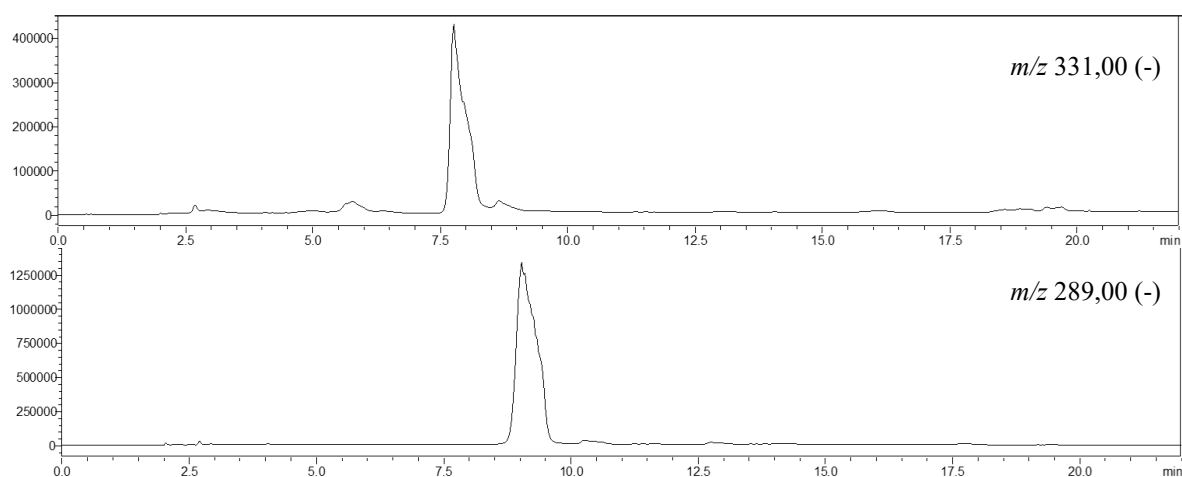


Figure 65 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la salicyline (m/z 285) additionnée de son adduit (46) : m/z 331 et de la catéchine (m/z 289) pour la fraction < 180 μm .

En plus des deux composés mentionnés précédemment, trois autres composés ont été caractérisés par spectroscopie de masse (SIM). Leurs concentrations en fonction de la granulométrie ont été calculées (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du saule blanc.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t _R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 µm	180-315 µm	315-500 µm	> 500 µm	NT
Gallocatéchine (305)	Flavonoïde	6,7	0,85 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Salicyline (285)	Salicylate	8	1,36 ± 0,03	1,25 ± 0,01	1,19 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,11 ± 0,04
Procyanidine B2 (577)	Tannin	8,4	2,24 ± 0,02	2,34 ± 0,01	2,26 ± 0,01	2,01 ± 0,04	2,08 ± 0,01
Procyanidine B1 (577)	Tannin	8,6	4,19 ± 0,04	4,68 ± 0,02	4,29 ± 0,01	3,83 ± 0,03	3,92 ± 0,02
(+)-Catéchine (289)	Flavonoïde	9,2	8,23 ± 0,01	7,88 ± 0,02	6,47 ± 0,02	5,91 ± 0,01	6,78 ± 0,02

La meilleure concentration pour la salicyline a été enregistrée pour la fraction contenant les tailles des particules inférieures à 180 µm : 1,36 ± 0,03 mg/g MS. L'autre composé qui est concentré dans cette fraction est la (+)-catéchine qui est le flavonoïde majoritaire avec une concentration maximale de 8,23 ± 0,01 mg/g MS.

Selon ce tableau, le procédé PTC a un effet significatif sur l'enrichissement de tous les composés caractérisés dans les fractions tamisées < 315 µm de l'écorce du saule blanc.

2.A.2.3. *Parties aériennes du millepertuis*

La Figure 66 montre le chromatogramme UV à 350 nm obtenu pour la fraction < 180 µm des poudres de cette plante.

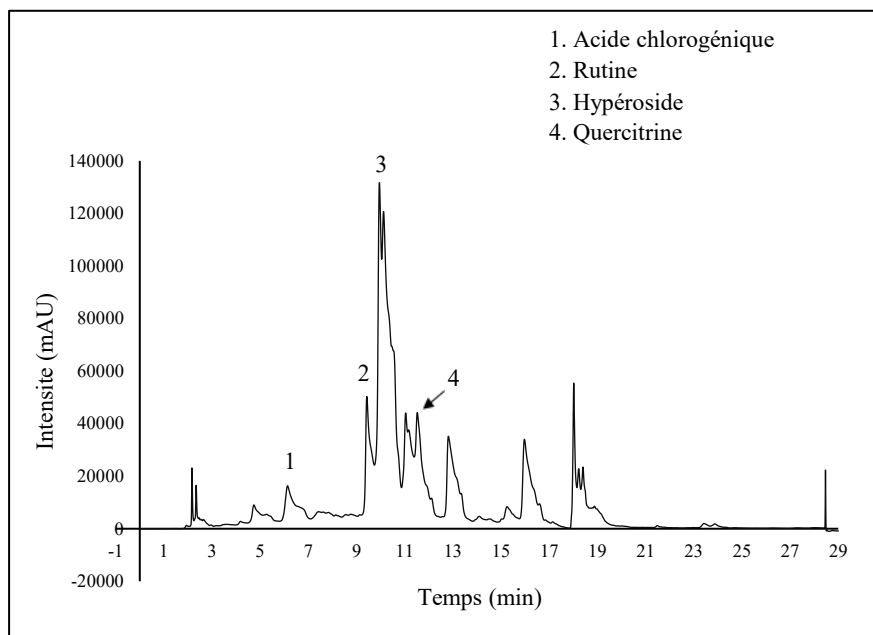


Figure 66 : Le profil du chromatogramme UV à 350 nm de la fraction < 180 µm du millepertuis

Ce chromatogramme indique la présence de l'hypéroside (Figure 4) qui est l'un des flavonoïdes marqueurs dans les parties aériennes du millepertuis avec un pic intense au temps de rétention de 10,2 min. L'autre composé marqueur de cette plante qui a été caractérisé par ESI/MS au temps rétention de 22 min est l'hypéricine (Figure 67). L'hyperforine est d'autre composé caractéristique du millepertuis qui n'apparaît pas sous UV car il ne contient pas de chromophore (Figure 4), donc il a été détecté à l'aide de son rapport m/z et le t_R = 19 min de son étalon externe.

La Figure 67 montre les profils des rapports m/z de l'hypéroside (m/z 463), l'hypéricine (m/z 503) et l'hyperforine (m/z 535). Les profils des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 3, Annexe I.

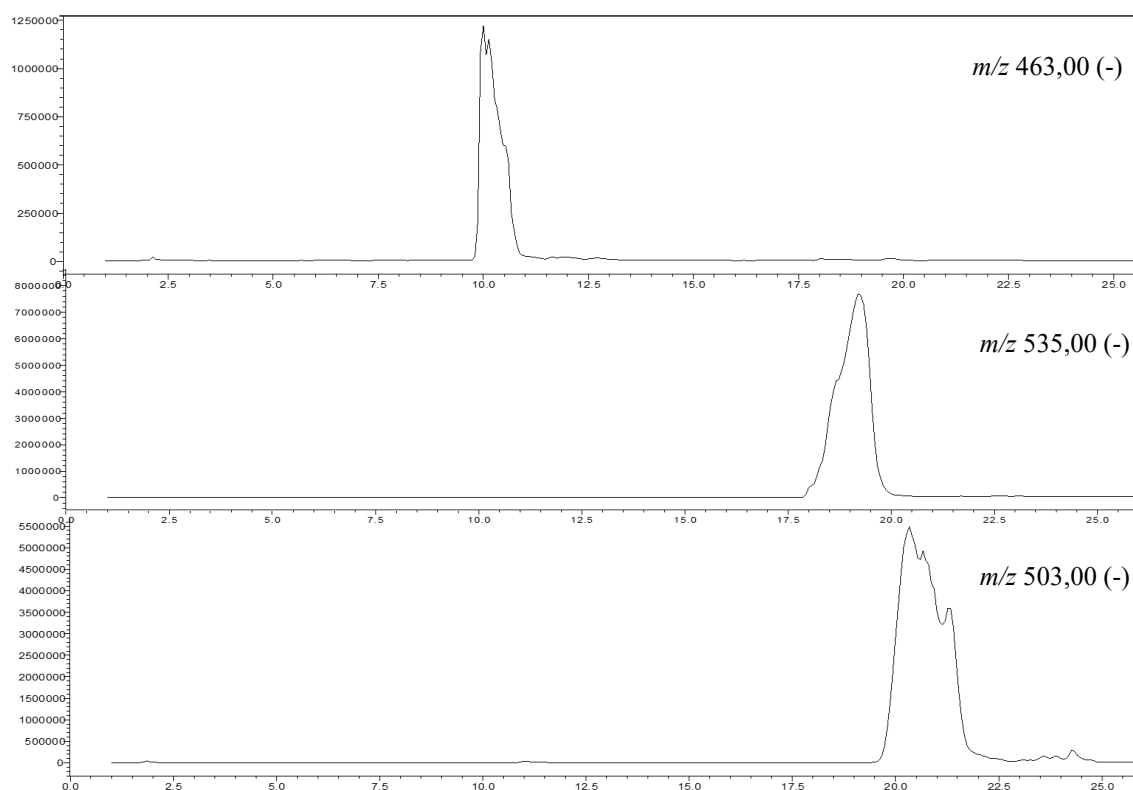


Figure 67 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'hypéroside (m/z 463), l'hypericine (m/z 503) et l'hyperforine (m/z 535) pour la fraction $< 180 \mu\text{m}$.

De plus, trois autres molécules ont également été caractérisées et quantifiées, la rutine (m/z 609), l'acide chlorogénique (m/z 353) et la quercitrine (m/z 447). Leurs concentrations en fonction des classes granulométriques sont rapportées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du millepertuis.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			$< 180 \mu\text{m}$	180-315 μm	315-500 μm	$> 500 \mu\text{m}$	NT
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	6,2	0,78 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01
Rutine (609)	Flavonoïde	9,5	1,91 $\pm$ 0,01	1,59 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,01
Hypéroside (463)	Flavonoïde	10,2	6,61 $\pm$ 0,02	5,45 $\pm$ 0,02	3,89 $\pm$ 0,03	2,07 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,01
Quercitrine (447)	Flavonoïde	11,5	0,84 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03
Hyperforine (535)	Dérivé phloroglucinol	19	3,28 $\pm$ 0,05	3,03 $\pm$ 0,02	3,02 $\pm$ 0,01	3,08 $\pm$ 0,01	3,15 $\pm$ 0,04
Hypericine (503)	Naphtodianthron	22	4,53 $\pm$ 0,02	4,17 $\pm$ 0,05	4,02 $\pm$ 0,04	3,74 $\pm$ 0,01	3,92 $\pm$ 0,02

Selon ces résultats, la procédure PTC a la même efficacité sur chaque composé analysé. En effet, pour chacun des composés, on observe la concentration maximale pour la classe granulométrique inférieure à 180 μm . Les teneurs observées montrent que le millepertuis est très riche en hypéroside avec une concentration maximale de $6,61 \pm 0,02$ mg/g MS dans la fraction < 180 μm .

2.A.2.4. *Parties aériennes de l'ortie*

La Figure 68 représente le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction granulométrique avec une taille de particules inférieure à 180 μm pour cette plante.

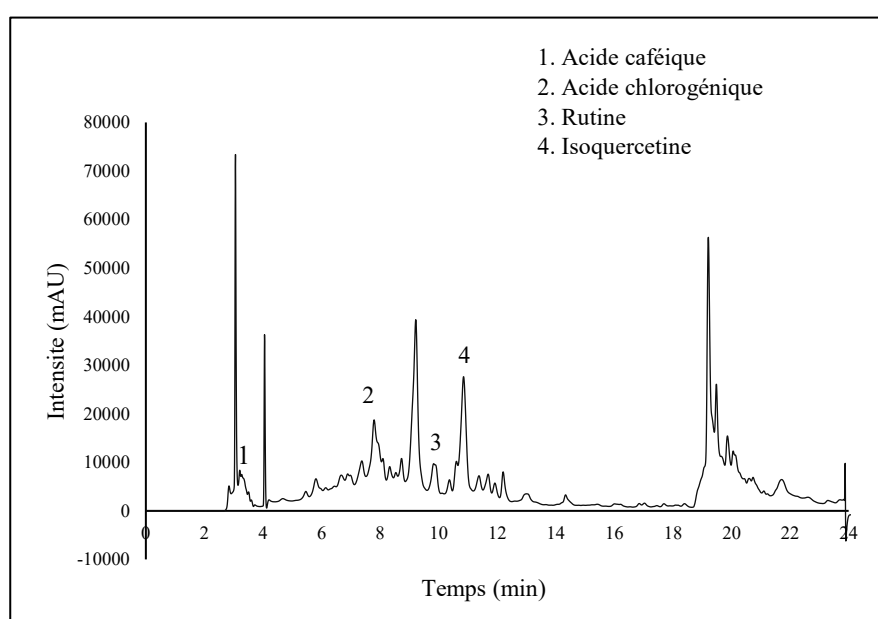


Figure 68 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction < 180 μm de l'ortie

Les quatre composés identifiés sont : l'acide caféique à $t_R = 3$ min, l'acide chlorogénique à $t_R = 7,7$ min, la rutine à $t_R = 10$ min et l'isoquercétine à $t_R = 11$ min.

En utilisant la spectrométrie ESI/MS, la présence d'acide férulique (Figure 5) qui est un acide phénolique caractéristique de l'ortie a été prouvé par son rapport m/z 193 et le $t_R = 13$ min de son étalon externe. Les spectres de masse (SIM) de l'acide férulique et de l'acide caféique (Figure 22) m/z 179 sont présentés en Figure 69. Les profils des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 4, Annexe I.

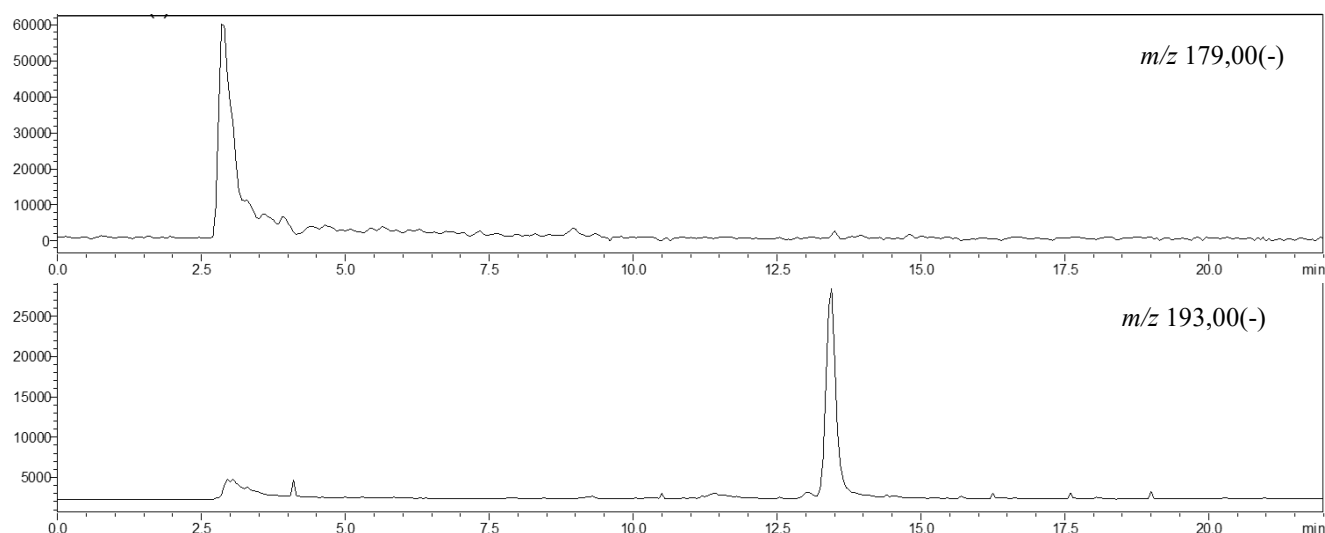


Figure 69 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide caféique (m/z 179) et l'acide férulique (m/z 193) pour la fraction $< 180 \mu m$.

Les structures de ces deux acides sont similaires avec comme seule différence la présence d'une fonction alcool (plus polaire) pour l'acide caféique et d'une fonction éther (moins polaire) pour l'acide férulique. Donc, l'acide férulique est élué plus tard par rapport à l'acide caféique. Les concentrations de composés caractérisés sont rapportés en Tableau 9.

Tableau 9 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de l'ortie.

Composé bioactif (m/z)	Famille moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			$< 180 \mu m$	180-315 μm	315-500 μm	$> 500 \mu m$	NT
Acide caféique (179)	Acide phénolique	3	0,74 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7,7	0,02 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,02	0,004 $\pm$ 0,001	0,001 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,001
Rutine (609)	Flavonoïde	10	0,002 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,003	0,008 $\pm$ 0,004	0,004 $\pm$ 0,002
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	11	0,008 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,002
Acide férulique (193)	Acide phénolique	13	0,82 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,04

Les deux acides : l'acide caféique et l'acide férulique ont les concentrations les plus fortes par rapport aux autres composés. Ils sont tous les deux concentrés dans la fraction $< 180 \mu m$ avec $0,74 \pm 0,02$ mg/g MS pour l'acide caféique et $0,82 \pm 0,01$ mg/g MS pour l'acide férulique. En comparant leur concentration dans cette fraction avec celle dans la fraction non-tamisée, on observe un enrichissement de 60% pour l'acide caféique et de 27% pour l'acide férulique.

2.A.2.5. *Parties aériennes de la solidage*

Le profil du chromatogramme UV à 300 nm de la fraction 180-315 μm (fraction possédant la meilleure activité antioxydante) des parties aériennes de la solidage est présenté en Figure 70.

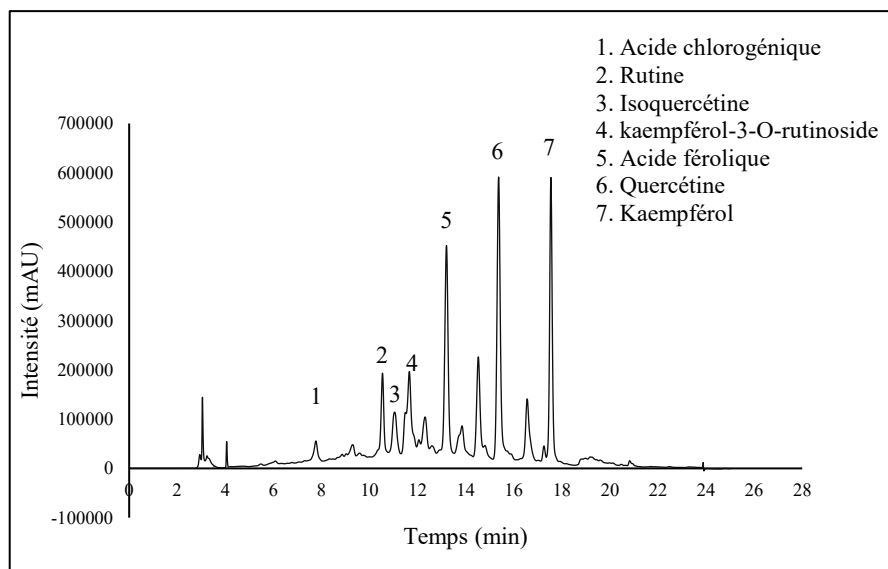


Figure 70 : Le profil du chromatogramme UV à 300 nm de la fraction 180-315 μm

Une bonne séparation de tous les composés est observée. Sept composés phénoliques identifiés sont numérisés dans l'ordre de leur temps rétention. Les composés marqueurs dans les parties aériennes de la solidage sont : le kaempférol-3-O-rutinoside à $t_R = 11,5$ min et le kaempférol à $t_R = 17,5$ min. Le kaempférol est éluée bien plus loin que le kaempférol-3-O-rutinoside qui correspond à sa forme hétéroside (Figure 71).

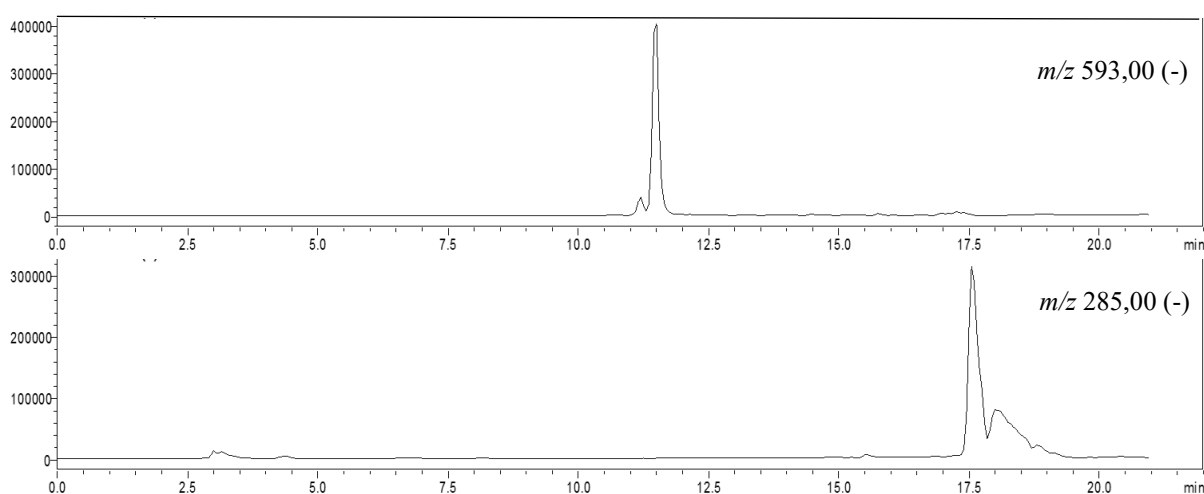


Figure 71 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z du kaempférol-3-O-rutinoside (m/z 593) et du kaempférol (m/z 285) pour la fraction 180-315 μm .

La Figure 71 montre les profils des rapports m/z du kaempférol-3-O-rutinoside (m/z 593) et du kaempférol (m/z 285) correspondant à la fraction 180-315 μm . Les profils des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 5, Annexe I.

Les concentrations des sept composés caractérisés par SIM, en fonction de leur granulométrie ont été calculées et les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la solidage.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t_r (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7,7	$0,02 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$
Rutine (609)	Flavonoïde	10,5	$0,36 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,03$
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	11,2	$0,66 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,04$
Kaempférol-3-O-rutinoside (593)	Flavonoïde	11,5	$0,39 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,01$
Acide férulique (193)	Acide phénolique	13,3	$0,83 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$
Quercétine (301)	Flavonoïde	15,5	$0,21 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$
Kaempférole (285)	Flavonoïde	17,5	$0,38 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,03$

Ce tableau montre que l'acide férulique est le composé majoritaire avec une concentration dans la fraction < 180 μm de $0,83 \pm 0,01$ mg/g MS.

L'un des flavonoïdes d'intérêts de la solidage est le kaempférol qui a une concentration maximale de $0,38 \pm 0,02$ mg/g MS dans la fraction < 180 μm . L'autre flavonoïde caractéristique est le kaempférol-3-O-rutinoside avec une concentration maximale de $0,58 \pm 0,01$ mg/g MS dans la fraction 180-315 μm .

Selon ces résultats, la concentration de l'acide chlorogénique n'a pas été affectée par la procédure PTC. En revanche, il y a une différence significative entre les concentrations d'autres polyphénols dans les fractions de taille des particules inférieure à 315 μm et celles de taille des particules supérieure à 500 μm ainsi que la fraction non-tamisée. Ce qui prouve le succès du procédé PTC (à l'échelle l'industriel) pour l'extraction différentielle des polyphénols dans les parties aériennes de la solidage.

2.A.2.6. *Parties aériennes de la piloselle*

La Figure 72 présent le profil du PDA à 350 nm de la fraction 315-500 μm des parties aériennes de la piloselle.

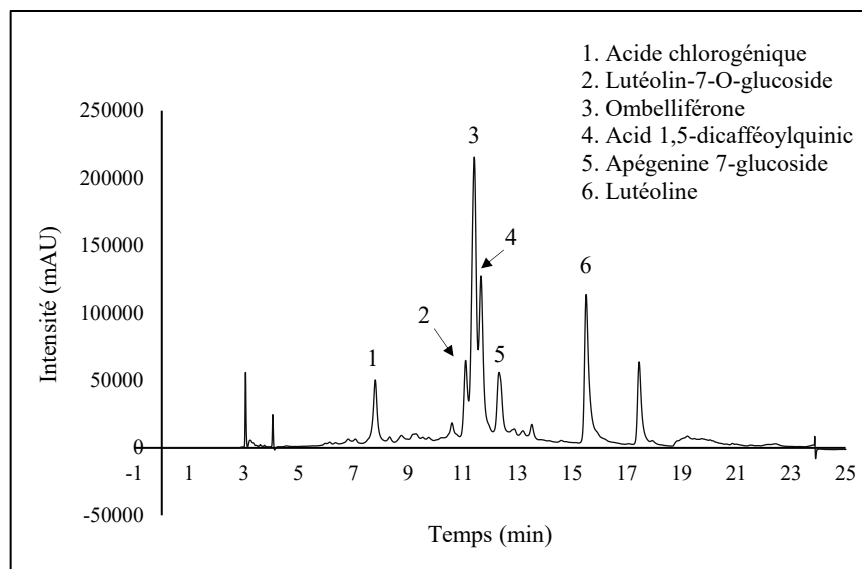


Figure 72 : Le profil du chromatogramme UV à 350 nm de la fraction 315-500 μm

Le chromatogramme montre un signal intense à $t_R = 11,5$ min correspondant à l'ombelliférone (Figure 7) qui est l'un des composés d'intérêts de la piloselle. Les deux flavonoïdes : la lutéoline 7-O-glucoside à $t_R = 11,2$ min et la lutéoline à $t_R = 15,7$ min ont été identifiés. La lutéoline est éluée bien plus loin que la lutéoline 7-O-glucoside (le cynaroside), qui correspond à sa forme hétéroside (Figure 73).

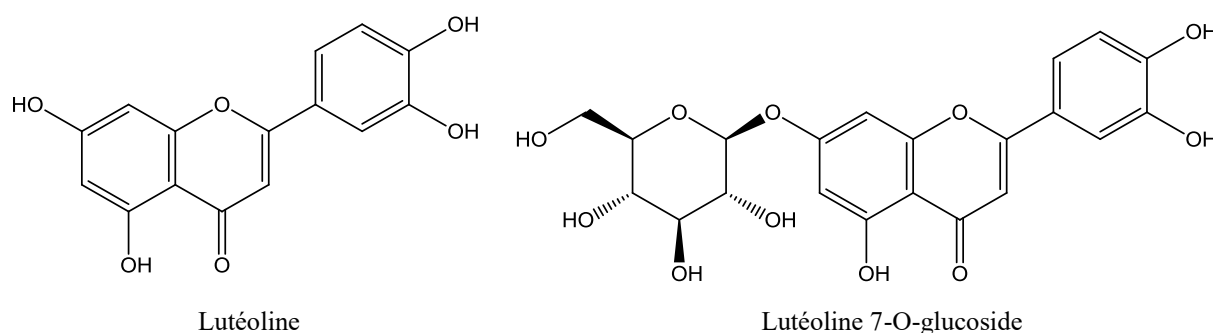


Figure 73 : Les deux flavonoïdes d'intérêts de la piloselle

Les composés identifiés sont caractérisés par ESI/MS. Les profils des chromatogrammes, en mode négatif de l'ombelliférone (m/z 161), la lutéoline (m/z 285) et la

lutéoline 7-O-glucoside (m/z 447) sont présentés en Figure 74. Ce profil correspond à la fraction 315-500 μm .

Les profils des autres composés caractérisés sont enregistrés en Figure 6, Annexe I.

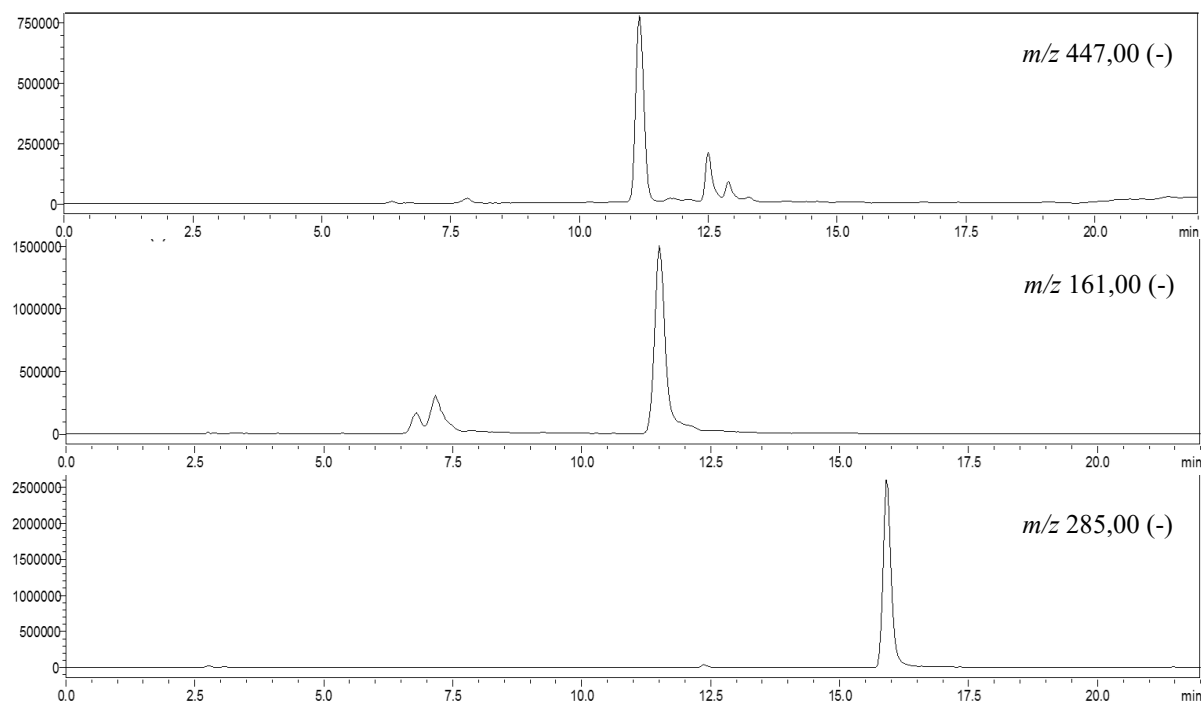


Figure 74 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'ombelliférone (m/z 161), la lutéoline (m/z 285) et la lutéoline 7-O-glucoside (m/z 447) pour la fraction 315-500 μm .

Le Tableau 11 montre les concentrations des six composés caractérisés dans les parties aériennes de la piloselle en fonction de leur granulométrie.

Tableau 11 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la piloselle.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7,8	0,05 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Lutéoline 7-O-glucoside (447)	Flavonoïde	11,2	0,26 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,02
Ombelliférone (161)	Coumarine	11,5	0,16 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02
Acide 1,5-dicaféoylquinique (515)	Acide phénolique	11,7	0,12 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03
Apigénine 7-O-glucoside (431)	Flavonoïde	12,5	0,11 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,03
Lutéoline (285)	Flavonoïde	15,7	1,01 $\pm$ 0,02	2,16 $\pm$ 0,01	2,27 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,01	1,81 $\pm$ 0,01

Parmi tous les composés caractérisés, la lutéoline possède la concentration maximale avec $2,27 \pm 0,01$ mg/g MS dans les poudres avec la taille de particules comprise entre 315 μm et 500 μm .

Les deux autres composés qui sont concentrés dans cette gamme (315-500 μm) sont la lutéoline 7-O-glucoside et l'ombelliférone avec des concentrations respectivement de $0,61 \pm 0,02$ mg/g MS et $0,33 \pm 0,02$ mg/g MS. Le PTC a permis une augmentation de 60% de la teneur en ombelliférone dans cette fraction comparativement avec la fraction non-tamisée.

Selon ce tableau, tous les composés (sauf l'acide chlorogénique) sont concentrés dans les fractions spécifiques de taille de particules supérieure à 180 μm et inférieure à 500 μm ce qui valide l'intérêt de la séparation différentielle des poudres de la piloselle au cours de la procédure PTC.

2.A.2.7. *Fruits du rosier des chiens*

Dans les fruits de rosier des chiens, quatre flavonoïdes sont identifiés par HPLC/UV à l'aide des temps rétentions de leur étalon. La Figure 75 montre le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction 315-500 μm .

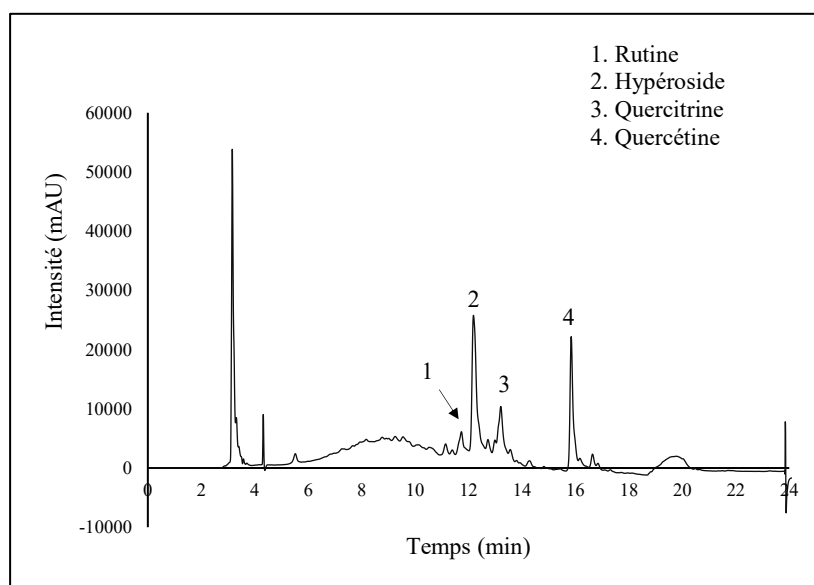


Figure 75 : Le profil du chromatogramme UV à 320 nm de la fraction 315-500 μm

L'un des flavonoïdes d'intérêts dans le cynorhodon est la quercitrine qui est observé pour un temps rétention de 13,2 min. Le pic intense à 16 min est associé à l'autre flavonoïde qui s'appelle la quercétine. Les composés identifiés ont été caractérisés par ESI/MS. Les chromatogrammes d'ions extraits des rapports m/z 447 et m/z 301 indiquent les signaux relatifs à la quercitrine et à la quercétine, respectivement. La Figure 76 présent les profils de masse des deux rapports m/z mentionnés pour la fraction 315-500 μm . Les profils de masse des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 7, Annexe I.

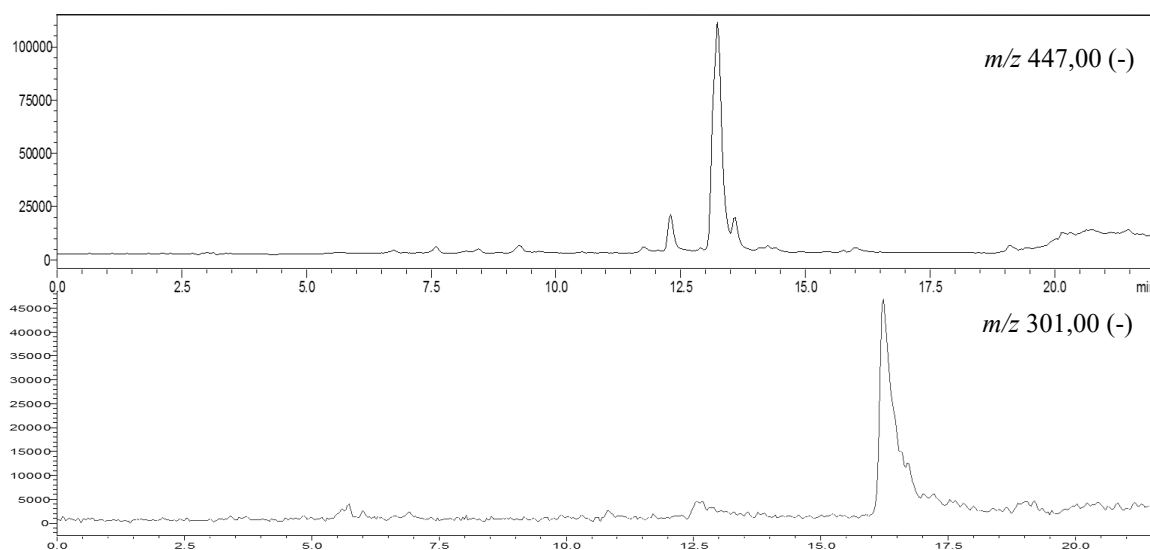


Figure 76 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de la quercitrine (m/z 447) et la quercétine (m/z 301) pour la fraction 315-500 μm .

Le Tableaux 12 compare les concentrations des flavonoïdes caractérisés dans les classes granulométriques mentionnées et dans la fraction non-tamisée.

Tableau 12 : Concentrations des flavonoïdes caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du rosier des chiens.

Composé bioactif (m/z)	Famille moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
(+)-Catéchine (289)	Flavonoïde	9	0,06 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01
Rutine (609)	Flavonoïde	11,7	0,005 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,02	0,003 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,03
Hypéroside (463)	Flavonoïde	12,3	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Quercitrine (447)	Flavonoïde	13,2	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02
Quercétine (301)	Flavonoïde	16,5	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02

Parmi tous ces flavonoïdes, les concentrations de l'hypéroside et la quercitrine sont plus perceptible avec des teneurs maximales dans la fraction 315-500 μm respectivement de $0,11 \pm 0,02 \text{ mg/g MS}$ et $0,09 \pm 0,01 \text{ mg/g MS}$.

Pour le reste des flavonoïdes, leurs concentrations dans les différentes classes granulométriques sont très faibles et ils ne sont pas affectés par la procédure PTC.

2.A.2.8. Racine de la griffe du diable

Le profil du chromatogramme UV à 310 nm en Figure 77 montre la séparation des quatre composés identifiés dans l'extrait de la racine de la griffe du diable. Ce chromatogramme correspond à la fraction $> 500 \mu\text{m}$.

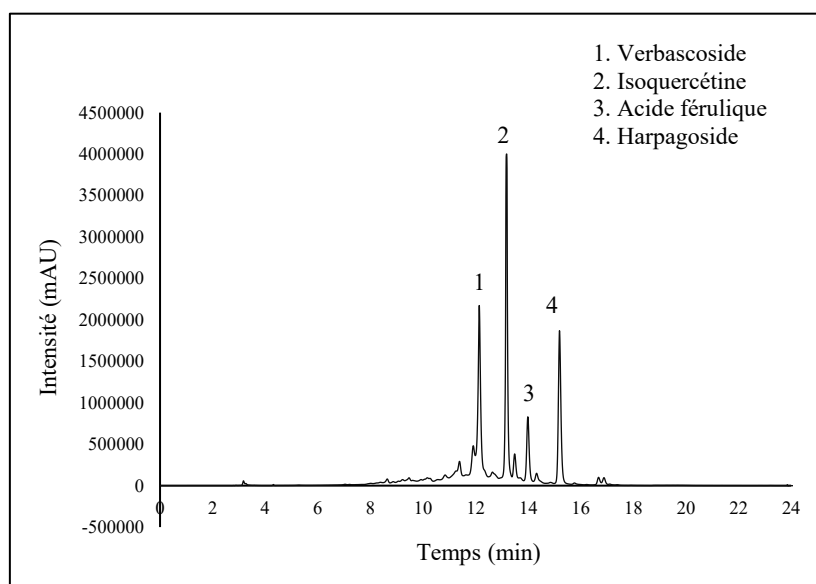


Figure 77 : Le profil du chromatogramme UV à 310 nm de la fraction $> 500 \mu\text{m}$

Selon ce chromatogramme, le pic correspondant à l'isoquercétine possède l'intensité maximale à $t_R = 13,2 \text{ min}$. Les deux composées caractéristiques dans la racine de la griffe du diable sont le verbascoside et l'harpagoside (Figure 9) avec des temps rétentions de 12,3 min et de 15,2 min, respectivement.

Les profils des chromatogrammes (SIM) en mode négatif du verbascoside (m/z 623) et de l'harpagoside (m/z 493) dans la fraction $> 500 \mu\text{m}$ sont présentés en Figure 78. Les profils des chromatogrammes des autres composés sont présentés en Figure 8, Annexe I.

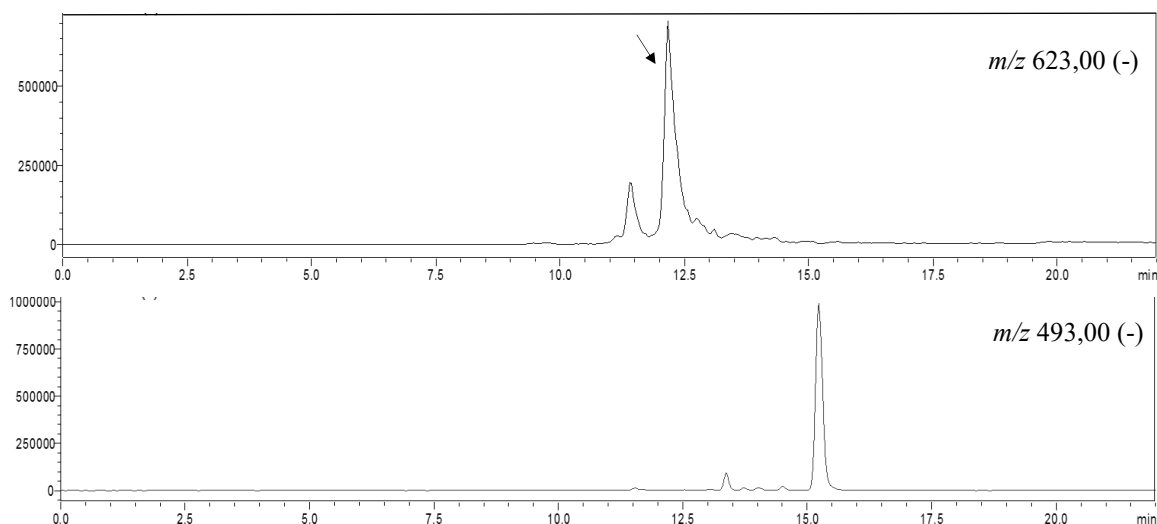


Figure 78 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z du verbascoside (m/z 623) et de l'harpagoside (m/z 493) pour la fraction $> 500 \mu\text{m}$.

A l'aide de la spectrométrie ESI/MS (SIM), la quantification des quatre composés caractérisés en fonction de leur granulométrie a été effectuée et les valeurs sont rapportées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) de la griffe du diable.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			$< 180 \mu\text{m}$	$180\text{-}315 \mu\text{m}$	$315\text{-}500 \mu\text{m}$	$> 500 \mu\text{m}$	NT
Verbascoïde (623)	Glycoside polyphénolique	12,3	$3,11 \pm 0,01$	$2,95 \pm 0,01$	$3,63 \pm 0,01$	$3,75 \pm 0,01$	$2,81 \pm 0,03$
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	13,2	$1,63 \pm 0,02$	$1,28 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,02$	$1,64 \pm 0,04$
Acide férulique (193)	Acide phénolique	14,3	$4,52 \pm 0,02$	$2,71 \pm 0,01$	$3,14 \pm 0,01$	$3,21 \pm 0,02$	$2,82 \pm 0,03$
Harpagoside (493)	Glycoside d'iridoïde	15,2	$3,11 \pm 0,04$	$4,73 \pm 0,02$	$3,91 \pm 0,02$	$3,65 \pm 0,03$	$3,27 \pm 0,03$

La fraction qui permet d'obtenir les plus grandes quantités en harpagoside : $4,73 \pm 0,02$ mg/g MS, possède une granulométrie comprise entre $180 \mu\text{m}$ et $315 \mu\text{m}$ qui montre un enrichissement de 53% par rapport à la fraction non-tamisée.

L'autre composé d'intérêt est le verbascoside qui est concentré dans la fraction $> 500 \mu\text{m}$ de $3,75 \pm 0,01$ mg/g MS avec un enrichissement de 34%. Selon ces résultats, le procédé de fractionnement différentiel, le PTC par Pilote, permet d'augmenter les concentrations des composés phénoliques et de iridoïde glycosidique caractérisés dans les fractions tamisées.

2.A.2.9. *Parties aériennes du lierre*

La Figure 79 montre le profil du chromatogramme UV de la fraction non-tamisée des parties aériennes du lierre à 310 nm.

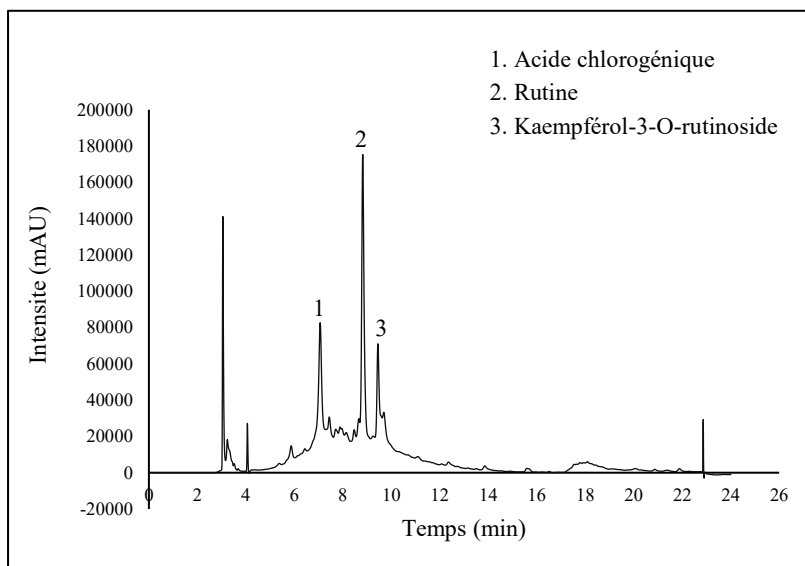


Figure 79 : Le profil du chromatogramme UV à 310 nm de la fraction non-tamisée

Le pic possédant l'intensité la plus élevée est la rutine à $t_R = 8,5$ min. Les deux saponines triterpéniques du lierre : l'hédéracoside C et l' α -hédérine (Figure 35) ne contiennent pas de centre chromophore, donc ils n'apparaissent pas sous UV. Ils sont détectés et caractérisés par la spectrométrie de masse. Les deux rapports de masse obtenus : m/z 1265 et m/z 795 (Figure 80) sont la somme de masse de l'hédéracoside C (m/z 1220) et de l' α -hédérine (m/z 750) avec la masse de l'acide formique qui forme un adduit (46).

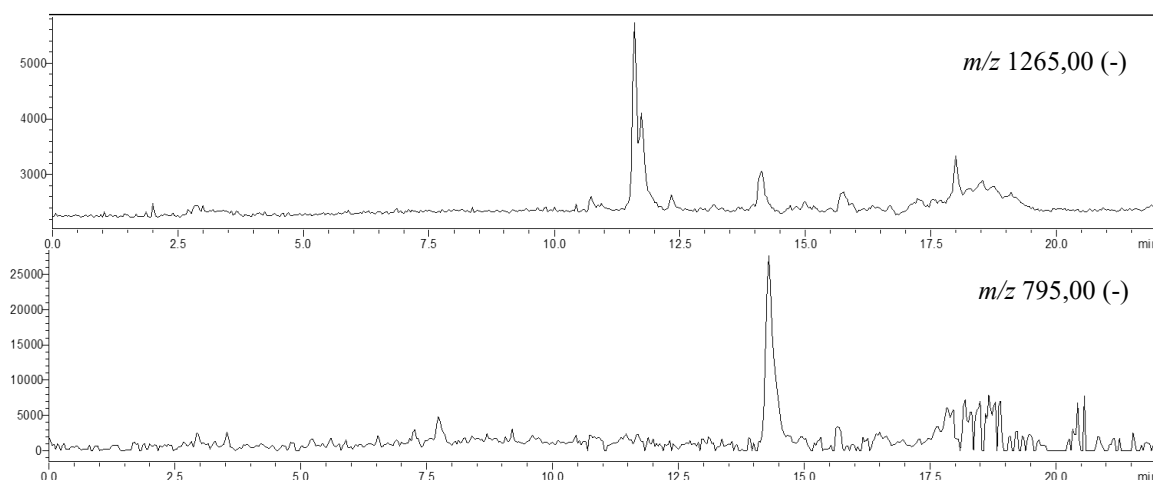


Figure 80 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'hédéracoside C et de l' α -hédérine additionnés de leur adduits (46) : m/z 1265 et m/z 795, respectivement. Les profils correspondent à la fraction non-tamisée.

Les profils des chromatogrammes de masse des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 9, Annexe I.

Le spectre de masse dans le cas des extraits des parties aériennes du lierre sert pour la caractérisation et la quantification des composés. Les concentrations des composés en fonction de leur granulométrie sont rapportées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et dans la fraction non-tamisée (NT) du lierre.

Composé bioactif (m/z)	Famille Moléculaire	t _R (min)	Concentrations (mg/g de matière sèche)				
			< 180 µm	180-315 µm	315-500 µm	> 500 µm	NT
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7,5	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,02
Rutine (609)	Flavonoïde	8,5	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Kaempferol-3-O-rutinoside (593)	Flavonoïde	9,5	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,02
Hédéracoside C (1220)	Saponine	11,5	0,12 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01
α-Hédérine (749)	Saponine	16,8	0,28 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,21 ± 0,01

La fraction dont la granulométrie est comprise entre 180 et 315 µm donne les plus fortes concentrations pour les deux saponines spécifiques du lierre : l'hédéracoside C avec 0,22 ± 0,02 mg/g MS et l'α-hédérine avec 0,33 ± 0,02 mg/g MS. Les teneurs de l'hédéracoside C et de l'α-hédérine augmentent respectivement 3,6 fois et 1,5 fois dans la fraction 180-315 µm en comparaison avec la fraction non-tamisée.

Ces résultats montrent que le fractionnement par voie sèche permet d'obtenir les meilleures extractions des saponines mentionnées dans une fraction avec une taille de particules spécifique (180-315 µm).

B. Echelle du laboratoire

2.B.1. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité antioxydante

Les dosages en polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) ainsi que l'évaluation d'activité antioxydante (AA) des différentes classes granulométriques : < 180 μm , 180-315 μm , 315-500 μm et > 500 μm ainsi que la fraction non-tamisée de chaque fruit ont été effectués. Les valeurs rapportées sont une moyenne et un écart-type de trois mesures ($n = 3$). Pour chaque analyse, les valeurs surmontées de lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$). En comparant les résultats obtenus pour les fractions tamisées avec les ceux de la fraction non-tamisée, l'efficacité du PTC à l'échelle laboratoire sur les propriétés photochimiques des quatre fruits sélectionnés a été étudiée.

2.B.1.1. *La cerise*

Les teneurs en polyphénols totaux (PPT) et en flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée de la cerise sont rassemblées dans l'histogramme de la Figure 81. L'évolution de leur activité antioxydante par les tests du DPPH $^{\cdot}$ et de l'ABTS $^{\cdot+}$ est également étudiée et les résultats sont présentés en Figure 82.

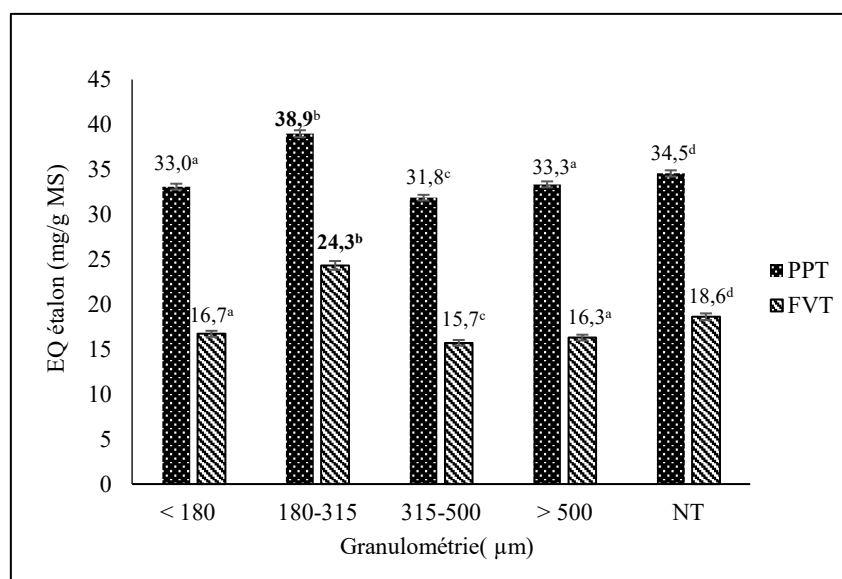


Figure 81 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la cerise

Les résultats montrent que la fraction 180-315 μm présente la valeur maximale du PPT : $38,91 \pm 0,03$ mg EAG/g MS et la valeur maximale du FVT : $24,32 \pm 0,02$ mg EC/g MS. Pour les deux analyses, les valeurs les plus faibles sont observées pour la fraction 315-500 μm .

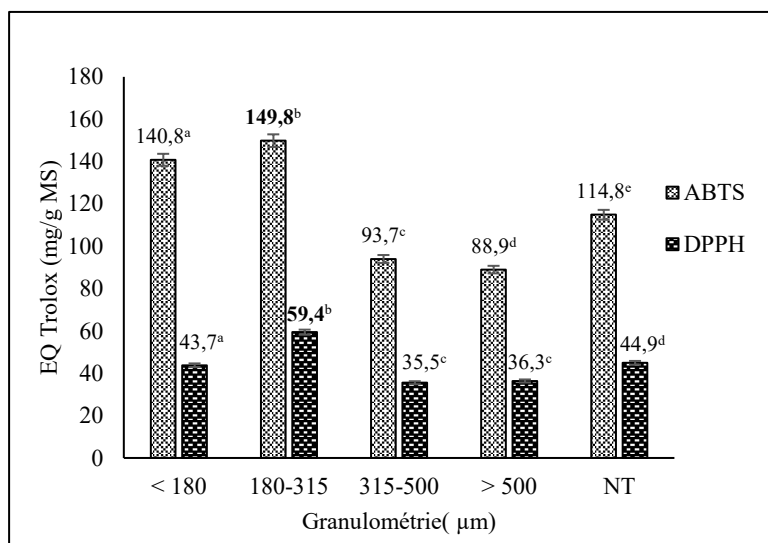


Figure 82 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la cerise, à l'aide des tests DPPH et ABTS.

Les valeurs élevées pour l'activité antioxydante obtenues en utilisant l'ABTS^{•+} par rapport au test du radical du DPPH' indique la richesse de la cerise en anthocyanidines. Les valeurs maximales pour les deux analyses correspondent à la fraction 180-315 μm : $59,44 \pm 0,01$ mg ET/g MS avec le DPPH' et $149,85 \pm 0,03$ mg ET/g MS avec l'ABTS^{•+}. Ces valeurs sont 1,3 fois supérieures à celles de la fraction non-tamisée.

En se basant sur les deux histogrammes des Figures 82 et 83, on observe une corrélation positive entre les PPT et l'AA ($R^2 = 0,90$) qui prouve le rôle essentiel des polyphénols sur l'activité antioxydante de la cerise.

2.B.1.2. La pêche

Les résultats de la détermination des PPT et des FVT et de l'évaluation des activités antioxydantes (en utilisant les tests du DPPH' et de l'ABTS^{•+}) des fractions sélectionnées ainsi que la fraction non-tamisée (NT) de ce fruit sont présentés sur les Figures 83 et 84.

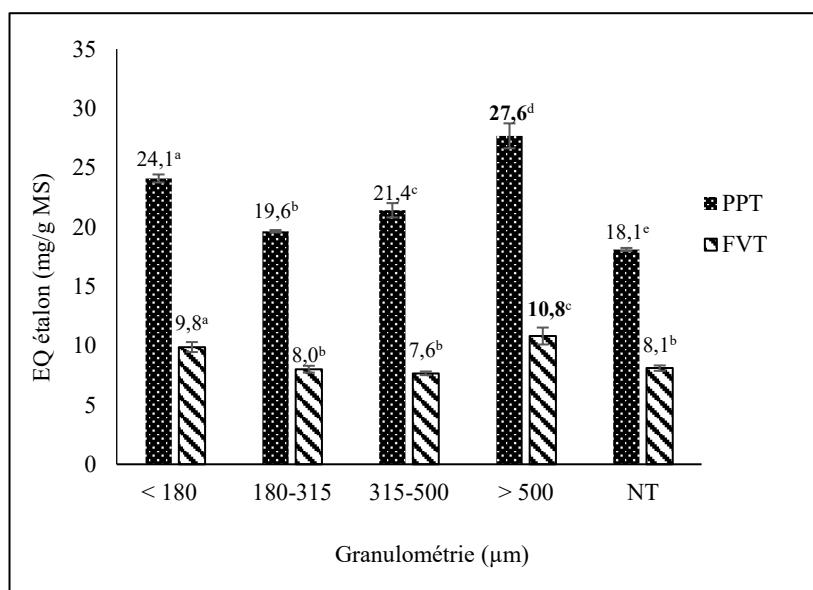


Figure 83 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la pêche.

Ces analyses montrent qu'avec le procédé PTC, la fraction > 500 μm présente les valeurs maximales en PPT et en FVT avec respectivement $27,68 \pm 0,52$ mg EAG/g MS et $10,81 \pm 0,71$ mg EC/g MS.

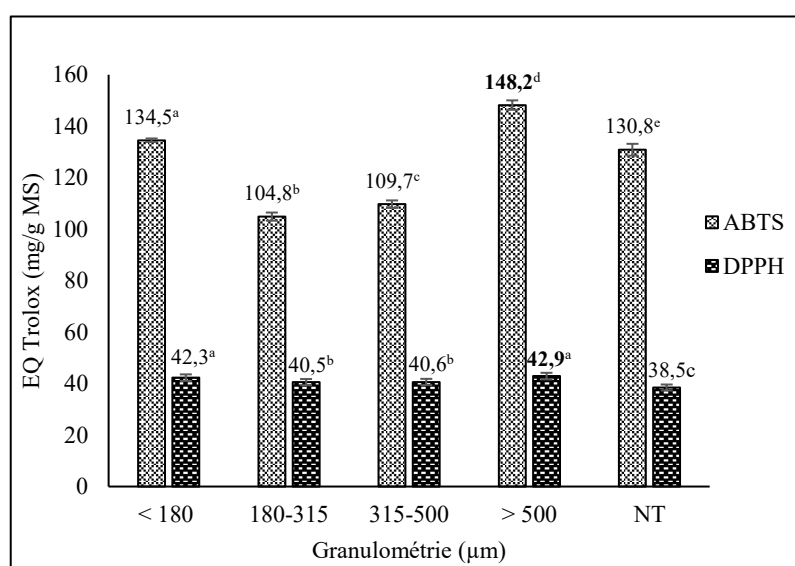


Figure 84 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la pêche, à l'aide des tests DPPH et ABTS.

Selon l'histogramme de la Figure 84, on n'observe pas de variation remarquable entre les activités antioxydantes des différentes fractions granulométriques en utilisant le test du

DPPH[•], ce qui indique la nécessité d'évaluation de l'AA avec le test de l'ABTS^{•+}. Les résultats obtenus par le test de l'ABTS^{•+} montrent que la fraction > 500 µm possède la meilleure AA avec $148,21 \pm 0,31$ mg ET/g MS. En comparant les deux histogrammes, il n'y a pas de corrélation positive entre l'AA et la teneur totale des polyphénols. Bien que la fraction 180-315 µm possède une teneur plus élevée en PPT que celle obtenue dans la fraction non-tamisée, son activité antioxydante est plus faible. Cette observation montre le rôle important d'autres composés (tels que la vitamine C [125]) sur l'activité antioxydantes de ce fruit.

2.B.1.3. *La quetsche*

L'histogramme de la Figure 85 présente les résultats obtenus pour la détermination des PPT et des FVT de fractions tamisées et non-tamisée de la quetsche.

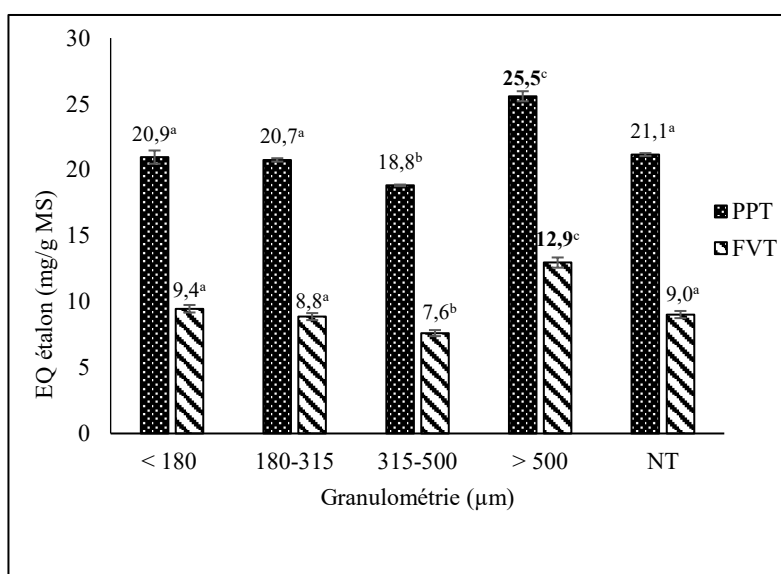


Figure 85 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche.

Les valeurs maximales sont atteintes pour la fraction > 500 µm, la teneur en polyphénols totaux est de $25,58 \pm 0,38$ mg EAG/g MS et en flavonoïdes totaux est de $12,96 \pm 0,28$ mg EC/g MS. Les résultats obtenus pour l'évaluation des activités antioxydantes par les tests de l'ABTS^{•+} et du DPPH[•] sont présentés en Figure 86.

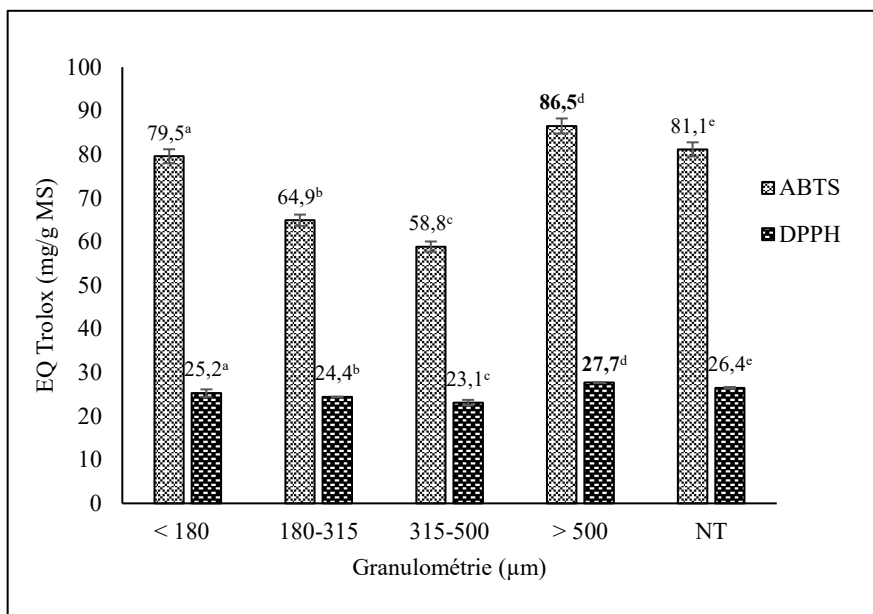


Figure 86 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche, à l'aide des tests DPPH et ABTS.

Les meilleures activités antioxydantes correspondent à la fraction $> 500 \mu\text{m}$: $86,51 \pm 0,03$ mg ET/g MS et $27,72 \pm 0,01$ mg ET/g MS en utilisant respectivement l'ABTS^{•+} et le DPPH[•]. En se basant sur les deux histogrammes des Figures 86 et 87, une corrélation positive entre les valeurs de l'AA et les teneurs de PPT est observée ($R^2 = 0,81$).

2.B.1.4. La mirabelle

Le broyage des mirabelles conduit à l'obtention de poudres qui ressemblaient plus à de petites masses, ceci est dû à leur forte teneur en sucre. Malheureusement, au cours des analyses, nous n'avions pas des poudres séparées de sorte que nous ne pouvions pas déterminer les particules individuellement.

Dans ces conditions, les teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes ont été déterminées et leurs activités antioxydantes ont été évaluées, les résultats sont rassemblés sur les deux histogrammes des Figures 87 et 88.

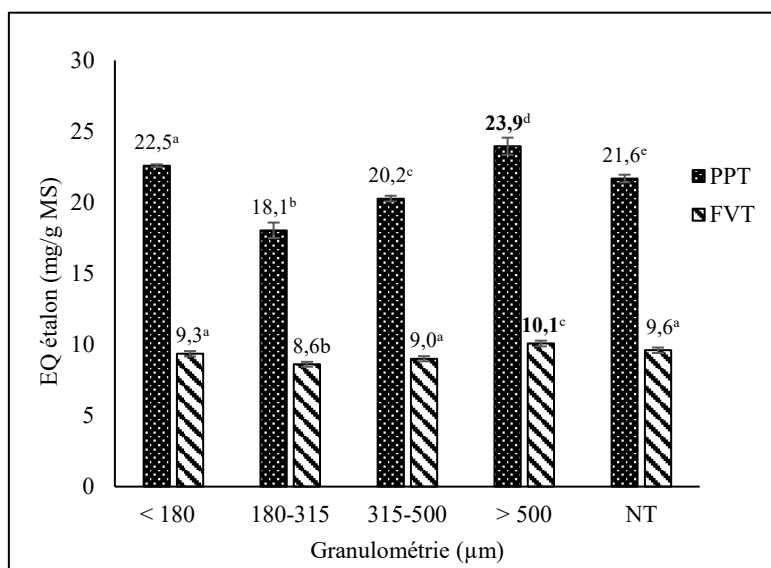


Figure 87 : L'histogramme des polyphénols totaux (PPT) et des flavonoïdes totaux (FVT) des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle.

La fraction > 500 μm, possède une différence significative par rapport aux autres fractions et montre des valeurs maximales de PPT et de FVT respectivement de $23,96 \pm 0,04$ mg EAG/g MS et $10,11 \pm 0,01$ mg EC/g MS.

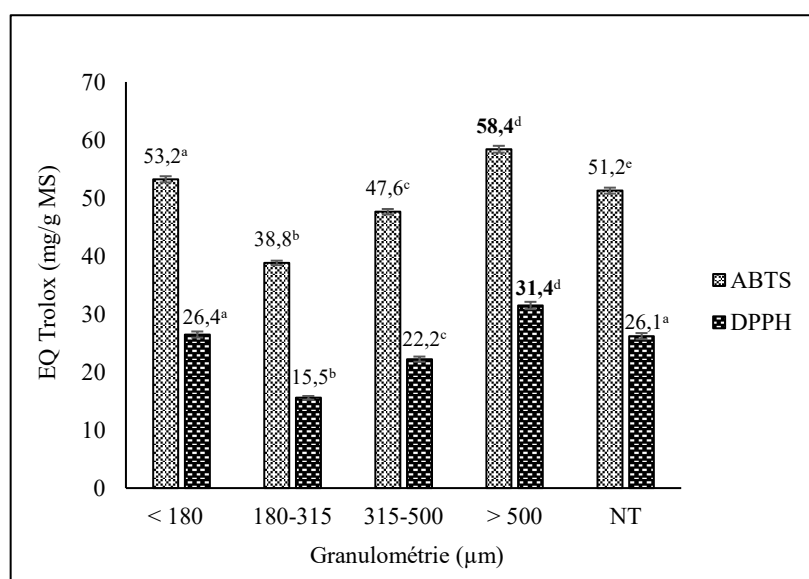


Figure 88 : Évaluation des activités antioxydantes des fractions granulométriques et de la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle, à l'aide des tests DPPH et ABTS.

La fraction > 500 μm qui possède la teneur maximale en polyphénols présente la valeur maximale pour l'activité antioxydante avec $58,43 \pm 0,01$ mg ET/g MS et $31,4 \pm 0,01$ mg ET/g MS avec les deux tests de l'ABTS^{•+} et du DPPH[•] respectivement. D'après ces deux

histogrammes, le rôle principal des polyphénols dans l'activité antioxydante de ce fruit est prouvé en raison de la corrélation positive qui existe entre eux ($R^2 = 0,97$).

2.B.1.5. *Comparaison des résultats*

Cette étude montre que l'application du procédé PTC à l'échelle du laboratoire permet d'augmenter significativement l'activité antioxydante de certaines classes granulométriques des poudres de la cerise, de la pêche, de la quetsche et de la mirabelle.

Le Tableau 15 montre pour chacune des fruits le pourcentage d'augmentation de l'AA pour la fraction granulométrique qui présente la meilleurs l'AA, comparée avec celle obtenue pour la fraction non-tamisée.

Tableau 15 : L'AA de la fraction granulométrique sélectionnée, l'AA de la fraction non-tamisée (NT) et le pourcentage d'augmentation de l'AA de chaque fruit.

Fruit	Granulométrie	L'AA (mg ET/g MS) Fractions granulométriques		L'AA (mg ET/g MS) Fraction Non Tamisée		%Augmentation	
		DDPH	ABTS	DDPH	ABTS	DPPH	ABTS
Cerise	180-315 μm	59,44 $\pm$ 0,01	149,85 $\pm$ 0,03	44,91 $\pm$ 0,02	114,52 $\pm$ 0,03	33	31
Pêche	> 500 μm	42,94 $\pm$ 0,01	148,21 $\pm$ 0,02	38,52 $\pm$ 0,02	130,82 $\pm$ 0,01	12	14
Quetsche	> 500 μm	27,72 $\pm$ 0,01	86,51 $\pm$ 0,03	26,41 $\pm$ 0,01	81,14 $\pm$ 0,01	5	7
Mirabelle	> 500 μm	31,45 $\pm$ 0,01	58,43 $\pm$ 0,01	26,19 $\pm$ 0,03	51,21 $\pm$ 0,02	20	15

- Les analyses sur les différentes classes granulométriques de la cerise indiquent clairement que le procédé PTC améliore l'AA des poudres dans les tailles de particules comprises entre 180 μm et 315 μm avec une augmentation de 31% par le test radical-cation de ABTS^{•+}.
- Les résultats obtenus pour la pêche prouvent que le PTC est une procédure bénéfique pour augmenter l'activité antioxydante des poudres pour des tailles de particules supérieures à 500 μm . Dans cette fraction, on observe une augmentation de 14% pour l'AA en utilisant le test ABTS^{•+}.

- Dans le cas de la quetsche, les analyses montrent que le PTC a un faible effet positif sur l'augmentation de l'activité antioxydante dans les poudres pour des tailles de particules supérieure à 500 μm .
- Comme mentionné précédemment, les poudres de la mirabelle forme des agrégats à cause de la teneur élevée en sucre de la mirabelle. En tenant compte de cette observation, la fraction sélectionnée est la fraction $> 500 \mu\text{m}$ qui montre une augmentation de 15% de l'AA par le test ABTS⁺⁺.

L'originalité de ces résultats sur la cerise, la pêche et la quetsche est validée par une publication intitulée : « *The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of Prunus avium L., Prunus persica L. and Prunus domestica subsp. Insititia L. powders* » [268], dans la revue : Microchemical Journal. Annex II.

2.B.2. Analyses par chromatographies LC-UV-ESI/MS

Les fractions granulométriques et la fraction non-tamisée de chaque fruit ont été analysées par LC-UV-ESI/MS. Les métabolites secondaires de chaque fruit ont été identifiés et caractérisés par leurs rapports m/z et le temps rétention de leur étalon correspondant. Ils ont été également quantifiés à l'aide des courbes d'étalonnage de leur étalon. Les concentrations rapportées sont une moyenne de trois mesures ($n = 3$). La concentration maximale de chaque composé est indiquée en gras.

La présence de l'acide malique dans les quatre fruits sélectionnés est prouvée par les différentes études indiquées dans la partie bibliographie. Ce composé n'est pas détectable par UV (absence d'un groupe chromophore), donc il a été caractérisé par le détecteur ESI/MS. Sous le même gradient utilisé pour les quatre fruits, le pic correspondant à l'acide malique (m/z 133) a été détecté à $t_R = 2,8 \text{ min}$.

2.B.2.1. La cerise

Six composés phénoliques ont été identifiés dans les extraits des poudres de la cerise par HPLC/UV. Le chromatogramme UV de la fraction 180-315 μm qui avait une activité antioxydante maximale à 340 nm est indiqué en Figure 89.

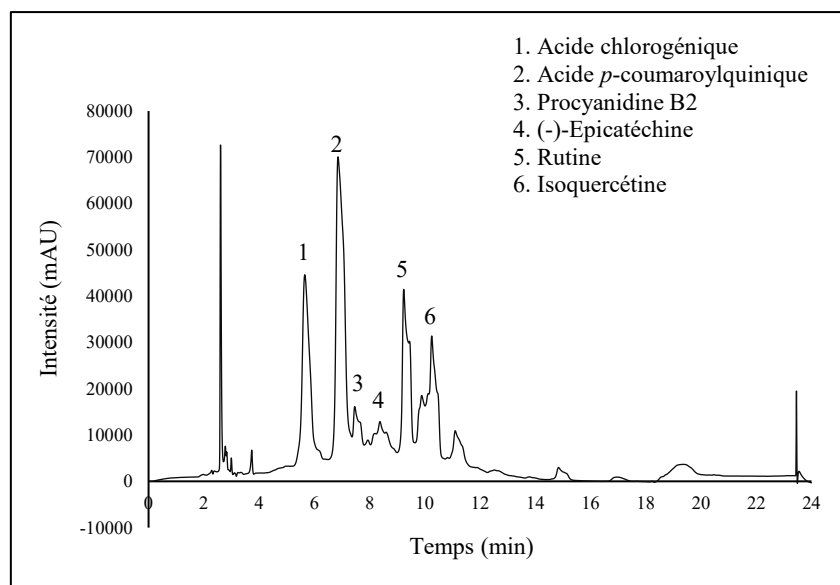


Figure 89 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction 180-315 μ m

L'un des acide phénoliques caractéristiques de la cerise est l'acide *p*-coumaroylquinique (Figure 11) qui a été identifié avec un pic intense à $t_R = 7$ min. La procyanidine B2 qui est le tanin principal dans la cerise a été identifié à $t_R = 7,4$ min. Les profils des chromatogrammes de masse (SIM) des deux composés mentionnés ainsi que l'acide malique qui est seulement détectable par ESI/MS sont présentés en Figure 90.

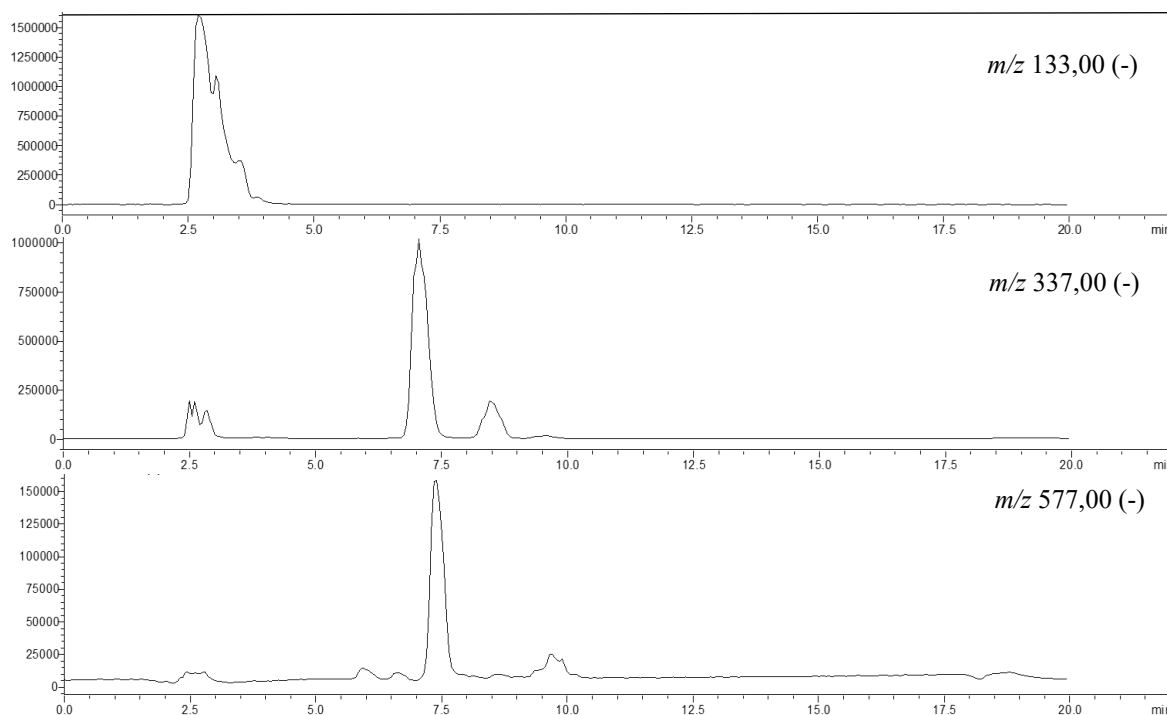


Figure 90 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide malique (m/z 133), l'acide *p*-coumaroylquinique (m/z 337) et la procyanidine B2 (m/z 577) pour la fraction 180-315 μ m.

Les profils des chromatogrammes de masse des autres composés identifiés sont présentés en Figure 10, Annexe I.

Le Tableau 16 regroupe les concentrations des composés caractérisés.

Tableau 16 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la cerise.

Composé bioactif (<i>m/z</i>)	Famille moléculaire	<i>t_R</i> (min)	Concentrations (mg/g matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
Acide malique (133)	Acid dicarboxylic	2,8	4,08 $\pm$ 0,01	4,57 $\pm$ 0,04	4,19 $\pm$ 0,01	4,49 $\pm$ 0,03	4,45 $\pm$ 0,02
Acide chlorogénique isomer (353)	Acide phénolique	5,7	1,61 $\pm$ 0,01	1,92 $\pm$ 0,01	1,73 $\pm$ 0,02	1,73 $\pm$ 0,04	1,81 $\pm$ 0,03
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7	0,83 $\pm$ 0,02	1,21 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03
Acide <i>p</i> -coumaroylquinique (337)	Acide phénolique	7	4,07 $\pm$ 0,00	4,56 $\pm$ 0,03	4,38 $\pm$ 0,01	4,41 $\pm$ 0,01	4,48 $\pm$ 0,01
Procyanidine B2 (577)	Tanin	7,4	0,67 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,03
(-)-Epicatechine (289)	Flavonoïde	8,2	0,72 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02
Rutine (609)	Flavonoïde	9,3	0,49 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	10,2	0,09 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01

Les analyses montrent que la fraction 180-315 μm présente une concentration maximale en acide malique avec 4,57 $\pm$ 0,04 mg/g MS. De plus, un comportement similaire est observé pour les autres composés, ils sont également concentrés dans la fraction 180-315 μm .

Parmi les composés phénoliques quantifiés, la meilleure concentration dans la fraction 180-315 μm appartient à l'acide *p*-coumaroylquinique avec 4,56 $\pm$ 0,03 mg/g MS. Ce résultat indique que le PTC augmente significativement les concentrations de composés bioactifs dans la fraction 180-315 μm des poudres de la cerise.

2.B.2.2. La pêche

La Figure 91 montre le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction > 500 μm de la pêche. Quatre composés phénoliques ont été identifiés à l'aide des temps de rétention de leur étalon externe.

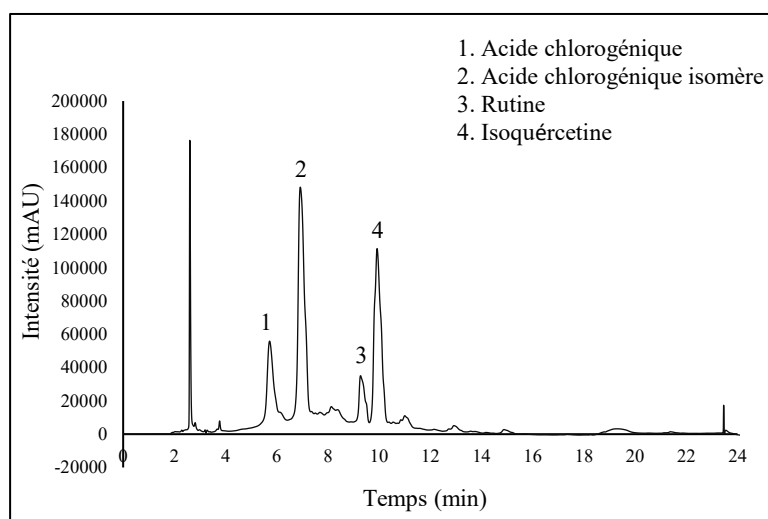


Figure 91 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction > 500 μm

Une séparation claire de tous les pics a été observée. Les deux pics à $t_R = 5,7$ min et à $t_R = 7$ min correspondent à l'acide chlorogénique (m/z 353) et à son isomère.

En utilisant la spectroscopie ESI/MS, les polyphénols identifiés et l'acide malique (m/z 133) ont été caractérisés par leurs rapports m/z . Les profils des rapports du m/z 353 et du m/z 133 sont présentés en Figure 92. Les profils des chromatogrammes de masse des autres composés caractérisés sont présentés en Figure 11, Annexe I.

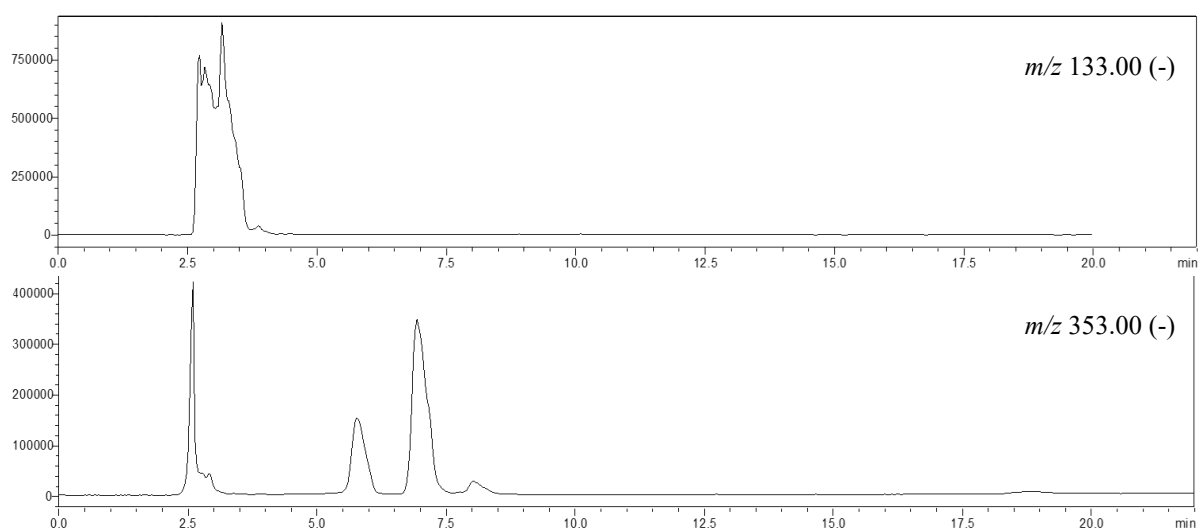


Figure 92 : Les profils des chromatogrammes des rapports m/z de l'acide malique (m/z 133), l'acide chlorogénique et son isomère (m/z 353) pour la fraction > 500 μm.

Le Tableau 17 regroupe les résultats obtenus pour la quantification des composés caractérisés par LC-MS.

Tableau 17 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la pêche.

Composé bioactif (m/z)	Famille moléculaire	t _R (min)	Concentrations (mg/g matière sèche)				
			< 180 µm	180-315 µm	315-500 µm	> 500 µm	NT
Acide malique (133)	Acide dicarboxylique	2,8	3,30 ± 0,03	3,41 ± 0,02	3,12 ± 0,03	3,72 ± 0,02	3,55 ± 0,01
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	5,7	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,02
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	7	1,40 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,12 ± 0,00	1,23 ± 0,04	1,17 ± 0,04
Rutine (609)	Flavonoïde	9,3	0,63 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,53 ± 0,01
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	10,2	3,43 ± 0,01	3,08 ± 0,02	3,05 ± 0,04	2,61 ± 0,02	3,11 ± 0,01

L'acide malique est concentré dans la fraction > 500 µm avec 3,72 ± 0,02 mg/g MS ; en revanche, tous les autres composés sont concentrés dans la fraction < 180 µm.

La molécule remarquable avec la concentration plus élevée est l'isoquercétine avec la concentration maximale de 3,43 ± 0,01 mg/g MS dans la fraction < 180 µm. Le fait que les concentrations en polyphénols les plus élevées aient été obtenues pour des tailles de particules optimales < 180 µm confirme que le PTC est une méthode efficace pour améliorer l'extraction des composés phénoliques de la classe granulométrique spécifique des poudres de la pêche.

2.B.2.3. La quetsche

La meilleure longueur d'onde permettant de distinguer les pics clairs dans l'extrait de la quetsche est 340 nm et seulement trois polyphénols ont été identifiés. Le profil PDA de la fraction > 500 à 340 nm est présenté en Figure 93.

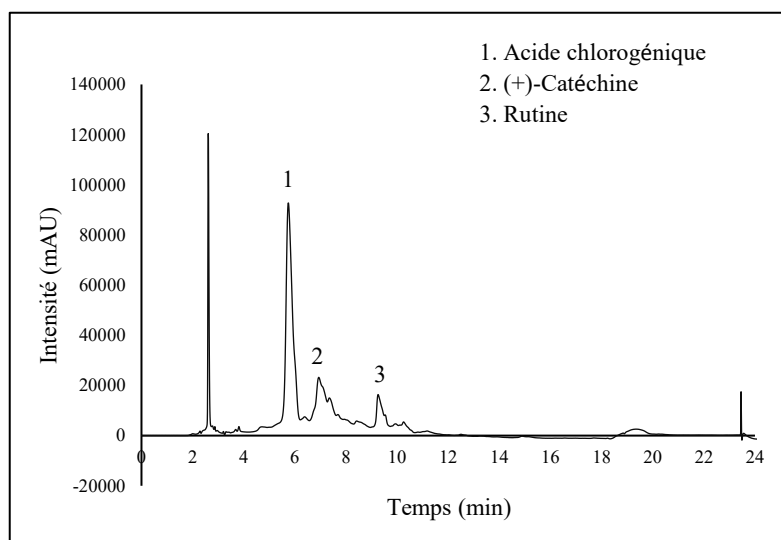


Figure 93 : Le profil du chromatogramme UV à 340 nm de la fraction > 500 μm

Le pic remarquable à $t_R = 5,7$ est l'acide chlorogénique. Les deux flavonoïdes identifiés sont : le (+)-catéchine à $t_R = 7,2$ min et la rutine à $t_R = 9,3$ min. La spectrométrie de masse permet de caractériser les composés mentionnés et également l'acide malique. La Figure 12 en Annexe I, montre le profil des spectres de masse et des rapports m/z .

Tableau 18 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la quetsche.

Composé bioactif (m/z)	Famille moléculaire	t_R (min)	Concentrations (mg/g matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
Acide malique (133)	Acide dicarboxylique	2,8	$3,71 \pm 0,01$	$3,85 \pm 0,01$	$3,71 \pm 0,01$	$3,35 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,02$
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	5,7	$2,67 \pm 0,04$	$2,41 \pm 0,01$	$2,33 \pm 0,01$	$2,42 \pm 0,03$	$2,15 \pm 0,02$
(+)-Catéchine (289)	Flavonoïde	7,2	$0,02 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
Rutine (609)	Flavonoïde	9,3	$0,35 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$
(-) -Epicatechine (289)	Flavonoïde	10	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,03$

L'acide chlorogénique est le principal polyphénol de ce fruit, il est concentré dans la fraction < 180 μm avec $2,67 \pm 0,04$ mg/g MS. Selon ces analyses, le procédé PTC conduit à concentrer l'acide malique dans la fraction 180-315 μm : $3,85 \pm 0,01$ mg/g MS.

2.B.2.4. *La mirabelle*

La Figure 94 représente le profil du chromatogramme UV de la fraction $> 500 \mu\text{m}$ de la mirabelle avec une longueur d'onde de 340 nm.

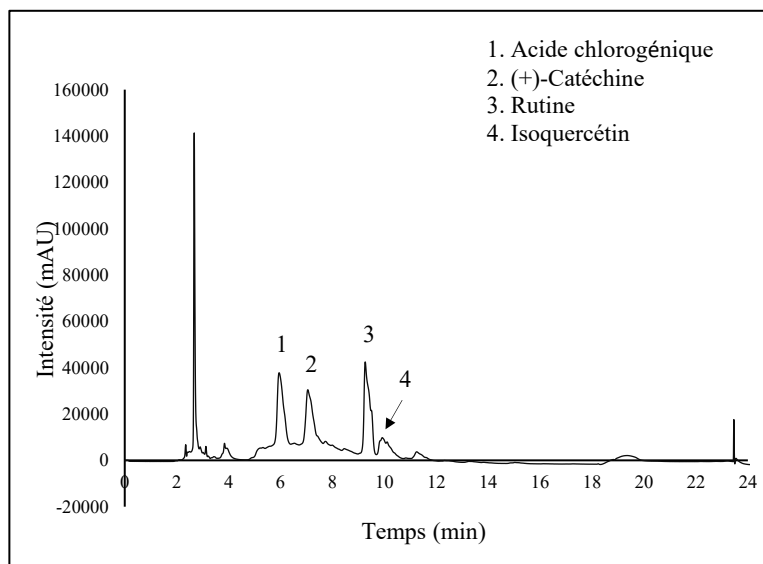


Figure 94 : Chromatogramme UV à 340 nm de la fraction $> 500 \mu\text{m}$ de la mirabelle

Quatre pics correspondants aux quatre composés bioactifs ont été détectés. Les composés élués suivant l'ordre de temps rétention sont : l'acide chlorogénique à $t_R = 5,7$ min et trois flavonoïdes : la (+)-catéchine à $t_R = 7,5$ min, la rutine à $t_R = 9,3$ min et l'isoquercétine à $t_R = 10$ min.

Le spectre de masse obtenu par cette analyse montre la présence de l'acide malique (m/z 133) pour un temps rétention de 2,8 min. Les profils des spectres de masse pour tous les composés identifiés dans l'extrait de mirabelle sont présentés en Figure 13, Annexe I. On peut noter que ces profils sont associés à l'analyse de la fraction $> 500 \mu\text{m}$.

La quantification des composés caractérisés par ESI/MS a été réalisée. Les concentrations obtenues pour chaque classe granulométrique sont indiquées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Concentrations des composés caractérisés dans quatre classes granulométriques et la fraction non-tamisée (NT) de la mirabelle.

Composé bioactif (<i>m/z</i>)	Famille moléculaire	<i>t_R</i> (min)	Concentrations (mg/g matière sèche)				
			< 180 μm	180-315 μm	315-500 μm	> 500 μm	NT
Acide malique (133)	Acide phénolique	2,8	0,72 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,02
Acide chlorogénique (353)	Acide phénolique	5,7	1,26 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,03	1,31 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,04
(+)-Catéchine (289)	Flavonoïde	7,5	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
Rutine (609)	Flavonoïde	9,3	0,74 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01
Isoquercétine (463)	Flavonoïde	10	0,16 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01

Parmi les composés caractérisés, l'acide chlorogénique possède la concentration maximale avec une valeur élevée dans la fraction > 500 μm : 1,31 $\pm$ 0,01 mg/g MS. De plus, l'acide malique est également concentré dans cette fraction avec 0,99 $\pm$ 0,02 mg/g MS ; cette concentration est 72% plus grande que celle de la fraction non-tamisé.

CONCLUSION

Au cours de la première partie de nos travaux, consacrée à deux plantes : le lierre (*Hedera helix* L.) et le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), nous avons réussi à mettre au point une méthodologie par HPLC semi-préparative qui permet d'isoler des métabolites secondaires. Grâce à cette procédure, appliquée aux parties aériennes du lierre, deux saponines triterpénoïdes : l'hédéracoside C et l' α -hédérine ont été isolées. La généralisation de cette méthode appliquée aux extraits de parties aériennes du millepertuis, nous a permis d'isoler avec succès de l'hypéroside, un des flavonoïdes marqueur de cette plante. Les métabolites secondaires ainsi isolés ont par la suite été caractérisés par leur rapports m/z à l'aide de la LC-MS en détection Single Ion Monitoring (SIM) en mode négatif. De plus, la structure de l'hypéroside issu des parties aériennes du millepertuis a été déterminée par RMN ^1H et ^{13}C .

Dans la deuxième partie de nos travaux nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de la procédure d'extraction par voie sèche des métabolites secondaires par PTC (Pulvérisation et tamisage différentiel contrôlés) à l'échelle industrielle et à l'échelle du laboratoire.

A l'échelle industrielle, cette étude qui porte sur 6 plantes de la Région Lorraine, montre clairement que l'extraction de métabolites secondaires par voie sèche ne perd pas en efficacité comparé aux résultats précédemment enregistrés à l'échelle du laboratoire sur les mêmes plantes. En effet, les poudres du fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), du saule blanc (*Salix alba* L.), du millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), de l'ortie (*Urtica dioica* L.), de la piloselle (*Hieracium pilosella* Vaill.) et du rosier des chiens (*Rosa canina* L.) obtenus par le PTC à l'échelle l'industrielle et à l'échelles du laboratoire, ont été classées en quatre fraction granulométrique : $< 180\ \mu\text{m}$, $180\text{-}315\ \mu\text{m}$, $315\text{-}500\ \mu\text{m}$, $> 500\ \mu\text{m}$ ainsi que la fraction non-tamisée. Les résultats obtenus par extraction PTC à l'échelle industrielle (Pilote) sont en accord avec ceux obtenus par l'extraction PTC à l'échelle du laboratoire qui ont déjà été réalisées par Ali Zaiter [2]. Les résultats indiquent que la meilleure AA et la réparation des polyphénols pour une classe granulométrique donnée ne varient pas en fonction de l'échelle de production.

De plus, à l'échelle industrielle, la procédure PTC a amélioré l'extraction des métabolites secondaires en fonction de la granulométrie de deux plantes provenant de la Région Lorraine : le solidage (*Solidago virgaurea* L.) et la griffe du diable (*Harpagophytum* DC.).

Cette étude élargie à d'autres espèces végétales pourrait trouver sa pleine valorisation par son application dans les industries alimentaire, pharmaceutique, nutraceutique et cosmétique.

A l'échelle du laboratoire, notre procédure appliquée pour la première fois sur 4 fruits de la Région Lorraine se montre également aussi efficace pour l'extraction de métabolites secondaires par voie sèche. Les quatre fruits sélectionnés sont : la cerise (*Prunus avium* L.), la pêche (*Prunus persica* L.), la quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) et la mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*). Les poudres de ces fruits, obtenus par le PTC à l'échelle du laboratoire ont été classés en quatre fractions granulométriques : < 180 µm, 180-315 µm, 315-500 µm, > 500 µm ainsi que la fraction non-tamisée. A l'échelle du laboratoire, nos résultats prouvent que le procédé PTC a un effet positif sur l'accroissement de l'activité antioxydante des poudres des fruits dans des classes granulométriques particulières.

PERSPECTIVES

En perspectives il serait intéressant de compléter cette recherche par des études sur les points suivants :

- Une étude de la validité du procédé PTC appliqué à l'échelle industrielle sur l'extraction des métabolites secondaires de poudres des fruits pour son utilité dans l'industrie alimentaire
- Une étude sur la généralisation du procédé PTC appliqué à d'autres plantes qui ne sont pas de la Région Lorraine. Notamment en sélectionnant des plantes déjà connues pour leur intérêt médicinal.
- Une étude comparative des analyses chimiques à des activités biologiques en fonction de la granulométrie des poudres pour certifier l'efficacité biologique des classes granulométriques sélectionnées par voie chimique.

RÉFÉRENCE

- [1] E. BAUDELAIRE, Procédé ptc pour l'extraction par voie sèche des principes actifs naturels, WO2013057379A1, 2013. <https://patents.google.com/patent/WO2013057379A1/fr> (accessed July 2, 2019).
- [2] A. Zaiter, Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines, (n.d.) 200.
- [3] L. Barros, S.A. Heleno, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira, Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculumvulgare* Mill. from Portugal, Food and Chemical Toxicology. 47 (2009) 2458–2464. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.003>.
- [4] Y. Yamini, F. Sefidkon, S.M. Pourmortazavi, Comparison of essential oil composition of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, Flavour and Fragrance Journal. 17 (2002) 345–348. <https://doi.org/10.1002/ffj.1117>.
- [5] M. Faudale, F. Viladomat, J. Bastida, F. Poli, C. Codina, Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wild, Edible, and Medicinal Fennel from Different Mediterranean Countries, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 1912–1920. <https://doi.org/10.1021/jf073083c>.
- [6] A. Rasul, N. Akhtar, B.A. Khan, T. Mahmood, S.U. Zaman, H.M.S. Khan, Formulation development of a cream containing fennel extract: in vivo evaluation for anti-aging effects, (2012). <https://doi.org/info:doi/10.1691/ph.2012.1083>.
- [7] M.A. Rather, B.A. Dar, S.N. Sofi, B.A. Bhat, M.A. Qurishi, *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety, Arabian Journal of Chemistry. 9 (2016) S1574–S1583. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>.
- [8] E. Miraldi, Comparison of the essential oils from ten *Foeniculum vulgare* Miller samples of fruits of different origin, Flavour and Fragrance Journal. 14 (1999) 379–382. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199911/12\)14:6<379::AID-FFJ833>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199911/12)14:6<379::AID-FFJ833>3.0.CO;2-8).
- [9] W.-R. Diao, Q.-P. Hu, H. Zhang, J.-G. Xu, Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), Food Control. 35 (2014) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>.
- [10] S. Allaith, Chemical compound of cumin and fennel seed extracts against some types of pathogenic bacteria, Iraq Medical Journal. 1 (2017) 1–6.
- [11] M. Gulfray, S. Mehmood, N. Minhas, N. Jabeen, R. Kausar, K. Jabeen, G. Arshad, Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*, African Journal of Biotechnology. 7 (2008). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59591> (accessed October 4, 2018).
- [12] F. Anwar, M. Ali, A.I. Hussain, M. Shahid, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan, Flavour and Fragrance Journal. 24 (2009) 170–176. <https://doi.org/10.1002/ffj.1929>.
- [13] G. Singh, S. Maurya, M.P. de Lampasona, C. Catalan, Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract, Food Control. 17 (2006) 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.010>.
- [14] N. El-Soud, N. El-Laithy, G. El-Saeed, M. Wahby, M. Khalil, F. Morsy, N. Shaffie, Antidiabetic Activities of *Foeniculum Vulgare* Mill. Essential Oil in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Macedonian Journal of Medical Sciences. 4 (2011) 139–146. <https://doi.org/10.3889/MJMS.1857-5773.2011.0173>.
- [15] M. Oktay, İ. Gülçin, Ö.İ. Küfrevioğlu, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, LWT - Food Science and Technology. 36 (2003) 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8).

- [16] E.-M. Choi, J.-K. Hwang, Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*, *Fitoterapia*. 75 (2004) 557–565.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.005>.
- [17] Z.A. Salama, F.K. El Baz, A.A. Gaafar, M.F. Zaki, Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 14 (2015) 91–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.10.004>.
- [18] F. Kalleli, I.B. Rebey, W.A. Wannes, F. Boughalleb, M. Hammami, M.S. Tounsi, M. M'hamdi, Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds, *Journal of Food Biochemistry*. 0 (n.d.) e12935. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12935>.
- [19] S. Chrubasik, E. Eisenberg, E. Balan, T. Weinberger, R. Luzzati, C. Conradt, Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study, *The American Journal of Medicine*. 109 (2000) 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00442-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00442-3).
- [20] B. Schmid, R. Lüdtke, H.-K. Selbmann, I. Kötter, B. Tschirdewahn, W. Schaffner, L. Heide, Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial, *Phytotherapy Research*. 15 (2001) 344–350. <https://doi.org/10.1002/ptr.981>.
- [21] E.S. Highfield, K.J. Kemper, White Willow Bark (*Salix alba*), (1999) 12.
- [22] B. Blazics, I. Papp, Á. Kéry, LC–MS Qualitative Analysis and Simultaneous Determination of Six *Filipendula* Salicylates with Two Standards, *Chroma*. 71 (2010) 61–67.
<https://doi.org/10.1365/s10337-010-1502-4>.
- [23] A. Nahrstedt, M. Schmidt, R. Jäggi, J. Metz, M.T. Khayyal, Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect, *Wien Med Wochenschr*. 157 (2007) 348–351. <https://doi.org/10.1007/s10354-007-0437-3>.
- [24] B. Kammerer, R. Kahlich, C. Biegert, C.H. Gleiter, L. Heide, HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations, *Phytochemical Analysis*. 16 (2005) 470–478. <https://doi.org/10.1002/pca.873>.
- [25] V. Butterweck, Mechanism of action of St John's wort in depression : what is known?, *CNS Drugs*. 17 (2003) 539–562. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317080-00001>.
- [26] J. Serkedjieva, N. Manolova, I. Zgórnjak-Nowosielska, B. Zawilińska, J. Grzybek, Antiviral activity of the infusion (SHS-174) from flowers of *Sambucus nigra* L., aerial parts of *Hypericum perforatum* L., and roots of *Saponaria officinalis* L. against influenza and herpes simplex viruses, *Phytotherapy Research*. 4 (1990) 97–100. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650040305>.
- [27] I.P. Süntar, E.K. Akkol, D. Yilmazer, T. Baykal, H. Kirmizibekmez, M. Alper, E. Yeşilada, Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L, *J Ethnopharmacol*. 127 (2010) 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.011>.
- [28] Z. Saddiqe, I. Naeem, A. Maimoona, A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L, *J Ethnopharmacol*. 131 (2010) 511–521.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.034>.
- [29] Y. Zou, Y. Lu, D. Wei, Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. in Vitro, *J. Agric. Food Chem*. 52 (2004) 5032–5039. <https://doi.org/10.1021/jf049571r>.
- [30] B.A. Silva, F. Ferreres, J.O. Malva, A.C.P. Dias, Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts, *Food Chemistry*. 90 (2005) 157–167.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.049>.
- [31] D.Z. Orčić, N.M. Mimica-Dukić, M.M. Francišковиć, S.S. Petrović, E.Đ. Jovin, Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L., *Chemistry Central Journal*. 5 (2011) 34. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-34>.

- [32] T. Fu, L. Wang, X. Jin, H. Sui, Z. Liu, Y. Jin, Hyperoside induces both autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells *in vitro*, *Acta Pharmacologica Sinica*. 37 (2016) 505–518. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.148>.
- [33] Y. Liu, G. Liu, J. Mei, J. Wang, The preventive effects of hyperoside on lung cancer in vitro by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through Caspase-3 and P53 signaling pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83 (2016) 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.035>.
- [34] S.S. Chatterjee, S.K. Bhattacharya, M. Wonnemann, A. Singer, W.E. Müller, Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts, *Life Sci*. 63 (1998) 499–510.
- [35] V. Butterweck, F. Petereit, H. Winterhoff, A. Nahrstedt, Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test, *Planta Med*. 64 (1998) 291–294. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957437>.
- [36] S. Sosa, R. Pace, A. Bornanciny, P. Morazzoni, A. Riva, A. Tubaro, R.D. Loggia, Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59 (2007) 703–709. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.5.0011>.
- [37] S. Wood, J. Huffman, N. Weber, D. Andersen, J. North, B. Murray, R. Sidwell, B. Hughes, Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives, *Planta Medica*. (1990). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301766654> (accessed March 15, 2019).
- [38] L.K. Rutto, Y. Xu, E. Ramirez, M. Brandt, Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.), *International Journal of Food Science*. (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/857120>.
- [39] R. Upton, Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine, *Journal of Herbal Medicine*. 3 (2013) 9–38. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>.
- [40] L. Bacci, S. Baronti, S. Predieri, N. di Virgilio, Fiber yield and quality of fiber nettle (*Urtica dioica* L.) cultivated in Italy, *Industrial Crops and Products*. 29 (2009) 480–484. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.09.005>.
- [41] T.A. Johnson, J. Sohn, W.D. Inman, L.F. Bjeldanes, K. Rayburn, Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders, *Phytomedicine*. 20 (2013) 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.016>.
- [42] A.R. Carvalho, G. Costa, A. Figueirinha, J. Liberal, J.A.V. Prior, M.C. Lopes, M.T. Cruz, M.T. Batista, *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities, *Food Research International*. 99 (2017) 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008>.
- [43] J. Hudec, M. Burdová, L. Kobida, L. Komora, V. Macho, G. Kogan, I. Turianica, R. Kochanová, O. Lozek, M. Habán, P. Chlebo, Antioxidant capacity changes and phenolic profile of *Echinacea purpurea*, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators, *J. Agric. Food Chem*. 55 (2007) 5689–5696. <https://doi.org/10.1021/jf070777c>.
- [44] C. Bourgeois, É.A. Leclerc, C. Corbin, J. Doussot, V. Serrano, J.-R. Vanier, J.-M. Seigneuret, D. Auguin, C. Pichon, É. Lainé, C. Hano, Nettle (*Urtica dioica* L.) as a source of antioxidant and anti-aging phytochemicals for cosmetic applications, *Comptes Rendus Chimie*. 19 (2016) 1090–1100. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.019>.
- [45] J.L. Guil-Guerrero, M.M. Rebolloso-Fuentes, M.E.T. Isasa, Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.), *Journal of Food Composition and Analysis*. 16 (2003) 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00172-2).
- [46] B.M. Adhikari, A. Bajracharya, A.K. Shrestha, Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours, *Food Science & Nutrition*. 4 (2016) 119–124. <https://doi.org/10.1002/fsn3.259>.

- [47] P. Pinelli, F. Ieri, P. Vignolini, L. Bacci, S. Baronti, A. Romani, Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L., *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9127–9132. <https://doi.org/10.1021/jf801552d>.
- [48] S. Otles, B. Yalcin, Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle, *ScientificWorldJournal*. 2012 (2012). <https://doi.org/10.1100/2012/564367>.
- [49] D. Orčić, M. Francišковиć, K. Bekvalac, E. Svirčev, I. Beara, M. Lesjak, N. Mimica-Dukić, Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection, *Food Chemistry*. 143 (2014) 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>.
- [50] J. Leuschner, Anti-inflammatory, spasmolytic and diuretic effects of a commercially available *Solidago gigantea* Herb. extract., *Arzneimittelforschung*. 45 (1995) 165–168.
- [51] B. Thiem, O. Goślińska, Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures, *Fitoterapia*. 73 (2002) 514–516.
- [52] H. Demir, L. Açıık, E.B. Bali, L.Y. Koç, G. Kaynak, Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts, *African Journal of Biotechnology*. 8 (2009).
- [53] B. Kołodziej, R. Kowalski, Antibacterial and antimutagenic activity of extracts aboveground parts of three *Solidago* species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago canadensis* L. and *Solidago gigantea* Ait., *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (2011). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1098>.
- [54] P. Apati, K. Szentmihályi, A. Balázs, D. Baumann, M. Hamburger, T.Sz. Kristó, É. Szőke, Á. Kéry, HPLC Analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from canadian goldenrod (*Solidago canadensis*), *Chromatographia*. 56 (2002) S65–S68. <https://doi.org/10.1007/BF02494115>.
- [55] P. Apáti, K. Szentmihályi, S.T. Kristó, I. Papp, P. Vinkler, E. Szoke, A. Kéry, Herbal remedies of *Solidago*—correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties, *J Pharm Biomed Anal.* 32 (2003) 1045–1053.
- [56] H.S. Rho, A.K. Ghimeray, D.S. Yoo, S.M. Ahn, S.S. Kwon, K.H. Lee, D.H. Cho, J.Y. Cho, Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties, *Molecules*. 16 (2011) 3338–3344. <https://doi.org/10.3390/molecules16043338>.
- [57] Y.S. Jang, Z. Wang, J.-M. Lee, J.-Y. Lee, S.S. Lim, Screening of Korean Natural Products for Anti-Adipogenesis Properties and Isolation of Kaempferol-3-O-rutinoside as a Potent Anti-Adipogenetic Compound from *Solidago virgaurea*, *Molecules*. 21 (2016) 226. <https://doi.org/10.3390/molecules21020226>.
- [58] L. Stanojević, M. Stanković, V. Nikolić, L. Nikolić, D. Ristić, J. Čanadanovic-Brunet, V. Tumbas, Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts, *Sensors*. 9 (2009) 5702–5714. <https://doi.org/10.3390/s90705702>.
- [59] P. Trouillas, C.-A. Calliste, D.-P. Allais, A. Simon, A. Marfak, C. Delage, J.-L. Duroux, Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas, *Food Chemistry*. 80 (2003) 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00282-0).
- [60] M. Gawrońska-Grzywacz, T. Krzaczek, R. Nowak, R. Los, A. Malm, M. Cyranka, W. Rzeski, Biological activity of new flavonoid from *Hieracium pilosella* L., *Cent.Eur.j.Biol.* 6 (2011) 397–404. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0017-9>.
- [61] L. Stanojevic, M. Stankovic, V. Nikolic, L. Nikolic, Anti-oxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts, *Journal of the Serbian Chemical Society*. 73 (2008) 531–540. <https://doi.org/10.2298/JSC0805531S>.
- [62] F.M. Frey, R. Meyers, Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10 (2010) 64. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-64>.

- [63] M. Gawronska-Grzywacz, T. Krzaczek, Flavonoids and coumarins from *Hieracium pilosella* L. [Asteraceae], *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 78 (2009) 189–195.
- [64] S.D. Petrovic, R. Löscher, M.S. Gorunovic, I. Merfort, Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *Hieracium* species, *Biochemical Systematics and Ecology*. 27 (1999) 651–656. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00128-8).
- [65] R. Singh, B. Singh, S. Singh, N. Kumar, S. Kumar, S. Arora, Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del., *Food Chemistry*. 120 (2010) 825–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.022>.
- [66] B. Ramesh, K.V. Pugalendi, Antioxidant role of Umbelliferone in STZ-diabetic rats, *Life Sci*. 79 (2006) 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.005>.
- [67] S.J. Ziegler, B. Meier, O. Sticher, Fast and Selective Assay of L-Ascorbic Acid in Rose Hips by RP-HPLC Coupled with Electrochemical and/or Spectrophotometric Detection, *Planta Med.* (1986) 383–387. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969192>.
- [68] T. Hodisan, C. Socaciu, I. Ropan, G. Neamtu, Carotenoid composition of *Rosa canina* fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 16 (1997) 521–528. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00099-X).
- [69] C. Chrubasik, B.D. Roufogalis, U. Müller-Ladner, S. Chrubasik, A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles, *Phytotherapy Research*. 22 (2008) 725–733. <https://doi.org/10.1002/ptr.2400>.
- [70] O. Warholm, S. Skaar, E. Hedman, H.M. Mølmen, L. Eik, The Effects of a Standardized Herbal Remedy Made from a Subtype of *Rosa canina* in Patients with Osteoarthritis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial, *Curr Ther Res Clin Exp*. 64 (2003) 21–31. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(03)00004-3).
- [71] E. Rein, A. Kharazmi, K. Winther, A herbal remedy, Hyben Vital (stand. powder of a subspecies of *Rosa canina* fruits), reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis--a double-blind, placebo-controlled, randomised trial, *Phytomedicine*. 11 (2004) 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.01.001>.
- [72] D. Deliorman Orhan, A. Hartevioğlu, E. Küpeli, E. Yesilada, In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits, *J Ethnopharmacol*. 112 (2007) 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.029>.
- [73] N. Orhan, M. Aslan, S. Hosbas, O.D. Deliorman, Antidiabetic Effect and Antioxidant Potential of *Rosa canina* Fruits, *Pharmacognosy Magazine*. 5 (2009) 309. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.58151>.
- [74] D.A. Daels-Rakotoarison, B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, M. Luyckx, T. Dine, F. Bailleul, M. Cazin, J.-C. Cazin, Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst, *Phytother Res*. 16 (2002) 157–161.
- [75] E.M. Wenzig, U. Widowitz, O. Kunert, S. Chrubasik, F. Bucar, E. Knauder, R. Bauer, Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations, *Phytomedicine*. 15 (2008) 826–835. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.012>.
- [76] H. Kilicgun, A. Dehen, In vitro Antioxidant Effect of *Rosa canina* in Different Antioxidant Test Systems, *Pharmacognosy Research*. 1 (2009) 417.
- [77] M. Ozcan, Nutrient composition of rose (*Rosa canina* L.) seed and oils, *J Med Food*. 5 (2002) 137–140. <https://doi.org/10.1089/10966200260398161>.
- [78] C. Türkben, V. Uylaşer, B. İncedayı, I. Çelikkol, Effects of different maturity periods and processes on nutritional components of rose hip (*Rosa canina* L.), *Journal of Food, Agriculture & Environment*. (2010). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301820866> (accessed June 14, 2019).

- [79] I. Roman, A. Stănilă, S. Stănilă, Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania, *Chemistry Central Journal*. 7 (2013) 73. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-73>.
- [80] H. Kılıçgün, D. Altiner, Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*, *Pharmacogn Mag*. 6 (2010) 238–241. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66943>.
- [81] A. Bhawe, V. Schulzova, H. Chmelarova, L. Mrnka, J. Hajslova, Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds, *Journal of Food and Drug Analysis*. 25 (2017) 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.019>.
- [82] S. Chrubasik, Ch. Zimpfer, U. Schütt, R. Ziegler, Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain, *Phytomedicine*. 3 (1996) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80003-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80003-1).
- [83] S. Chrubasik, H. Junck, H. Breitschwerdt, C. Conradt, H. Zappe, Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study, *European Journal of Anaesthesiology*. 16 (1999) 118–129. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2346.1999.00435.x>.
- [84] P. Chantre, A. Cappelaere, D. Leblan, D. Guedon, J. Vandermander, B. Fournie, Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis, *Phytomedicine*. 7 (2000) 177–183. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80001-X).
- [85] M.L. Andersen, E.H.R. Santos, M. de L.V. Seabra, A.A.B. da Silva, S. Tufik, Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats, *Journal of Ethnopharmacology*. 91 (2004) 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.01.003>.
- [86] G. McGregor, B. Fiebich, A. Wartenberg, S. Brien, G. Lewith, T. Wegener, Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*): An Anti-Inflammatory Herb with Therapeutic Potential, *Phytochem Rev*. 4 (2005) 47–53. <https://doi.org/10.1007/s11101-004-2374-8>.
- [87] N. Mncwangi, W. Chen, I. Vermaak, A.M. Viljoen, N. Gericke, Devil's Claw—A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*, *Journal of Ethnopharmacology*. 143 (2012) 755–771. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.013>.
- [88] M. Georgiev, K. Alipieva, S. Pashova, P. Denev, M. Angelova, G. Kerns, T. Bley, Antioxidant activity of devil's claw cell biomass and its active constituents, *Food Chemistry*. 121 (2010) 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.028>.
- [89] L.F. Schaffer, L.R. Peroza, A.A. Boligon, M.L. Athayde, S.H. Alves, R. Fachinetto, C. Wagner, *Harpagophytum procumbens* Prevents Oxidative Stress and Loss of Cell Viability In Vitro, *Neurochem Res*. 38 (2013) 2256–2267. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1133-x>.
- [90] M.I. Georgiev, N. Ivanovska, K. Alipieva, P. Dimitrova, R. Verpoorte, Harpagoside: from Kalahari Desert to pharmacy shelf, *Phytochemistry*. 92 (2013) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.009>.
- [91] S. Vertuani, E. Beghelli, E. Scalambra, G. Malisardi, S. Copetti, R. Dal Toso, A. Baldisserotto, S. Manfredini, Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations, *Molecules*. 16 (2011) 7068–7080. <https://doi.org/10.3390/molecules16087068>.
- [92] A. Trute, J. Gross, E. Mutschler, A. Nahrstedt, In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*, *Planta Med*. 63 (1997) 125–129. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957627>.
- [93] H. Süleyman, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen, R. Elias, Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats, *Phytomedicine*. 10 (2003) 370–374. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00260>.

- [94] J. Jones, I.R. White, J.M.L. White, J. Mcfadden, Allergic contact dermatitis to English ivy (*Hedera helix*)—a case series., *Contact Dermatitis*. 60 (2009) 179–180. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01492.x>.
- [95] A. Rai, The Antiinflammatory and Antiarthritic Properties of Ethanol Extract of *Hedera helix*, *Indian J Pharm Sci*. 75 (2013) 99–102. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.113537>.
- [96] Y. Huang, S.C. Lenaghan, L. Xia, J.N. Burris, C.N.J. Stewart, M. Zhang, Characterization of physicochemical properties of ivy nanoparticles for cosmetic application, *Journal of Nanobiotechnology*. 11 (2013) 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-3>.
- [97] R.M. Facino, M. Carini, P. Traldi, B. Pelli, B. Gioia, E. Arlandini, Confirmative assay and quantitative determination of *Hedera Helix* L. saponins (α -hederin, hederacosides B and C) in raw plant extracts and in cosmetic formulations by EI and CAD MIKE spectrometry, *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*. 14 (1987) 187–194. <https://doi.org/10.1002/bms.1200140409>.
- [98] A. Meybeck, F. Bonte, M. Dumas, Cosmetic or dermatological composition containing at least one saponin of the ginsenoside type, and its applications, especially for treating the hair, US5663160A, 1997. <https://patents.google.com/patent/US5663160A/en> (accessed March 15, 2019).
- [99] F. Bonte, M. Dumas, P. Perrier, Saponin or sapogenol compositions for increasing collagen IV synthesis, US6641848B1, 2003. <https://patents.google.com/patent/US6641848B1/en> (accessed March 15, 2019).
- [100] D. Kregiel, J. Berlowska, I. Witonska, H. Antolak, C. Proestos, M. Babic, L.B. and B. Zhang, Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants, Application and Characterization of Surfactants. (2017). <https://doi.org/10.5772/68062>.
- [101] Y. Lutsenko, W. Bylka, I. Matławska, R. Darmohray, *Hedera helix* as a medicinal plant, 56 (2010) 14.
- [102] P. Villani, T. Orsière, I. Sari-Minodier, G. Bouvenot, A. Botta, [In vitro study of the antimutagenic activity of α -hederin], *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 59 (2001) 285–289.
- [103] I. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen, R. Elias, Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F, *Planta Med*. 70 (2004) 561–563.
- [104] S.-S. Bun, R. Elias, B. Baghdikian, J. Ciccolini, E. Ollivier, G. Balansard, α -hederin potentiates 5-FU antitumor activity in human colon adenocarcinoma cells, *Phytotherapy Research*. 22 (2008) 1299–1302. <https://doi.org/10.1002/ptr.2483>.
- [105] G. Ferretti, T. Bacchetti, A. Belleggia, D. Neri, Cherry Antioxidants: From Farm to Table, *Molecules*. 15 (2010) 6993–7005. <https://doi.org/10.3390/molecules15106993>.
- [106] D.-O. Kim, H.J. Heo, Y.J. Kim, H.S. Yang, C.Y. Lee, Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells, *J. Agric. Food Chem*. 53 (2005) 9921–9927. <https://doi.org/10.1021/jf0518599>.
- [107] T. Lachin, H. Reza, Anti Diabetic Effect of Cherries in Alloxan Induced Diabetic Rats, (2012). <https://doi.org/info:doi/10.2174/187221412799015308>.
- [108] M. Sanz, E. Cadahía, E. Esteruelas, Á.M. Muñoz, B. Fernández De Simón, T. Hernández, I. Estrella, Phenolic Compounds in Cherry (*Prunus avium*) Heartwood with a View to Their Use in Cooperage, *J. Agric. Food Chem*. 58 (2010) 4907–4914. <https://doi.org/10.1021/jf100236v>.
- [109] M. Serrano, F. Guillén, D. Martínez-Romero, S. Castillo, D. Valero, Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Sweet Cherry at Different Ripening Stages, *J. Agric. Food Chem*. 53 (2005) 2741–2745. <https://doi.org/10.1021/jf0479160>.
- [110] V. Usenik, J. Fabčič, F. Stampar, Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Food Chemistry - FOOD CHEM*. 107 (2008) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.004>.

- [111] H. Kelebek, S. Selli, Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars, *International Journal of Food Science & Technology*. 46 (2011) 2530–2537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02777.x>.
- [112] C.G. Grigoras, E. Destandau, S. Zubrzycki, C. Elfakir, Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method, *Separation and Purification Technology*. 100 (2012) 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.08.032>.
- [113] S. Pacifico, A. Di Maro, M. Petriccione, S. Galasso, S. Piccolella, A.M.A. Di Giuseppe, M. Scortichini, P. Monaco, Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from Campania Region, *Food Research International*. 64 (2014) 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.020>.
- [114] G. Ballistreri, A. Continella, A. Gentile, M. Amenta, S. Fabroni, P. Rapisarda, Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy, *Food Chemistry*. 140 (2013) 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.024>.
- [115] L.R. Ferguson, S. Zhu, P.J. Harris, Serena Martini, *Molecular Nutrition & Food Research*. 49 (2005) 585–593. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500014>.
- [116] L. Jakobek, M. Šeruga, S. Voća, Z. Šindrak, N. Dobričević, Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks, *Scientia Horticulturae*. 123 (2009) 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.012>.
- [117] J.M. Hodgson, K.D. Croft, Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (2006) 2492–2498. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2675>.
- [118] W. B. Jensen, The Origin of the Names Malic, Maleic, and Malonic Acid, *Journal of Chemical Education - J CHEM EDUC*. 84 (2007). <https://doi.org/10.1021/ed084p924>.
- [119] G.E. Abraham, J.D. Flechas, Management of Fibromyalgia: Rationale for the Use of Magnesium and Malic Acid, *Journal of Nutritional Medicine*. 3 (1992) 49–59. <https://doi.org/10.3109/13590849208997961>.
- [120] T.-Y. Shin, S.-B. Park, J.-S. Yoo, I.K. Kim, H.-S. Lee, T.K. Kwon, M.K. Kim, J.C. Kim, S.-H. Kim, Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: Role of calcium and NF-κB, *Food and Chemical Toxicology*. 48 (2010) 2797–2802. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.009>.
- [121] B.A. Cevallos-Casals, D. Byrne, W.R. Okie, L. Cisneros-Zevallos, Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties, *Food Chemistry*. 96 (2006) 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.032>.
- [122] C.K. Lee, K.K. Park, J.K. Hwang, S.K. Lee, W.Y. Chung, The extract of *Prunus persica* flesh (PPFE) attenuates chemotherapy-induced hepatotoxicity in mice, *Phytotherapy Research*. 22 (2008) 223–227. <https://doi.org/10.1002/ptr.2296>.
- [123] G. Noratto, W. Porter, D. Byrne, L. Cisneros-Zevallos, Identifying Peach and Plum Polyphenols with Chemopreventive Potential against Estrogen-Independent Breast Cancer Cells, *J. Agric. Food Chem*. 57 (2009) 5219–5226. <https://doi.org/10.1021/jf900259m>.
- [124] G. Noratto, W. Porter, D. Byrne, L. Cisneros-Zevallos, Polyphenolics from peach (*Prunus persica* var. Rich Lady) inhibit tumor growth and metastasis of MDA-MB-435 breast cancer cells in vivo, *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 25 (2014) 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.03.001>.
- [125] M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán, B. Hess-Pierce, A.A. Kader, Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California, *J. Agric. Food Chem*. 50 (2002) 4976–4982. <https://doi.org/10.1021/jf020136b>.
- [126] S.B. Rossato, C. Haas, M. do C.B. Raseira, J.C.F. Moreira, J.Â.S. Zuanazzi, Antioxidant Potential of Peels and Fleshes of Peaches from Different Cultivars, *Journal of Medicinal Food*. 12 (2009) 1119–1126. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0267>.

- [127] A. Mokrani, K. Madani, Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, *Separation and Purification Technology*. 162 (2016) 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>.
- [128] C.M. Cantín, M.A. Moreno, Y. Gogorcena, Evaluation of the Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds, and Vitamin C Content of Different Peach and Nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] Breeding Progenies, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4586–4592. <https://doi.org/10.1021/jf900385a>.
- [129] F.A. Tomás-Barberán, M.I. Gil, P. Cremin, A.L. Waterhouse, B. Hess-Pierce, A.A. Kader, HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4748–4760.
- [130] M. Lesjak, I. Beara, N. Simin, D. Pintač, T. Majkić, K. Bekvalac, D. Orčić, N. Mimica-Dukić, Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives, *Journal of Functional Foods*. 40 (2018) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>.
- [131] X. Qiu, A. Kroeker, S. He, R. Kozak, J. Audet, M. Mbikay, M. Chrétien, Prophylactic Efficacy of Quercetin 3-β-O-d-Glucoside against Ebola Virus Infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60 (2016) 5182–5188. <https://doi.org/10.1128/AAC.00307-16>.
- [132] D.H. Byrne, A.N. Nikolic, E.E. Burns, Variability in Sugars, Acids, Firmness, and Color Characteristics of 12 Peach Genotypes, *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116 (1991) 1004–1006. <https://doi.org/10.21273/JASHS.116.6.1004>.
- [133] M.E. Ionica, V. Nour, I. Trandafir, S. Cosmulescu, M. Botu, Physical and Chemical Properties of Some European Plum Cultivars (*Prunus domestica* L.), *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 41 (2013) 499–503. <https://doi.org/10.15835/nbha4129354>.
- [134] D. Walkowiak-Tomczak, CHARACTERISTICS OF PLUMS AS A RAW MATERIAL WITH VALUABLE NUTRITIVE AND DIETARY PROPERTIES – A REVIEW, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58 (n.d.) 401–405.
- [135] D.-O. Kim, S.W. Jeong, C.Y. Lee, Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chemistry*. 81 (2003) 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5).
- [136] O. Rop, T. Jurikova, J. Mlcek, D. Kramarova, Z. Sengce, Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains, *Scientia Horticulturae*. 122 (2009) 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.036>.
- [137] M. Stacewicz-Sapuntzakis, P.E. Bowen, E.A. Hussain, B.I. Damayanti-Wood, N.R. Farnsworth, Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food?, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 41 (2001) 251–286. <https://doi.org/10.1080/20014091091814>.
- [138] N. García-Mariño, F. de la Torre, A.J. Matilla, Organic Acids and Soluble Sugars in Edible and Nonedible Parts of Damson Plum (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia* cv. *Syriaca*) Fruits During Development and Ripening, *Food Sci. Technol. Int.* 14 (2008) 187–193. <https://doi.org/10.1177/1082013208092150>.
- [139] J. Bouayed, H. Rammal, A. Dicko, C. Younos, R. Soulimani, Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects, *Journal of the Neurological Sciences*. 262 (2007) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.028>.
- [140] D. Vauzour, K. Vafeiadou, A. Rodriguez-Mateos, C. Rendeiro, J.P.E. Spencer, The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects, *Genes Nutr.* 3 (2008) 115–126. <https://doi.org/10.1007/s12263-008-0091-4>.
- [141] S. Shahidi, S. Setareye, M. Mahmoodi, Effect of *Prunus domestica* L. (mirabelle) on learning and memory in mice, *Anc Sci Life*. 32 (2013) 139–143. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.122996>.
- [142] Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid, *International*

- Journal of Pharmaceutics. 403 (2011) 136–138.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>.
- [143] S. Sanchez, A.L. Demain, Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites, *Microbial Biotechnology*. 1 (2008) 283–319. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00015.x>.
- [144] F. Li, X. Wu, P. Lam, D. Bird, H. Zheng, L. Samuels, R. Jetter, L. Kunst, Identification of the Wax Ester Synthase/Acyl-Coenzyme A:Diacylglycerol Acyltransferase WSD1 Required for Stem Wax Ester Biosynthesis in Arabidopsis, *Plant Physiology*. 148 (2008) 97–107.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.123471>.
- [145] L.L.M. Van Deenen, G.H. De Haas, Phosphoglycerides and Phospholipases, *Annual Review of Biochemistry*. 35 (1966) 157–194. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.35.070166.001105>.
- [146] A.H. Merrill, CHAPTER 13 - Sphingolipids, in: D.E. Vance, J.E. Vance (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Fifth Edition), Elsevier, San Diego, 2008: pp. 363–397.
<https://doi.org/10.1016/B978-044453219-0.50015-5>.
- [147] M. Law, Plant sterol and stanol margarines and health, *BMJ*. 320 (2000) 861–864.
- [148] N. Sharon, H. Lis, Carbohydrates in Cell Recognition, *Scientific American*. 268 (1993) 82–89.
- [149] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, Natural expansion of the genetic code, *Nature Chemical Biology*. 3 (2007) 29–35. <https://doi.org/10.1038/nchembio847>.
- [150] R.A. Azevedo, P. Arruda, W.L. Turner, P.J. Lea, The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants, *Phytochemistry*. 46 (1997) 395–419.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00319-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00319-1).
- [151] B.L. Turner, J.B. Harborne, Distribution of canavanine in the plant kingdom, *Phytochemistry*. 6 (1967) 863–866. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86033-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86033-1).
- [152] D.S. Seigler, *Plant Secondary Metabolism*, Springer US, 1998.
<https://www.springer.com/gp/book/9780412019814> (accessed June 19, 2019).
- [153] M. Mazid, T.A. Khan, F. Mohammad, Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants., *Biology and Medicine*. 3 (2011) 232–249.
- [154] F. Vinale, K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, M.J. Barbetti, H. Li, S.L. Woo, M. Lorito, A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants, *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72 (2008) 80–86.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.
- [155] H.Z. Levinson, The defensive role of alkaloids in insects and plants, *Experientia*. 32 (1976) 408–411. <https://doi.org/10.1007/BF01920763>.
- [156] R. Schmitz, Friedrich Wilhelm Sertürner and the Discovery of Morphine, *Pharmacy in History*. 27 (1985) 61–74.
- [157] J. Ziegler, P.J. Facchini, Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking, *Annu Rev Plant Biol*. 59 (2008) 735–769. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>.
- [158] * Colin W. Wright, ‡ Sarah J. Marshall, ‡ Peter F. Russell, § M. Marie Anderson, § J. David Phillipson, ⊥ Geoffrey C. Kirby, ⊥ and David C. Warhurst, J. Paul L. Schiff, *In Vitro Antiplasmodial, Antiamoebic, and Cytotoxic Activities of Some Monomeric Isoquinoline Alkaloids*, (2000). <https://doi.org/10.1021/np000144r>.
- [159] T. Gustafson, Pharmacological control of muscular activity in the sea urchin larva. I. Effects of nicotinic and muscarinic agents, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 94 (1989) 1–14. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90136-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90136-9).
- [160] H.S. Chung, W.S. Woo, A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice, *J. Nat. Prod*. 64 (2001) 1579–1580.
- [161] T. Herraiz, J. Galisteo, Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay, *Free Radic. Res*. 38 (2004) 323–331.

- [162] K. Wada, M. Hazawa, K. Takahashi, T. Mori, N. Kawahara, I. Kashiwakura, Inhibitory Effects of Diterpenoid Alkaloids on the Growth of A172 Human Malignant Cells, (2007). <https://doi.org/10.1021/np070270w>.
- [163] S. Qiu, H. Sun, A.-H. Zhang, H.-Y. Xu, G.-L. Yan, Y. Han, X.-J. Wang, Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives, *Chin J Nat Med.* 12 (2014) 401–406. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60063-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60063-7).
- [164] K.-M. Oksman-Caldentey, Tropane and Nicotine Alkaloid Biosynthesis–Novel Approaches Towards Biotechnological Production of Plant-Derived Pharmaceuticals, (2007). <https://doi.org/info:doi/10.2174/138920107781387401>.
- [165] B. Heras, B. Rodríguez, L. Boscá, A. M Villar, Terpenoids: Sources, Structure Elucidation and Therapeutic Potential in Inflammation, *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 3 (2003) 171–85. <https://doi.org/10.2174/1568026033392462>.
- [166] J. Mastelic, O. Politeo, I. Jerkovic, N. Radošević, Composition and Antimicrobial Activity of *Helichrysum italicum* Essential Oil and Its Terpene and Terpenoid Fractions, *Chem Nat Compd.* 41 (2005) 35–40. <https://doi.org/10.1007/s10600-005-0069-z>.
- [167] M. Singh, M. Pal, R.P. Sharma, Biological activity of the labdane diterpenes, *Planta Med.* 65 (1999) 2–8.
- [168] M.C. Mathabe, A.A. Hussein, R.V. Nikolova, A.E. Basson, J.J.M. Meyer, N. Lall, Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*, *Journal of Ethnopharmacology.* 116 (2008) 194–197. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.017>.
- [169] R. Paduch, M. Kandefer-Szerszeń, M. Trytek, J. Fiedurek, Terpenes: substances useful in human healthcare, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 55 (2007) 315. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>.
- [170] A. Rao, Y. Zhang, S. Muend, R. Rao, Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 54 (2010) 5062–5069. <https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10>.
- [171] J.-P. Vincken, L. Heng, A. de Groot, H. Gruppen, Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry.* 68 (2007) 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>.
- [172] S. Van Dyck, P. Gerbaux, P. Flammang, Qualitative and Quantitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean, *Marine Drugs.* 8 (2010) 173–189. <https://doi.org/10.3390/md8010173>.
- [173] J.D. Park, D.K. Rhee, Y.H. Lee, Biological Activities and Chemistry of Saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Phytochem Rev.* 4 (2005) 159–175. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-2835-8>.
- [174] O. Güçlü-Ustündağ, G. Mazza, Saponins: properties, applications and processing, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 47 (2007) 231–258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>.
- [175] H. a. I. Newman, F.A. Kummerow, H.M. Scott, Dietary Saponin, a Factor Which May Reduce Liver and Serum Cholesterol Levels, *Poult Sci.* 37 (1958) 42–46. <https://doi.org/10.3382/ps.0370042>.
- [176] M.R. Malinow, P. McLaughlin, L. Papworth, C. Stafford, G.O. Kohler, A.L. Livingston, P.R. Cheeke, Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats, *Am J Clin Nutr.* 30 (1977) 2061–2067. <https://doi.org/10.1093/ajcn/30.12.2061>.
- [177] J. Jagadeesan, N. Nandakumar, T. Rengarajan, M.P. Balasubramanian, Diosgenin, a Steroidal Saponin, Exhibits Anticancer Activity by Attenuating Lipid Peroxidation Via Enhancing Antioxidant Defense System During NMU-Induced Breast Carcinoma, *JEP(T).* 31 (2012). <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v31.i2.40>.
- [178] J.H. Lorent, J. Quetin-Leclercq, M.-P. Mingeot-Leclercq, The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red

- blood and cancer cells, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 8803–8822.
<https://doi.org/10.1039/C4OB01652A>.
- [179] I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska, Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem Rev.* 9 (2010) 425–474. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9183-z>.
- [180] K. Takagi, E. Park, H. Kato, Anti-inflammatory Activities of Hederagenin and Crude Saponin isolated from *Sapindus mukorossi* GAERTN, *Chem. Pharm. Bull.* 28 (1980) 1183–1188.
<https://doi.org/10.1248/cpb.28.1183>.
- [181] P. Mandal, S.P. Sinha Babu, N.C. Mandal, Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*, *Fitoterapia*. 76 (2005) 462–465. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.004>.
- [182] A. King, G. Young, Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals, *Journal of the American Dietetic Association*. 99 (1999) 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6).
- [183] M. Goleniowski, M. Bonfill, R. Cusido, J. Palazon, Phenolic Acids, in: *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 2013: pp. 1951–1973. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64.
- [184] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutr Rev.* 56 (1998) 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- [185] P. Cos, P. Rajan, I. Vedernikova, M. Calomme, L. Pieters, A.J. Vlietinck, K. Augustyns, A. Haemers, D.V. Berghe, In Vitro Antioxidant Profile of Phenolic Acid Derivatives, *Free Radical Research*. 36 (2002) 711–716. <https://doi.org/10.1080/10715760290029182>.
- [186] M.A. Fernández, M.T. Sáenz, M.D. García, Natural Products: Anti-inflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 50 (1998) 1183–1186. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03332.x>.
- [187] A.F. Sánchez-Maldonado, A. Schieber, M.G. Gänzle, Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*. 111 (2011) 1176–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x>.
- [188] Z. Sroka, W. Cisowski, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*. 41 (2003) 753–758.
[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00329-0).
- [189] D. Chen, K.G. Daniel, D.J. Kuhn, A. Kazi, M. Bhuiyan, L. Li, Z. Wang, S.B. Wan, W.H. Lam, T.H. Chan, Q.P. Dou, Green tea and tea polyphenols in cancer prevention, *Front. Biosci.* 9 (2004) 2618–2631.
- [190] M.J. Loughton, P.J. Evans, M.A. Moroney, J.R. Houlst, B. Halliwell, Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 1673–1681.
- [191] S. Maqsood, S. Benjakul, F. Shahidi, Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53 (2013) 162–179.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.518775>.
- [192] O.V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, M. Kersch, Polyphenols as active ingredients for cosmetic products, *International Journal of Cosmetic Science*. 37 (2015) 455–464.
<https://doi.org/10.1111/ics.12218>.
- [193] J.A. Ross, C.M. Kasum, DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety, *Annual Review of Nutrition*. 22 (2002) 19–34.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>.
- [194] A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci.* 5 (2016).
<https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

- [195] R.J. Nijveldt, E. van Nood, D.E. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A. van Leeuwen, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am J Clin Nutr.* 74 (2001) 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.
- [196] H. de Groot, U. Rauen, Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids, *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 12 (1998) 249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00951.x>.
- [197] W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, [36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, in: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1990: pp. 343–355. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I).
- [198] S. Burda, W. Oleszek, Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2774–2779. <https://doi.org/10.1021/jf001413m>.
- [199] M.G.L. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, M. Pekkarinen, B.S. Simic, H. Toshima, E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study, *Arch Intern Med.* 155 (1995) 381–386. <https://doi.org/10.1001/archinte.1995.00430040053006>.
- [200] E.D. Stefani, P. Boffetta, H. Deneo-Pellegrini, M. Mendilaharsu, J.C. Carzoglio, A. Ronco, L. Olivera, Dietary Antioxidants and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study in Uruguay, *Nutrition and Cancer.* 34 (1999) 100–110. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC340114>.
- [201] M.L. Ferrándiz, M.J. Alcaraz, Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids, *Agents and Actions.* 32 (1991) 283–288. <https://doi.org/10.1007/BF01980887>.
- [202] E. Middleton, C. Kandaswami, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions, *Biochemical Pharmacology.* 43 (1992) 1167–1179. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90489-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90489-6).
- [203] P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen, J. Maatela, Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *BMJ.* 312 (1996) 478–481. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7029.478>.
- [204] H.-K. Wang, Y. Xia, Z.-Y. Yang, S.L. Morris Natschke, K.-H. Lee, Recent Advances in the Discovery and Development of Flavonoids and their Analogues as Antitumor and Anti-HIV Agents, in: J.A. Manthey, B.S. Buslig (Eds.), *Flavonoids in the Living System*, Springer US, Boston, MA, 1998: pp. 191–225. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9_15.
- [205] T. Holton, E. Cornish, Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis., *Plant Cell.* 7 (1995) 1071–1083.
- [206] K.M. Davies, Modifying Anthocyanin Production in Flowers, in: C. Winefield, K. Davies, K. Gould (Eds.), *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*, Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 49–80. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_3.
- [207] C. Zwergel, F. Gaascht, S. Valente, M. Diederich, D. Bagrel, G. Kirsch, Aurones: Interesting Natural and Synthetic Compounds with Emerging Biological Potential, 2012.
- [208] P. Biswas, A. Bhattacharyya, P. C. Bose, N. Mukherjee, N. Adityachaudhury, Further studies on the sensitivity of plant pathogenic microorganisms towards some naturally occurring chalcones and flavanones, *Experientia.* 37 (1981) 397–398. <https://doi.org/10.1007/BF01959884>.
- [209] S.-J. Won, C.-T. Liu, L.-T. Tsao, J.-R. Weng, H.-H. Ko, J.-P. Wang, C.-N. Lin, Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 40 (2005) 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.09.006>.
- [210] S. Mukherjee, V. Kumar, A.K. Prasad, H.G. Raj, M.E. Bracke, C.E. Olsen, S.C. Jain, V.S. Parmar, Synthetic and biological activity evaluation studies on novel 1,3-diarylpropenones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 9 (2001) 337–345. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00249-2).

- [211] A. Modzelewska, C. Pettit, G. Achanta, N.E. Davidson, P. Huang, S.R. Khan, Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14 (2006) 3491–3495. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.003>.
- [212] E. Haslam, T.H. Lilley, Y. Cai, R. Martin, D. Mangnoloto, Traditional Herbal Medicines - The Role of Polyphenols, *Planta Med*. 55 (1989) 1–8. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961764>.
- [213] M.A. Mosiewicki, M.I. Aranguren, A. a. S. Curvelo, J. Borrajo, Effect of natural rubber on wood-reinforced tannin composites, *Journal of Applied Polymer Science*. 105 (2007) 1825–1832. <https://doi.org/10.1002/app.26276>.
- [214] J. Serrano, R. Puupponen-Pimiä, A. Dauer, A.-M. Aura, F. Saura-Calixto, Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects, *Molecular Nutrition & Food Research*. 53 (2009) S310–S329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900039>.
- [215] Y.-X. Li, I. Wijesekara, Y. Li, S.-K. Kim, Phlorotannins as bioactive agents from brown algae, *Process Biochemistry*. 46 (2011) 2219–2224. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>.
- [216] J.F. Morton, Tentative correlations of plant usage and esophageal cancer zones, *Econ Bot*. 24 (1970) 217–226. <https://doi.org/10.1007/BF02860604>.
- [217] K.-T. Chung, T.Y. Wong, C.-I. Wei, Y.-W. Huang, Y. Lin, Tannins and Human Health: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38 (1998) 421–464. <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>.
- [218] A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*. 30 (1991) 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
- [219] S.H. Lim, I. Darah, K. Jain, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF TANNINS EXTRACTED FROM RHIZOPHORA APICULATA BARKS, *Journal of Tropical Forest Science*. 18 (2006) 59–65.
- [220] S. Singh, R.P. Singh, In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview, *Food Reviews International*. 24 (2008) 392–415. <https://doi.org/10.1080/87559120802304269>.
- [221] K. Cui, X. Luo, K. Xu, M.R. Ven Murthy, Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 28 (2004) 771–799. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.023>.
- [222] B. Halliwell, Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans, *Free Radic. Res*. 25 (1996) 57–74.
- [223] A.A. Boligon, Technical Evaluation of Antioxidant Activity, *Med Chem*. 4 (2014). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188>.
- [224] K. Mishra, H. Ojha, N.K. Chaudhury, Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chemistry*. 130 (2012) 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.
- [225] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [226] F. Marc, A. Davin, L. Deglene-Benbrahim, C. Ferrand, M. Baccaunaud, P. Fritsch, Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments, *Med Sci (Paris)*. 20 (2004) 458–463. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004204458>.
- [227] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*. 28 (1995) 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [228] M. Philip, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26 (2004).
- [229] L. Becker, A. Zaiter, J. Petit, D. Zimmer, M.-C. Karam, E. Baudelaire, J. Scher, A. Dicko, Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* powders using successive grinding and sieving, *Industrial Crops and Products*. 87 (2016) 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.036>.

- [230] K.K. Singh, T.K. Goswami, Design of a cryogenic grinding system for spices, *Journal of Food Engineering*. 39 (1999) 359–368. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00172-1).
- [231] C.T. Murthy, N. Krishnamurthy, T. Ramesh, P.N. Srinivasa Rao, Effect of grinding methods on the retention of black pepper volatiles., *Journal of Food Science and Technology*. 33 (1996) 299–301, 9 ref.
- [232] A.T. Kenmegne Kamdem, J. Hardy, Grinding as a method of meat texture evaluation, *Meat Science*. 39 (1995) 225–236. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)P1823-E](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)P1823-E).
- [233] X. Zhao, H. Zhu, G. Zhang, W. Tang, Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders, *Powder Technology*. 286 (2015) 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.09.025>.
- [234] E. BAUDELAIRE, Comminution and controlled differential screening method for the dry extraction of natural active principles, WO2013057379A1, 2013. <https://patents.google.com/patent/WO2013057379A1/en> (accessed April 30, 2019).
- [235] A. Zaiter, L. Becker, M.-C. Karam, A. Dicko, Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders, *J Food Sci Technol*. 53 (2016) 2025–2032. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2201-4>.
- [236] N. Abou El-Soud, Herbal medicine in ancient Egypt, *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (2010) 82–86.
- [237] S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan, K.M. Sundram, L.Y. Latha, Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8 (2011). <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483> (accessed June 28, 2019).
- [238] M. Markom, M. Hasan, W.R.W. Daud, H. Singh, J.M. Jahim, Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods, *Separation and Purification Technology*. 52 (2007) 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.06.003>.
- [239] D. Jadhav, R. B.n., P.R. Gogate, V.K. Rathod, Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction, *Journal of Food Engineering*. 93 (2009) 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007>.
- [240] M.L. Presti, S. Ragusa, A. Trozzi, P. Dugo, F. Visinoni, A. Fazio, G. Dugo, L. Mondello, A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil, *J Sep Sci*. 28 (2005) 273–280. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400037>.
- [241] C.D. Stalikas, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *Journal of Separation Science*. 30 (2007) 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>.
- [242] N. Čujić, K. Šavikin, T. Janković, D. Pljevljakušić, G. Zdunić, S. Ibrić, Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique, *Food Chemistry*. 194 (2016) 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>.
- [243] W.P. Jones, A.D. Kinghorn, Extraction of Plant Secondary Metabolites, in: S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray (Eds.), *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 323–351. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:323>.
- [244] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*. 117 (2013) 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- [245] V. Seidel, Initial and Bulk Extraction, in: S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray (Eds.), *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 27–46. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:27>.
- [246] M.-T. Golmakani, K. Rezaei, Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Food Chemistry*. 109 (2008) 925–930. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.084>.

- [247] S. Barua, R. Gopalakrishnan, Vijay Veer, Extraction, Purification and Characterisation of Insecticidal Compounds from Plants, in: Vijay Veer, R. Gopalakrishnan (Eds.), *Herbal Insecticides, Repellents and Biomedicines: Effectiveness and Commercialization*, Springer India, New Delhi, 2016: pp. 101–115. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2704-5_6.
- [248] M. Gavahian, A. Farahnaky, K. Javidnia, M. Majzoobi, Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 14 (2012) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.01.002>.
- [249] P. Masango, Cleaner production of essential oils by steam distillation, *Journal of Cleaner Production*. 13 (2005) 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>.
- [250] W. B. Jensen, The Origin of the Soxhlet Extractor, *Journal of Chemical Education - J CHEM EDUC*. 84 (2007). <https://doi.org/10.1021/ed084p1913>.
- [251] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.
- [252] A. Nn, A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, in: 2015. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.
- [253] F. Chemat, M.A. Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *Int J Mol Sci*. 13 (2012) 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.
- [254] C.W. Huie, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Anal Bioanal Chem*. 373 (2002) 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>.
- [255] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds, *Journal of Chromatography A*. 1034 (2004) 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.020>.
- [256] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst*. 126 (2001) 1182–1193. <https://doi.org/10.1039/B008243K>.
- [257] F.J. Barba, Z. Zhu, M. Koubaa, A.S. Sant’Ana, V. Orlien, Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review, *Trends in Food Science & Technology*. 49 (2016) 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>.
- [258] X. Pan, G. Niu, H. Liu, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 42 (2003) 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(02)00037-5).
- [259] V. (Midwest R.I. Lopez-Avila, J. Benedicto, K.M. Bauer, Stability of organochlorine and organophosphorus pesticides when extracted from solid matrixes with microwave energy, *Journal of AOAC International (USA)*. (1998). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1999008812> (accessed July 2, 2019).
- [260] A. Liazid, M. Palma, J. Brigui, C.G. Barroso, Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*. 1140 (2007) 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>.
- [261] M. Vinatoru, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 (2001) 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2).
- [262] R. Stef, ANTI OXIDANT ACTIVITY AND ANTHOCYANIN CONTENT IN FLOWER OF MIRABILIS JALAB L. COLLECTED FROM YEMEN, *Banat’s Journal of Biotechnology*. (2013). <https://www.bjbabe.ro/2013/11/29/anti-oxidant-activity-and-anthocyanin-content-in-flower-of-mirabilis-jalab-l-collected-from-yemen/> (accessed July 2, 2019).

- [263] T. Dhanani, S. Shah, N.A. Gajbhiye, S. Kumar, Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S1193–S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>.
- [264] A.-G. Sicaire, M.A. Vian, F. Fine, P. Carré, S. Tostain, F. Chemat, Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*. 31 (2016) 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.011>.
- [265] M. Sališová, Š. Toma, T.J. Mason, Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*, *Ultrasonics Sonochemistry*. 4 (1997) 131–134. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(97\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(97)00032-1).
- [266] L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J.P. Lorimer, T.J. Mason, The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*, *Ultrason Sonochem*. 8 (2001) 299–301.
- [267] S.S. Handa, S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh, Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, *International Centre for Science and High Technology*. (2008) 21–25.
- [268] M. Mousavi, A. Zaiter, A. Modarressi, E. Baudelaire, A. Dicko, The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders, *Microchemical Journal*. 149 (2019) 103962. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103962>.
- [269] C. Bugatti, M.L. Colombo, F. Tomé, A new method for alkaloid extraction from *Chelidonium majus* L., *Phytochemical Analysis*. 2 (1991) 65–67. <https://doi.org/10.1002/pca.2800020204>.
- [270] M.G. Freire, C.M.S.S. Neves, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids, *Green Chem*. 12 (2010) 1715–1718. <https://doi.org/10.1039/C0GC00179A>.
- [271] Y. Lu, W. Ma, R. Hu, X. Dai, Y. Pan, Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn., *Journal of Chromatography A*. 1208 (2008) 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.070>.
- [272] W. Ma, Y. Lu, R. Hu, J. Chen, Z. Zhang, Y. Pan, Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf, *Talanta*. 80 (2010) 1292–1297. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.027>.
- [273] Z. Jiang, C. Kempinski, J. Chappell, Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids, *Curr Protoc Plant Biol*. 1 (2016) 345–358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>.
- [274] R. Wang, R. Wang, B. Yang, Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10 (2009) 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.002>.
- [275] E. Cassel, R.M.F. Vargas, N. Martinez, D. Lorenzo, E. Dellacassa, Steam distillation modeling for essential oil extraction process, *Industrial Crops and Products*. 29 (2009) 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.017>.
- [276] M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *Journal of Chromatography A*. 1043 (2004) 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>.
- [277] M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices, *Flavour and Fragrance Journal*. 19 (2004) 134–138. <https://doi.org/10.1002/ffj.1274>.
- [278] P.R. Petit, Y.D. Sauvaire, D.M. Hillaire-Buys, O.M. Leconte, Y.G. Baissac, G.R. Ponsin, G.R. Ribes, Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol, *Steroids*. 60 (1995) 674–680.
- [279] J. Wu, L. Lin, F. Chau, Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 (2001) 347–352. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00066-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00066-9).
- [280] J.-H. Kwon, J.M.R. Bélanger, J.R.J. Paré, V.A. Yaylayan, Application of the microwave-assisted process (MAP™☆☆MAP is a Trademark of Her Majesty the Queen in Right of Canada as

- represented by the Minister of the Environment.) to the fast extraction of ginseng saponins, *Food Research International*. 36 (2003) 491–498. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00197-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00197-7).
- [281] Y. Chen, M.-Y. Xie, X.-F. Gong, Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *Journal of Food Engineering*. 81 (2007) 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.018>.
- [282] J.E. Cacace, G. Mazza, Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol, *Journal of Food Science*. 68 (2003) 240–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>.
- [283] L. Galvan d’Alessandro, K. Kriaa, I. Nikov, K. Dimitrov, Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry, *Separation and Purification Technology*. 93 (2012) 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>.
- [284] C. Da Porto, E. Porretto, D. Decorti, Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*. 20 (2013) 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>.
- [285] E. Brglez Mojzer, M. Knez Hrnčič, M. Škerget, Ž. Knez, U. Bren, Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>.
- [286] A.E. Hagerman, Extraction of tannin from fresh and preserved leaves, *J Chem Ecol*. 14 (1988) 453–461. <https://doi.org/10.1007/BF01013897>.
- [287] T.C. Wilson, A.E. Hagerman, Quantitative determination of ellagic acid, *J. Agric. Food Chem*. 38 (1990) 1678–1683. <https://doi.org/10.1021/jf00098a011>.
- [288] U.D. Chavan, F. Shahidi, M. Nacz, Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents, *Food Chemistry*. 75 (2001) 509–512. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00234-5).
- [289] A. Zalacain, M. Prodanov, M. Carmona, G.L. Alonso, Optimisation of Extraction and Identification of Gallotannins from Sumac Leaves, *Biosystems Engineering*. 84 (2003) 211–216. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(02\)00246-5](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00246-5).
- [290] L. Ping, A. Pizzi, Z.D. Guo, N. Brosse, Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard, *Industrial Crops and Products*. 34 (2011) 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.009>.
- [291] S. Cobzac, M. Moldovan, N.-K. Olah, L. Boboș, E. Surducun, Tannin Extraction Efficiency, from *Rubus Idaeus*, *Cydonia Oblonga* and *Rumex Acetosa*, Using Different Extraction Techniques and Spectrophotometric Quantification, *Seria F Chemia*. 8 (2005).
- [292] W.J. Whelan, Partition Chromatography Revisited, *IUBMB Life*. 51 (2001) 329–330. <https://doi.org/10.1080/152165401317190851>.
- [293] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*. 499 (1990) 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3).
- [294] S. Mori, H.G. Barth, *Size Exclusion Chromatography*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [295] P.R. Levison, Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: Comparison of different formats, *Journal of Chromatography B*. 790 (2003) 17–33. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00087-4).
- [296] M.M. Dittmann, G.P. Rozing, Capillary electrochromatography — a high-efficiency micro-separation technique, *Journal of Chromatography A*. 744 (1996) 63–74. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00382-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00382-2).
- [297] I.M. Mutton, “Practical HPLC method development”, 2nd edition, *Chromatographia*. 47 (1998) 234–234. <https://doi.org/10.1007/BF02466588>.

- [298] M. Swartz, HPLC detectors: a brief review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO.* 33 (2010) 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.
- [299] H. Choi, Advantages of Photodiode Array, (n.d.) 8.
- [300] T.M. Annesley, Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry.* 49 (2003) 1041–1044. <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>.
- [301] L. Nováková, H. Vlčková, D. Šatínský, P. Sadílek, D. Solichová, M. Bláha, V. Bláha, P. Solich, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin, *Journal of Chromatography B.* 877 (2009) 2093–2103. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.052>.
- [302] L. Hollecker, M. Pinna, G. Filippino, S. Scrugli, B. Pinna, F. Argiolas, M. Murru, Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography–electron spray ionisation-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.* 1216 (2009) 3402–3408. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.010>.
- [303] A.T. Blades, M.G. Ikonomou, Paul. Kebarle, Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2109–2114. <https://doi.org/10.1021/ac00019a009>.
- [304] S. Medhe, Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review, *Mass Spectrom Purif Tech.* 04 (2018). <https://doi.org/10.4172/2469-9861.1000126>.
- [305] P.E. Miller, M.B. Denton, The quadrupole mass filter: Basic operating concepts, *J. Chem. Educ.* 63 (1986) 617. <https://doi.org/10.1021/ed063p617>.
- [306] K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann, Preparative Pressure Liquid Chromatography, in: K. Hostettmann, A. Marston, M. Hostettmann (Eds.), *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1998: pp. 50–127. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03631-0_5.
- [307] H. Ishii, M. Nakamura, S. Seo, K. Tori, T. Tozyo, Y. Yoshimura, Isolation, Characterization, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra of New Saponins from the Roots of *Bupleurum falcatum* L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 28 (1980) 2367–2373. <https://doi.org/10.1248/cpb.28.2367>.
- [308] A. Sukito, S. Tachibana, Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents, *Pak. J. Biol. Sci.* 17 (2014) 999–1006. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.999.1006>.
- [309] S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden, Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology.* 94 (2004) 219–243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>.
- [310] M.J. Piao, K.A. Kang, R. Zhang, D.O. Ko, Z.H. Wang, H.J. You, H.S. Kim, J.S. Kim, S.S. Kang, J.W. Hyun, Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1780 (2008) 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.012>.
- [311] M.A. Rostagno, J.M. Prado, *Natural Product Extraction: Principles and Applications*, Royal Society of Chemistry, 2013.
- [312] J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, (n.d.) 210.
- [313] L. Becker, A. Zaiter, J. Petit, M.-C. Karam, M. Sudol, E. Baudelaire, J. Scher, A. Dicko, How do grinding and sieving impact on physicochemical properties, polyphenol content, and antioxidant activity of *Hieracium pilosella* L. powders?, *Journal of Functional Foods.* 35 (2017) 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.043>.
- [314] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S.I. Koo, O.K. Chun, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of Food Composition and Analysis.* 24 (2011) 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.

- [315] J. Fang, Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects, *Nutrition*. 31 (2015) 1301–1306. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.04.015>.
- [316] E. Hvattum, Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 16 (2002) 655–662. <https://doi.org/10.1002/rcm.622>.
- [317] A. Betancor-Fernández, A. Pérez-Gálvez, H. Sies, W. Stahl, Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 55 (2003) 981–986. <https://doi.org/10.1211/0022357021468>.
- [318] A. Zaiter, L. Becker, E. Baudelaire, A. Dicko, Optimum polyphenol and triterpene contents of *Hedera helix* (L.) and *Scrophularia nodosa* (L.): The role of powder particle size, *Microchemical Journal*. 137 (2018) 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.10.011>.
- [319] M. Mousavi, A. Zaiter, L. Becker, A. Modarressi, E. Baudelaire, A. Dicko, Optimisation of phytochemical characteristics and antioxidative properties of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds and *Ocimum basilicum* L. leaves superfine powders using new parting process, *Phytochemical Analysis*. 0 (n.d.). <https://doi.org/10.1002/pca.2875>.
- [320] A. Zaiter, L. Becker, J. Petit, D. Zimmer, M.-C. Karam, É. Baudelaire, J. Scher, A. Dicko, Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders, *Powder Technology*. 301 (2016) 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.07.014>.

ANNEXE I

Le fenouil :

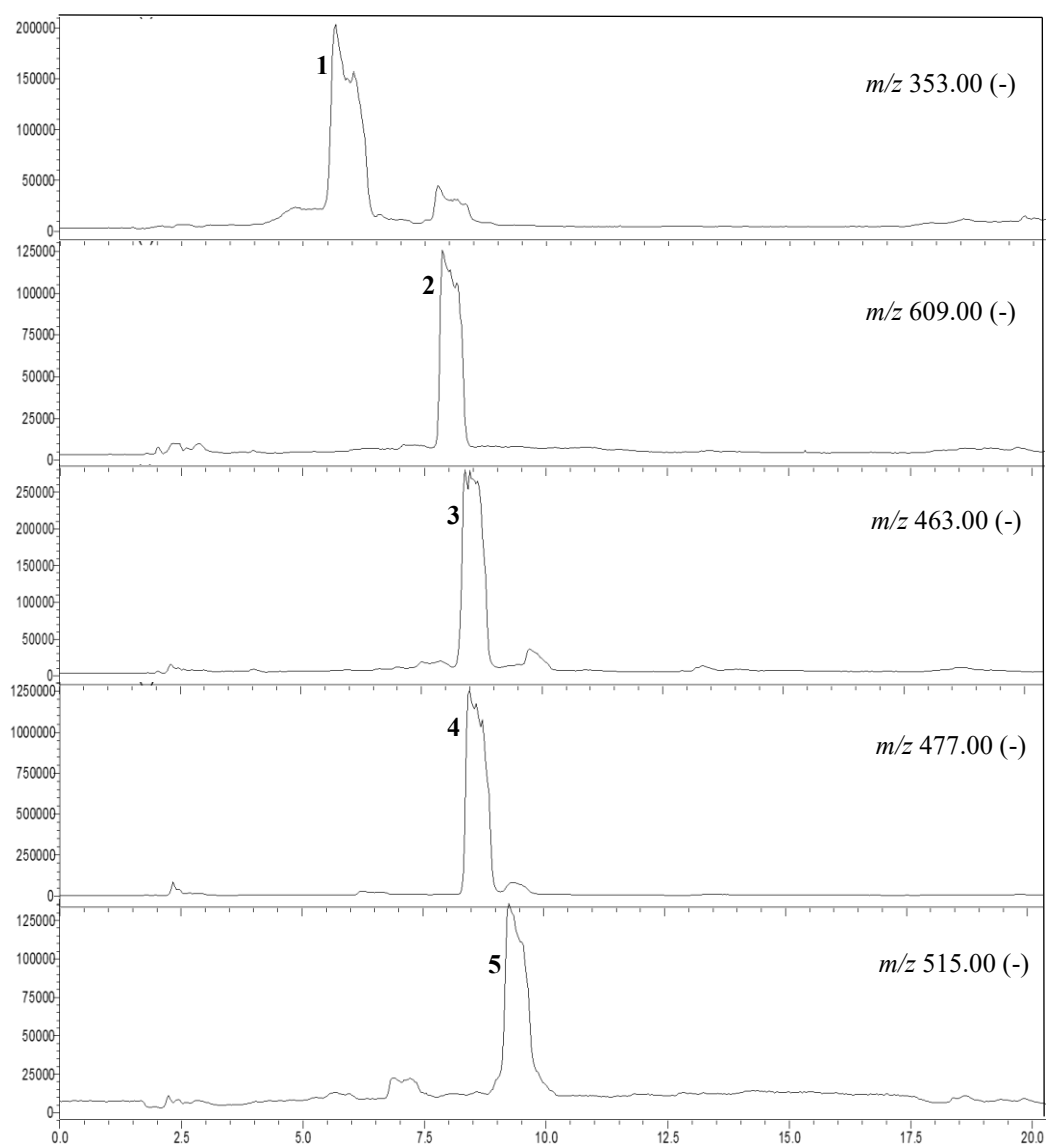


Figure 1 : Les profils du chromatogramme d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction $< 180 \mu\text{m}$ du fenouil. Les composés caractérisés : 1. Acide chlorogénique (m/z 353), 2. Rutine (m/z 609), 3. Isoquercétine (m/z 463), 4. Quercétine 3-glucuronide (m/z 477) et 5. Acide 1,5-dicaféoylquinique (m/z 515).

Le saule blanc :

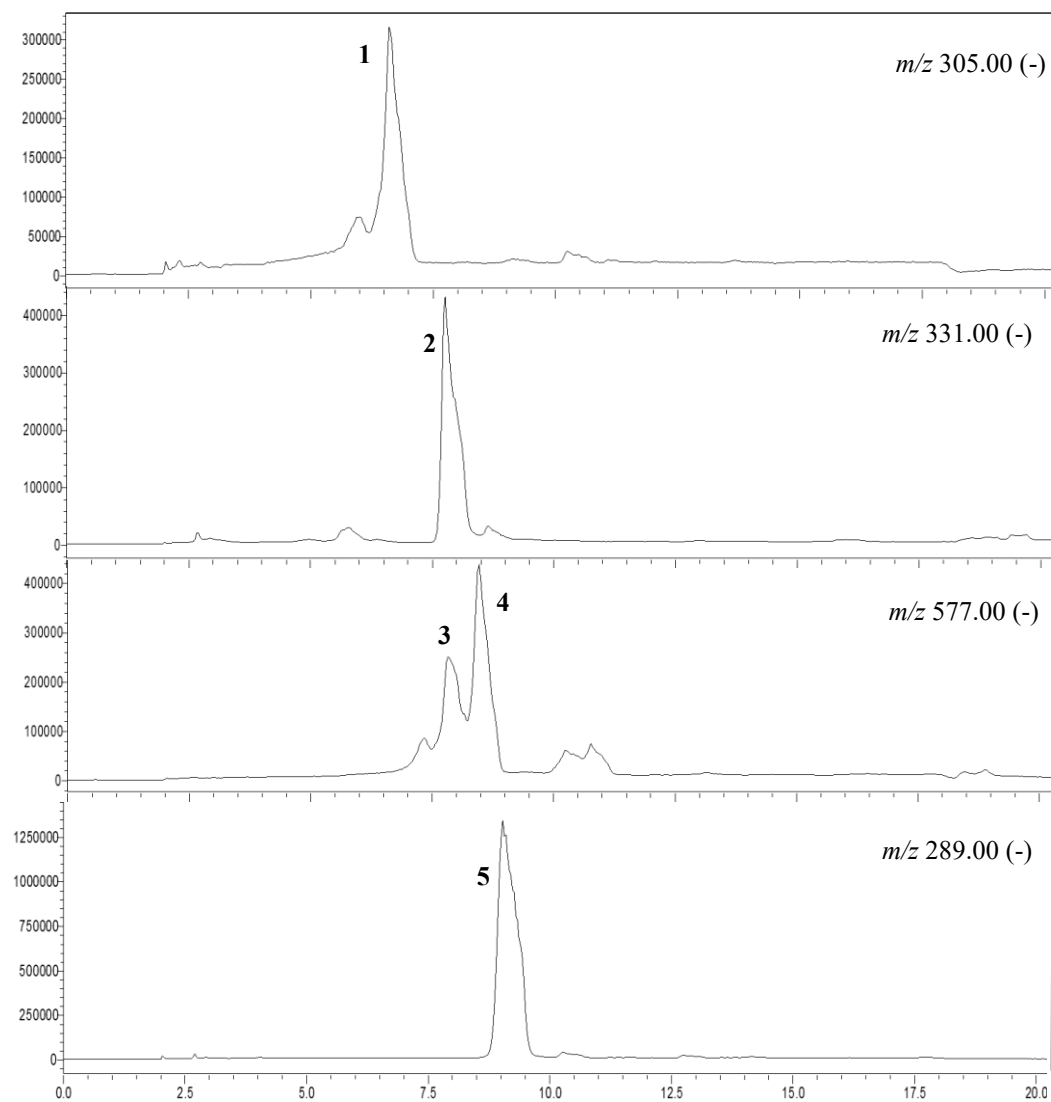


Figure 2: Les profils du chromatogramme d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction < 180 μm du saule blanc. Les composés caractérisés : **1.** Gallocatéchine (m/z 305), **2.** Salicyline (m/z 285) additionnée à son adduit (46) : m/z 331, **3.** Procyanidine B2 (m/z 577), **4.** Procyanidine B1 (m/z 577) et **5.** Catéchine (m/z 289).

Le millepertuis :

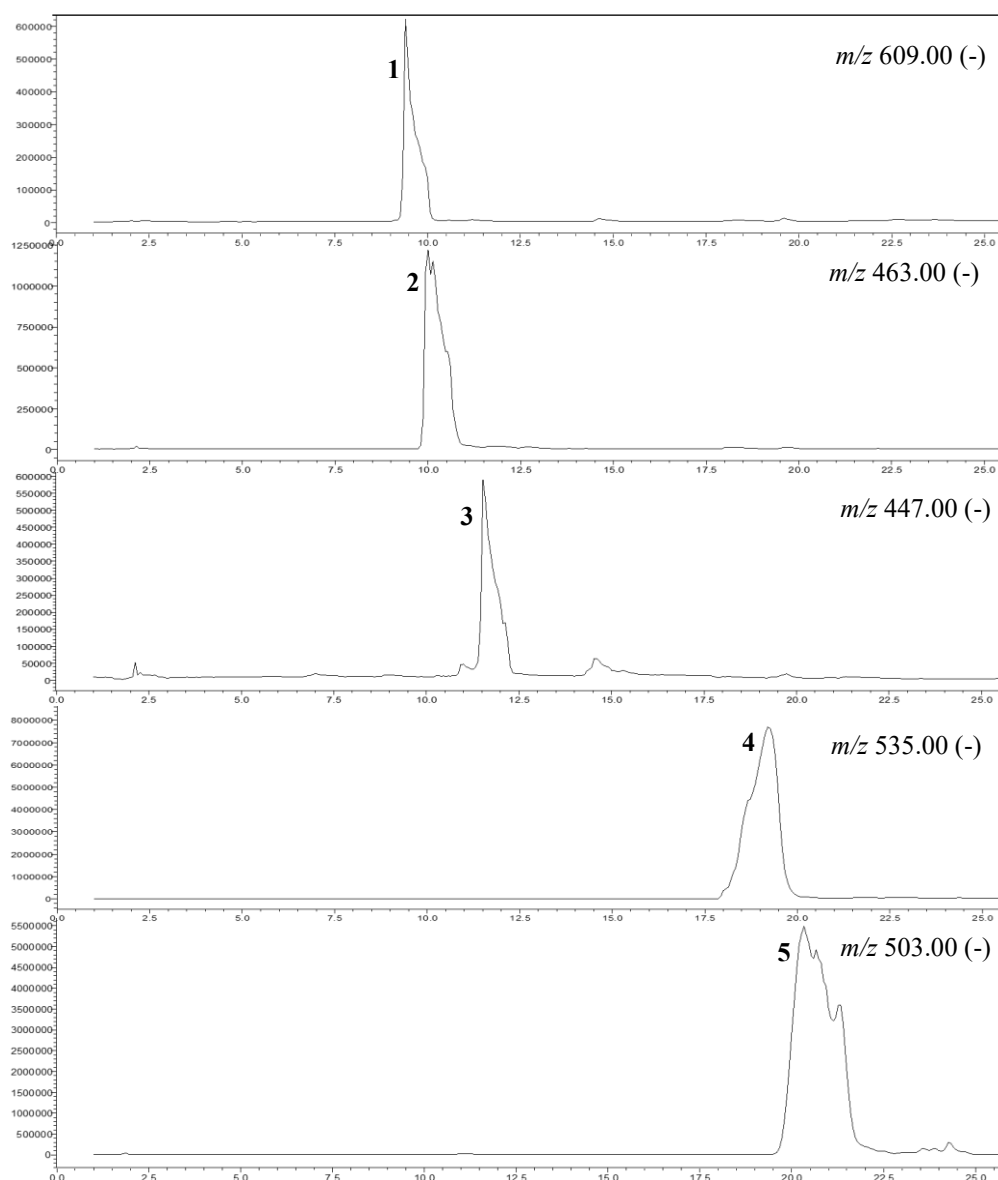


Figure 3 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction < 180 μ m du millepertuis. Les composés caractérisés : **1.** Rutine (m/z 609), **2.** Hypéroside (m/z 463), **3.** Quercitrine (m/z 447), **4.** Hyperforine (m/z 535) et **5.** Hypericine (m/z 503).

L'ortie :

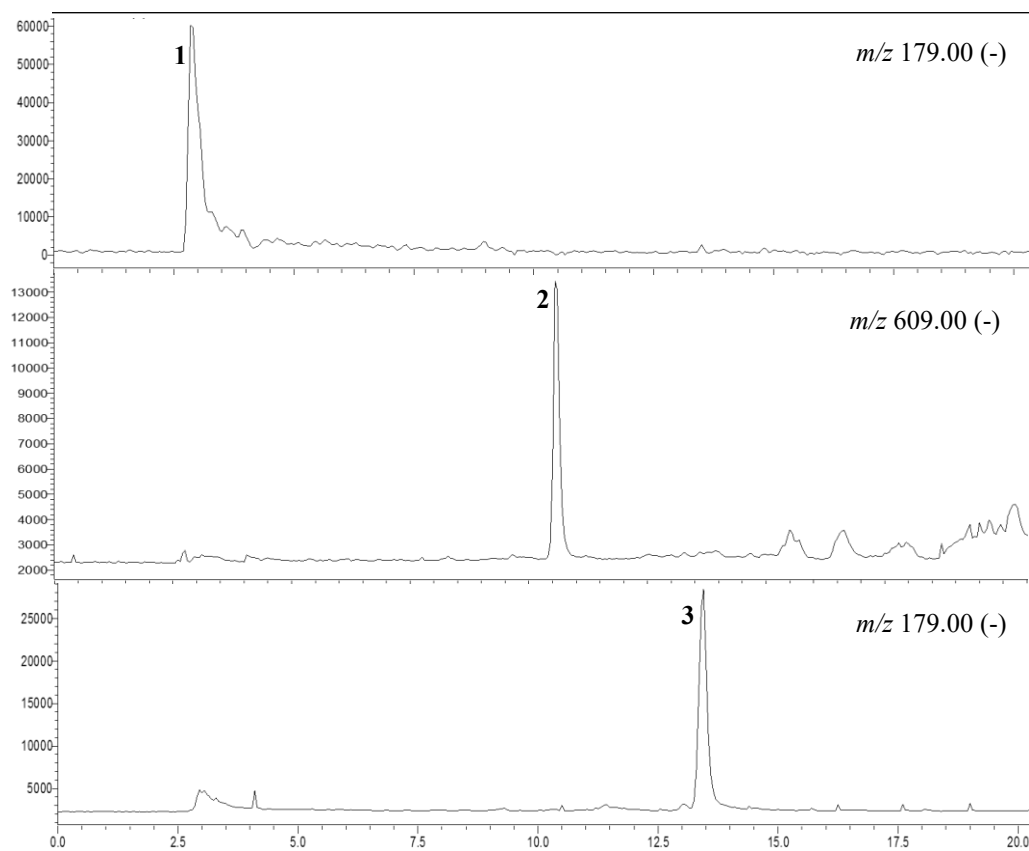


Figure 4 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction < 180 μ m de l'ortie. Les composés caractérisés : **1.** Acide caféique (m/z 179), **2.** Rutine (m/z 609) et **3.** Acide férulique (m/z 193).

La solidage :

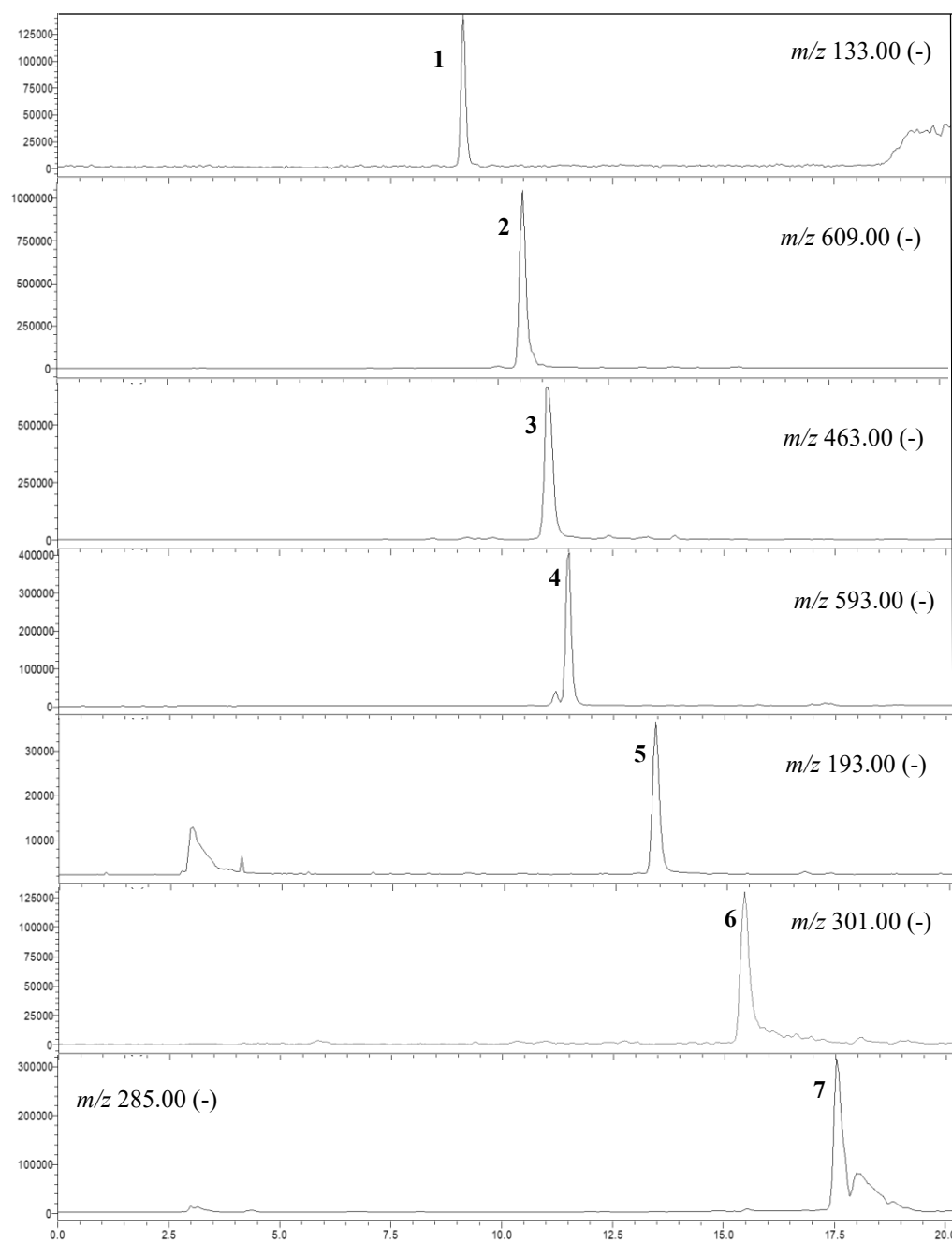


Figure 5 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 180-315 μm de la solidage. Les composés caractérisés : 1. Acide chlorogénique (m/z 353), 2. Rutine (m/z 609), 3. Isoquercétine (m/z 463), 4. Kaempférol-3-O-rutinoside (m/z 593), 5. Acide férulique (m/z 193), 6. Quercétine (m/z 301) et 7. Kaempférol (m/z 285).

La piloselle :

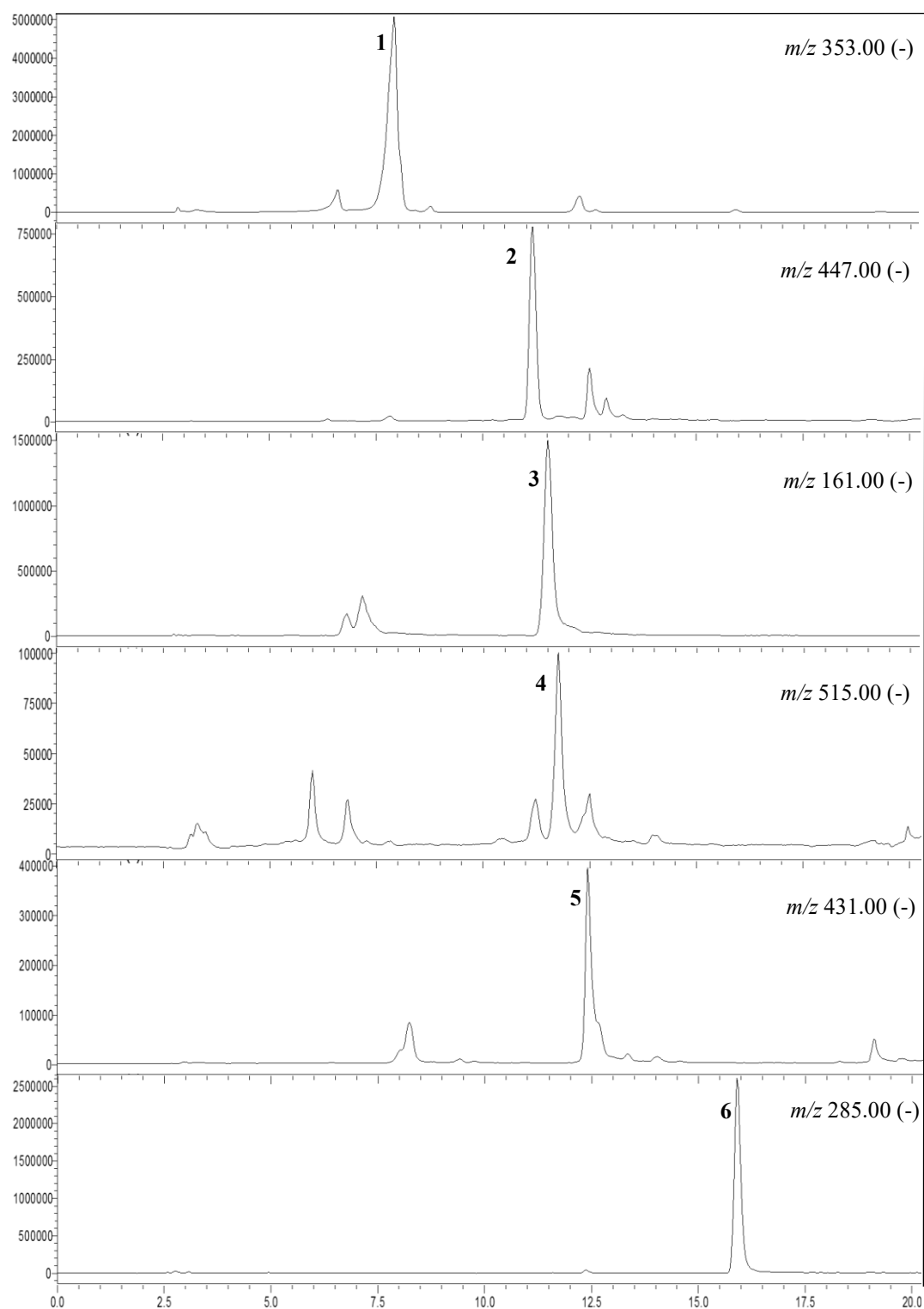


Figure 6 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 315-500 μm de la piloselle. Les composés caractérisés : **1.** Acide chlorogénique (m/z 353), **2.** Lutéolin-7-O-glucoside (m/z 447), **3.** Ombelliférone (m/z 161), **4.** Acid 1,5-dicafféoylquinic (m/z 515), **5.** Apégenine-7-O-glucoside (m/z 431) et **6.** Lutéoline (m/z 285).

Le rosier des chiens :

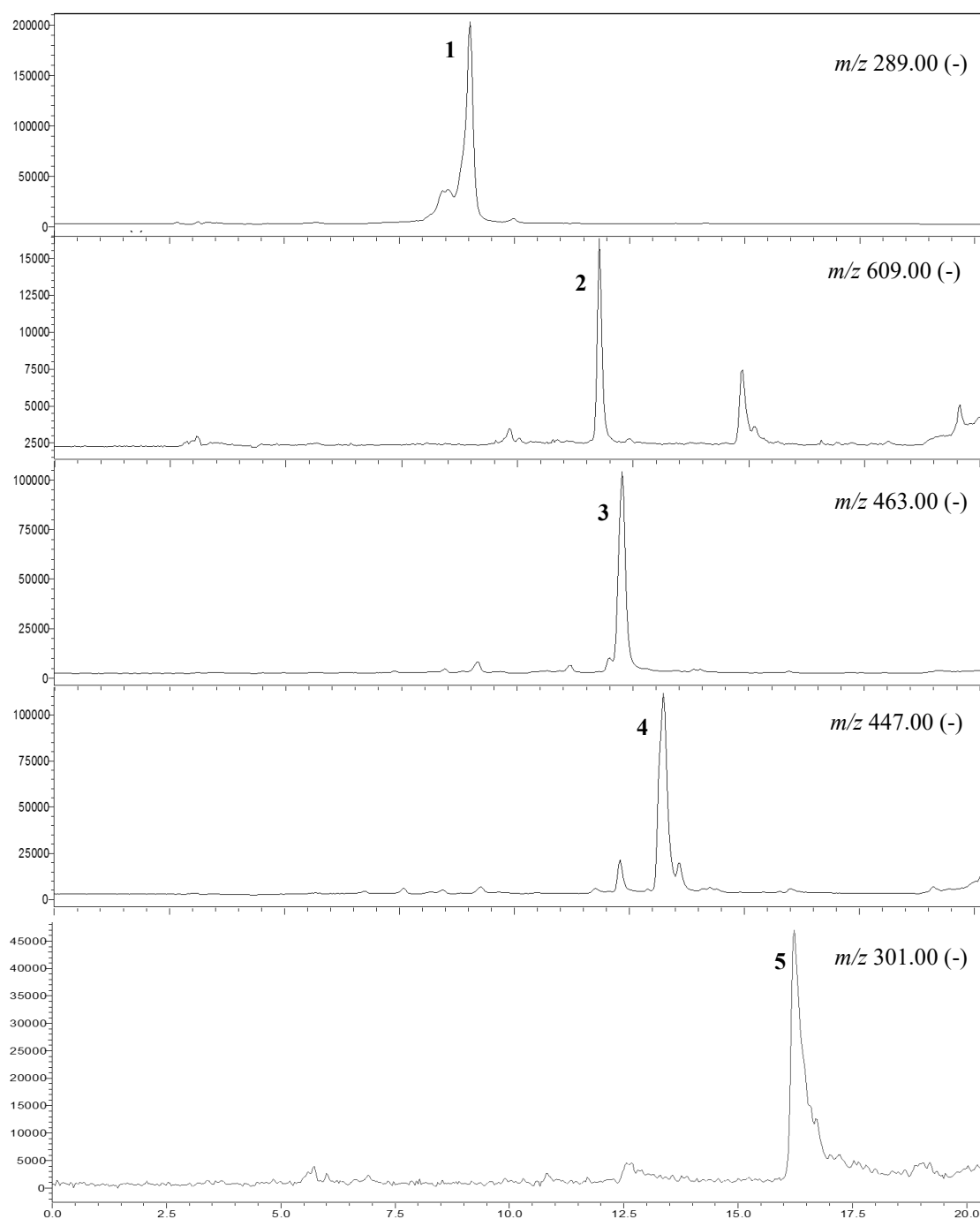


Figure 7 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 315-500 μm du rosier des chiens. Les composés caractérisés : **1.** (+)-Catéchine (m/z 289), **2.** Rutine (m/z 609), **3.** Hypéroside (m/z 463), **4.** Quercitrine (m/z 447) et **5.** Quercétine (m/z 301).

La griffe du diable :

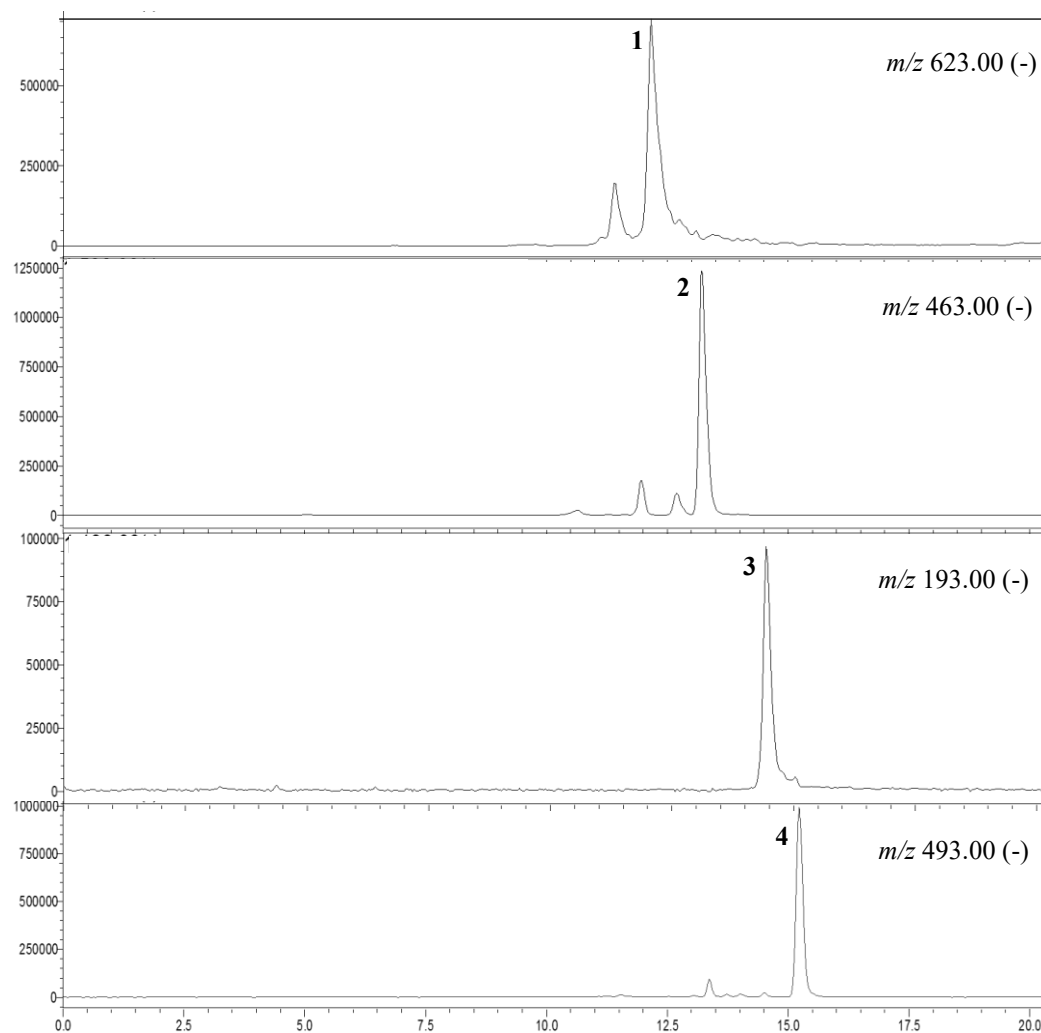


Figure 8 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction $> 500 \mu\text{m}$ de la griffe du diable. Les composés caractérisés : **1.** Verbascoside (m/z 623), **2.** Isoquercétine (m/z 463), **3.** Acide férulique (m/z 193) et **4.** Harpagoside (m/z 493).

Le lierre :

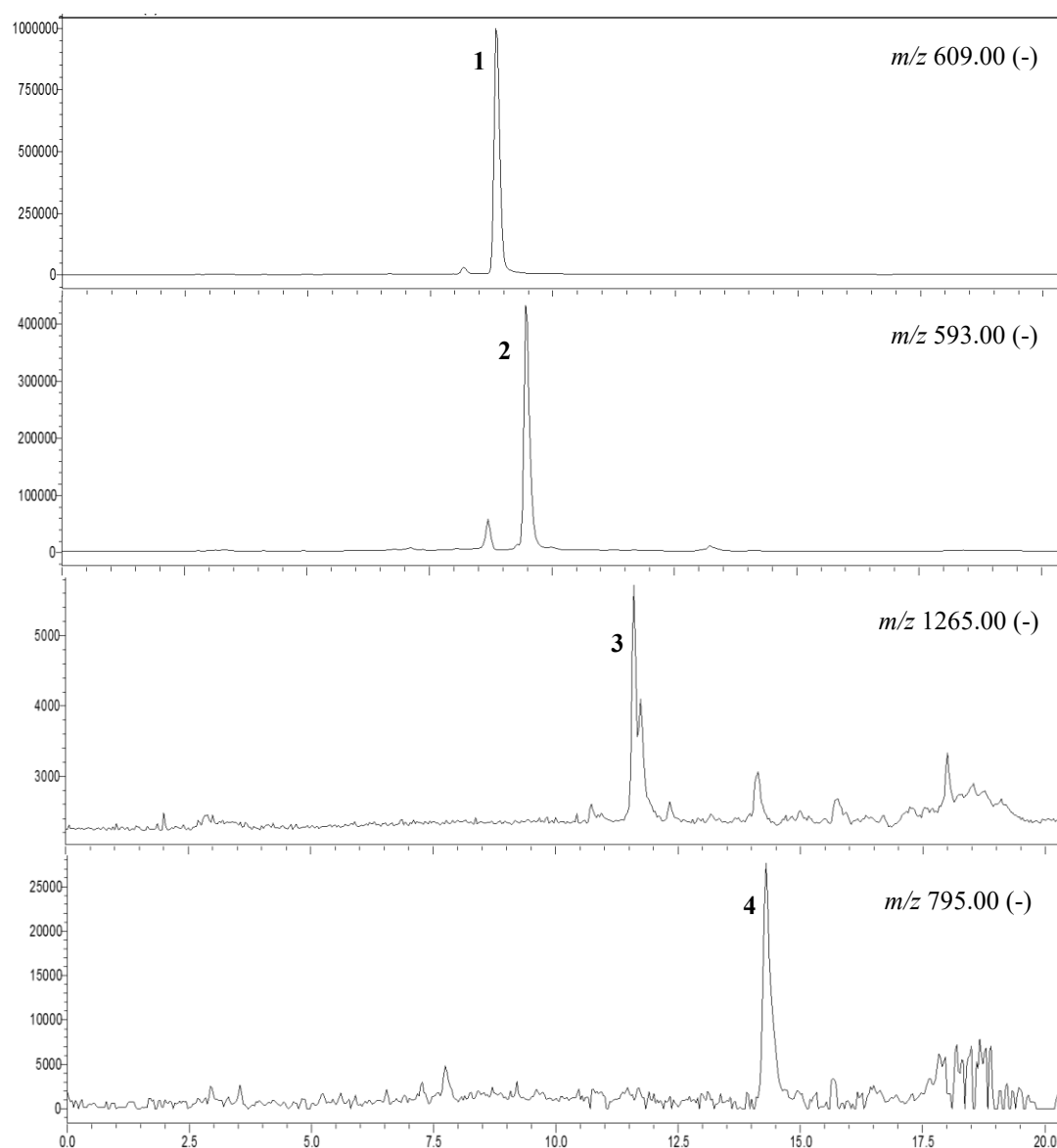


Figure 9 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction $> 500 \mu\text{m}$ du lierre. Les composés caractérisés : **1.** Rutine (m/z 609), **2.** Kaempferol-3-O-rutinoside (m/z 593), **3.** Hédéracoside C (m/z 1220) et **4.** α -Hédérine (m/z 749) additionnées de leur adduits (46) : m/z 1265 et m/z 795, respectivement.

La cerise :

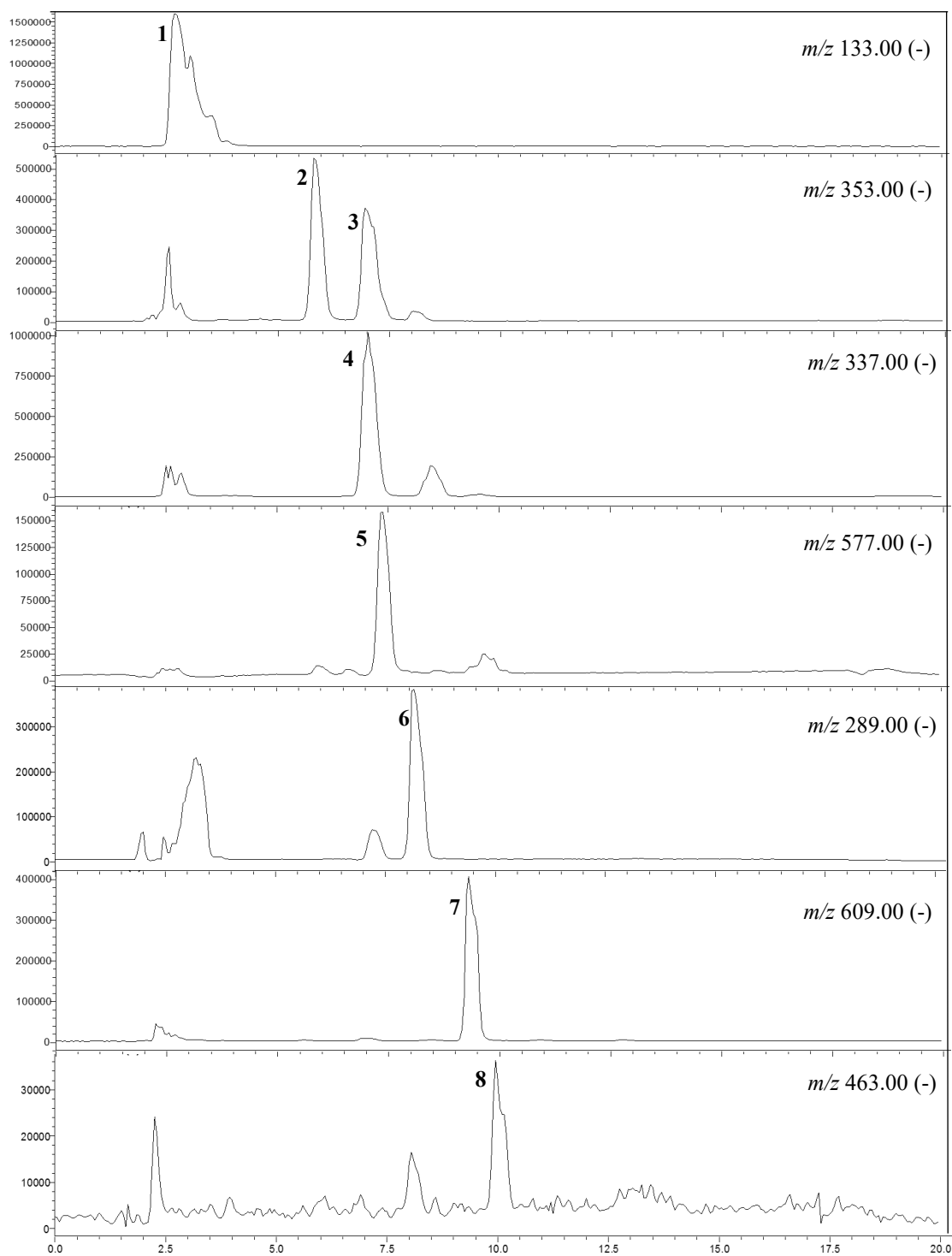


Figure 10 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 180-315 μm de la cerise. Les composés caractérisés : **1.** Acide malique (m/z 133), **2,3.** Acide chlorogénique (m/z 353), **4.** Acide *p*-coumaroylquinique (m/z 337), **5.** Procyanidine B2 (m/z 577), **6.** Epicatechine (m/z 289), **7.** Rutine (m/z 609) et **8.** Isoquercetine (m/z 463).

La pêche :

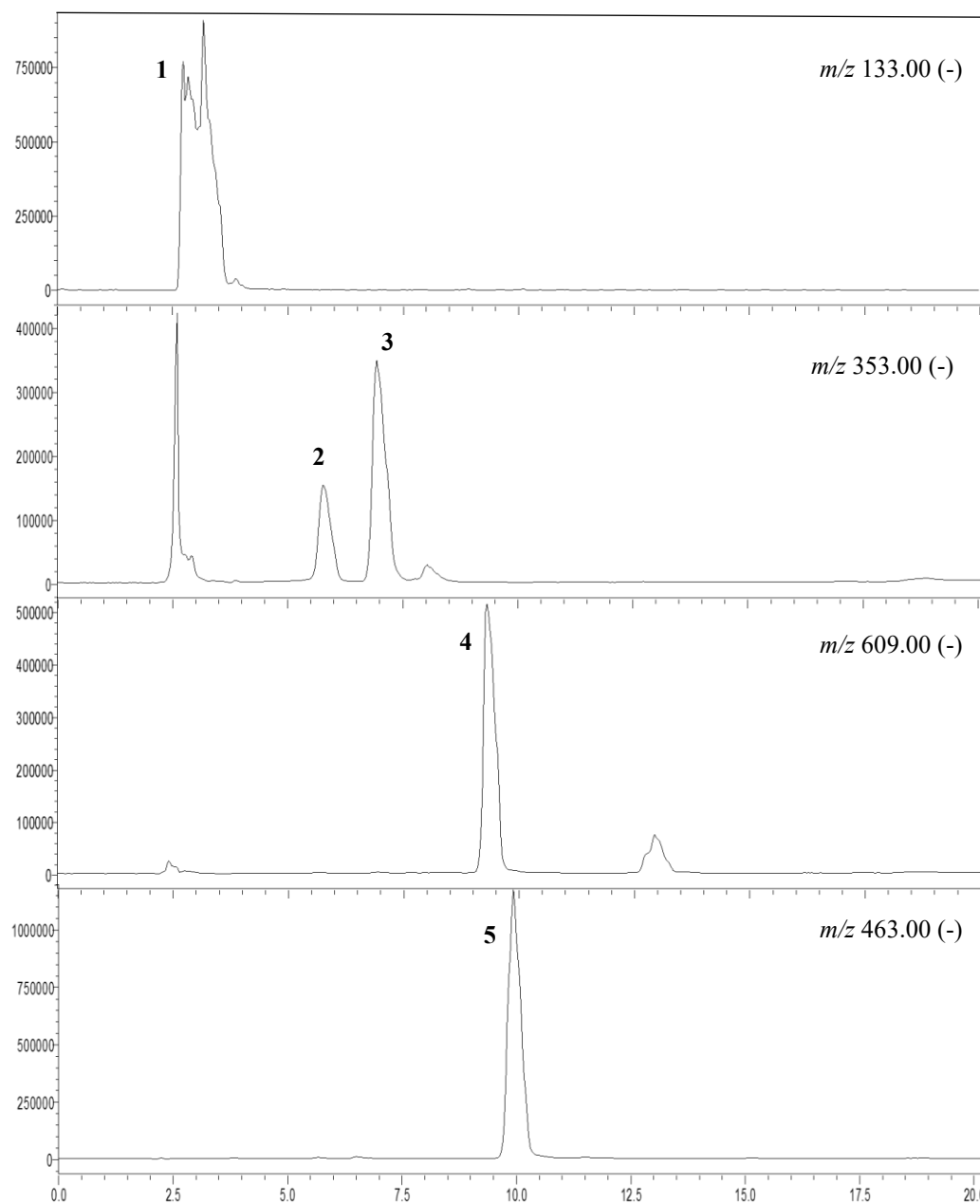


Figure 11 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 180-315 μm de la pêche. Les composés caractérisés : **1.** Acide malique (m/z 133), **2,3.** Acide chlorogénique (m/z 353), **4.** Rutine (m/z 609) et **5.** Isoquercétine (m/z 463).

La quetsche :

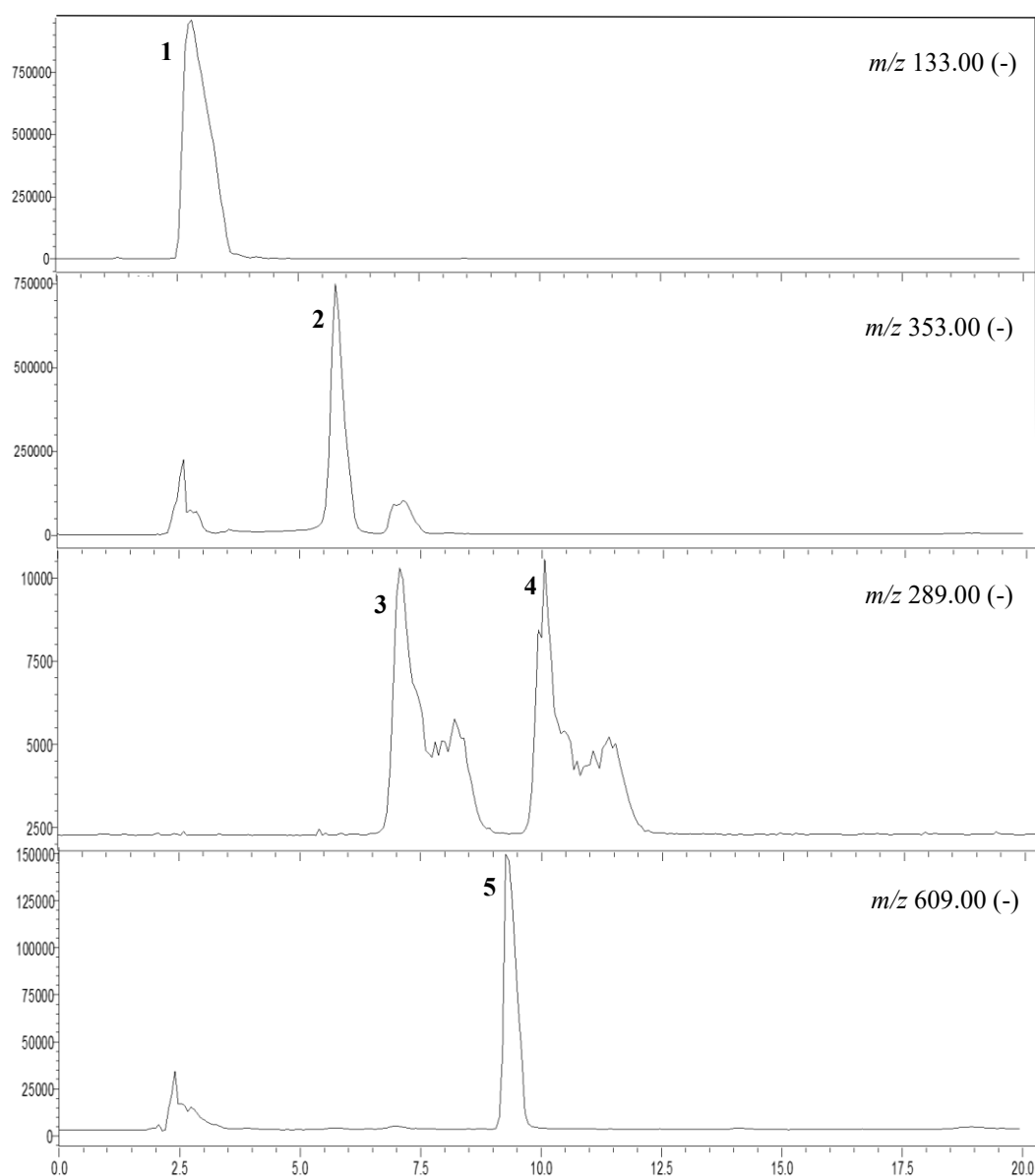


Figure 12 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 180-315 μm de la quetsche. Les composés caractérisés : **1.** Acide malique (m/z 133), **2.** Acide chlorogénique (m/z 353), **3.** (+)-Catéchine (m/z 289), **4.** (-)-Epicatechine (m/z 289) et **5.** Rutine (m/z 609).

La mirabelle :

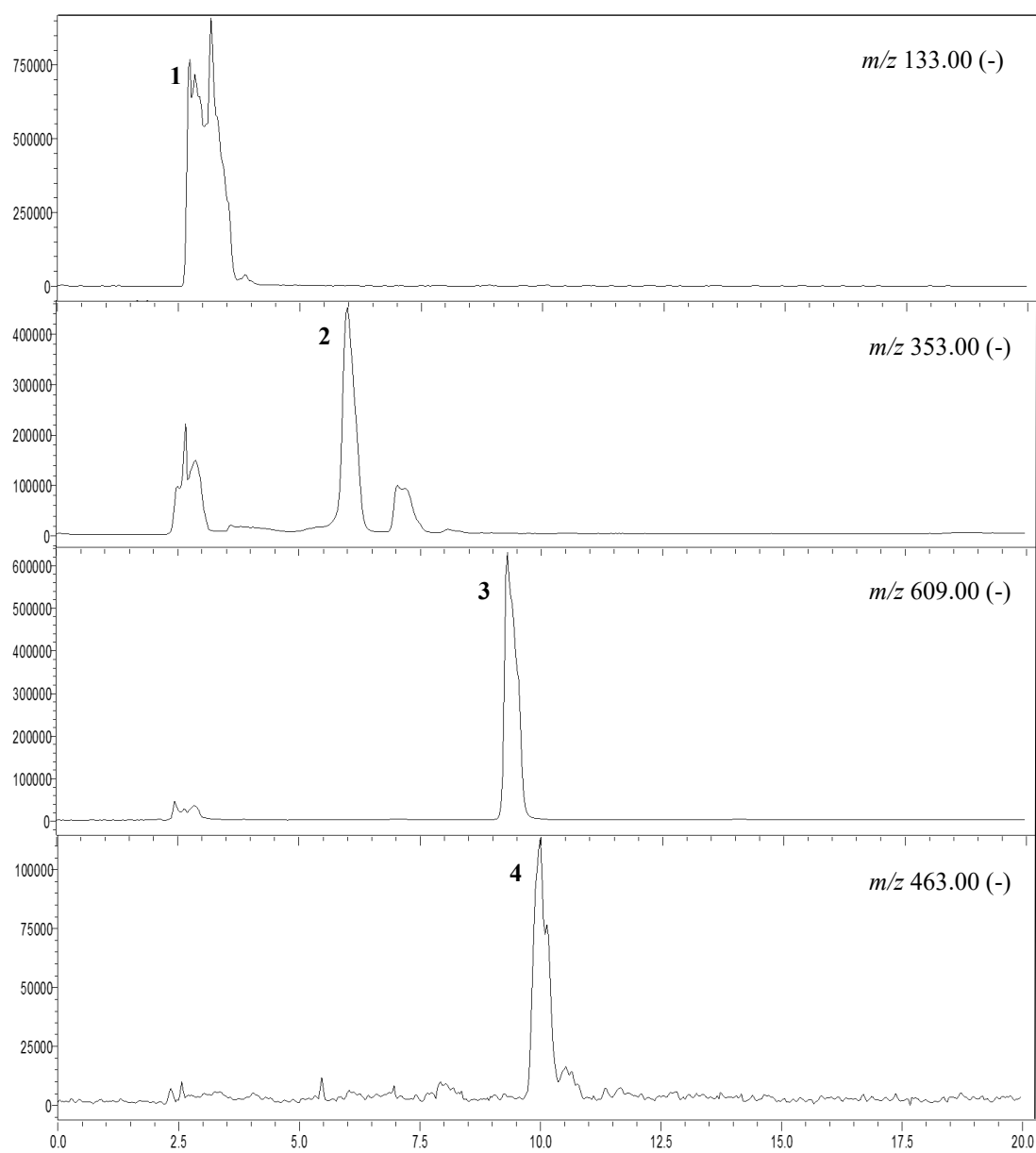


Figure 13 : Chromatogrammes d'ions extraits (SIM) par LC-ESI/MS de la fraction 180-315 μm de la mirabelle. Les composés caractérisés : **1.** Acide malique (m/z 133), **2.** Acide chlorogénique (m/z 353), **3.** Rutine (m/z 609) et **4.** Isoquercétine (m/z 463).

ANNEXE II

PUBLICATIONS

1. Optimisation of phytochemical characteristics and antioxidative properties of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds and *Ocimum basilicum* L. leaves superfine powders using new parting process
2. The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders

Optimisation of phytochemical characteristics and antioxidative properties of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds and *Ocimum basilicum* L. leaves superfine powders using new parting process

Mahta Mousavi¹ | Ali Zaiter^{1,2}  | Loïc Becker² | Ali Modarressi¹ | Elie Baudelaire² | Amadou Dicko¹

¹LCP-A2MC (Laboratoire de Chimie et Physique – Approche Multi-échelles des milieux Complexes), Université de Lorraine, 1, Boulevard Arago, Metz Cedex 03 57078, France

²AGRITECH-France, 4, Rue Piroux, 54000 Nancy, France

Correspondence

Ali Zaiter, Université de Lorraine, LCP-A2MC (Laboratoire de Chimie et Physique – Approche Multi-échelles des milieux Complexes), 1, Boulevard Arago, Metz Cedex 03, 57078, France.
Email: ali.zaiter@univ.lorraine.fr

Funding information

Bensina Natural Limited

Abstract

Introduction: Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) are two aromatic medicinal plants. Recently, a new parting process which is named CDS “Comminution and to control Diffraction Sieving” is taken into consideration and its positive effect on the extraction of bioactive compounds from the plants, without any solvent, is reported.

Objective: Study the effect of CDS on phytochemical properties of superfine powders of fennel seeds and basil leaves.

Methods: Fennel seeds and basil leaves superfine powders were fractionated as follows: 100–180 µm, 180–315 µm, 315–500 µm, > 500 µm and unsieved superfine powders. Extraction of polyphenols was carried out using hydromethanolic maceration. The essential oils were extracted by maceration with dichloromethane. The antioxidant activities were evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay. Using liquid chromatography ultraviolet electrospray ionisation mass spectrometry (LC-UV-ESI-MS), concentrations of characterised phenolic compounds were measured. The essential oils compositions were characterised using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

Results: In fennel seeds, the 100–180 µm fraction had maximum antioxidant activity and LC-UV-ESI-MS analyses proved that the best extraction of certain polyphenols was obtained in the 100–180 µm fraction. In basil leaves, the best antioxidant activity corresponded to the 315–500 µm fraction and LC-UV-ESI-MS analyses showed that the polyphenols were concentrated in the < 315 µm fractions. For both plants, GC-MS presented that the essential oils were concentrated in the 315–500 µm fraction.

Conclusion: CDS as a new green parting process leads to improve the phytochemical properties of these two superfine plant powders in the specific granulometric classes.

KEYWORDS

antioxidant activity, bioactive compounds, GC-MS, granulometric classes, LC-UV-ESI-MS

1 | INTRODUCTION

Plants have been extensively used for their medicinal and cosmetic aspects. Today, many drugs from herbal medicines have been introduced to international markets^{1,2} and the cosmetic industry takes more attention to the green cosmetic raw materials extracted from plants.^{3,4} Certain plants are rich sources of natural antioxidants such as phenolic and polyphenolic compounds⁵ and many diseases are treated and various cosmetic products are improved due to these natural antioxidants.^{6–8} The other characteristic compounds present in plants are essential oils and these aromatic substances can be isolated from various parts of the plants. Pharmacology, clinical microbiology, phytopathology, and food preservation are some fields in which the essential oils can be applied.⁹

For decades, the extraction of bioactive compounds from plants have been conducted with traditional methods. Current developments are focused on improving traditional techniques to increase the extraction yield¹⁰ using green methods such as ultrasound,¹¹ microwaves¹² and superfine grinding process.¹³ Recently, a new grinding and sieving process which is named CDS "Comminution and to control Diffraction Sieving" (patent WO2013057379A1) is taken into consideration and its positive effect on extraction of bioactive compounds from the plants, without any solvent, is reported.^{14,15}

In this article, for the first time, the effect of CDS on phytochemical properties of superfine powders of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds and superfine powders of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves from the Lorraine Region in France, under different granulometric classes was studied. The antioxidant activities were evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay. Using liquid chromatography ultraviolet electrospray ionisation mass spectrometry (LC-UV-ESI-MS), concentrations of characterised phenolic compounds were measured. The essential oils compositions were characterised using GC-MS.

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) belongs to the Apiaceae family and it is a well-known aromatic medicinal plant. Anti-inflammatory¹⁶ and radical scavenging activity¹⁷ are the pharmaceutical effects of fennel seeds owing to its antioxidants. Antioxidant potential of fennel seeds, which is because of the existence of phenolic compounds was analysed.^{18,19} Numerous studies reported that the pharmacological effects of fennel seeds are attributed to essential oils.²⁰ Indeed, antibacterial,²¹ antimicrobial,^{22,23} antifungal²⁴ and antidiabetic²⁵ activities were reported as the important pharmacological effects of fennel seeds mainly due to its essential oils content. In addition, the fennel extract is used in the cosmetic industry to improve the anti-ageing effects of skincare products.²⁶

Basil (*Ocimum basilicum* L.) belongs to Lamiaceae (mints) family and it is an aromatic plant possessing essential oils. Antigiardial activity,²⁷ anti-mutagenesis,²⁸ antimicrobial²⁹ and anticancer³⁰ were reported as the main pharmaceutical aspects of basil. Most of the reported pharmaceutical aspects of this plant are due to the existence of antioxidants such as phenolic compounds.³¹

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Plants and powders

Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds and basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves were provided by Cailleau Herboristerie (Chemillé, France). The laboratory apparatus "Ultra Centrifugal Mill ZM 200" was used to grind and "vibratory sieve shaker Analysette 3 Spartan" was used to sieve. Different granulometric classes were fractionated as follows: 100–180 μm , 180–315 μm , 315–500 μm , > 500 μm and unsieved superfine plants powders.

2.2 | Chemicals

Folin–Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), DPPH, chlorogenic acid, isoquercetin, (+)-catechin, rutin, caffeic acid, ferulic acid, apigenin, rosmarinic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid, quercetin-glucuronide, D-limonene, fenchone, anethole, eucalyptol, linalool, estragole, eugenol, HPLC-grade methanol, dichloromethane, water, acetonitrile and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium nitrate (NaNO_3), sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride (AlCl_3) and sodium hydroxide (NaOH) were acquired from Acros Organics (Geel, Belgium).

2.3 | Phenolic compounds extraction

Hydromethanolic macerations for all granulometric classes of each plant were carried out based on the method described by Čujić et al.¹⁰ Briefly, 2 g of powder of each fraction was macerated in 20 mL of methanol–water (70–30%, v/v) during 24 h, at room temperature, under stirring at 11000 rpm (Fisherbrand Seastar digital orbital shaker, UK). The extracts were filtered (filter paper: 10–20 μm) and they were stored in sealed dark bottles at 4°C until required.

2.4 | Essential oils extraction

Extraction of essential oils was performed by maceration with dichloromethane. For this, 2 g of powder of each fraction was macerated in 20 mL of dichloromethane, during 24 h, at room temperature, under stirring at 11000 rpm. After filtration (filter paper: 10–20 μm), the solvent was evaporated under reduced pressure and the oily residue was stored in sealed dark bottles at 4°C until required.³²

2.5 | UV-visible analyses

Colourimetric determination of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (AA) were performed by UV-visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

2.5.1 | Total phenolic content (TPC)

TPC was determined following the method by Muanda *et al.*³³ which was slightly modified. Briefly, 500 μ L of Folin-Ciocalteu reagent (1 N) was added to 100 μ L of each extract, which was diluted with 5 mL distilled water. After 5 min, 2 mL of Na_2CO_3 (7%) was added and the mixture was incubated at room temperature. After 60 min, the absorbance was measured at 725 nm against the blank (methanol). A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of gallic acid as a standard (0.2, 0.6, 1.56, 2.08, 2.53, 3.06, 3.53 and 4.03 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g DW).

2.5.2 | Total flavonoid content (TFC)

TFC was determined based on a method described by Chen and Chen³⁴ with some modifications. In brief, 300 μ L of NaNO_2 (5%) was added to 100 μ L of each extract, which was diluted with 5 mL distilled water. After 5 min, 300 μ L of AlCl_3 (10%) and 2 mL of NaOH (1 M) were added and the sample was mixed. Absorbance was measured at 510 nm against the blank (methanol). A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of catechin as a standard (0.2, 0.46, 0.83, 1.68, 2.24, 3.07 and 3.53 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of catechin equivalents per gram of dry weight (mg CE/g DW).

2.5.3 | Antioxidant activity

Using DPPH scavenging activity assay,³⁵ the AAs were evaluated. Therefore, 100 μ L of each extract was added to 3 mL of DPPH methanolic solution (200 μ M). The mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min. Absorbance was measured at 518 nm against the blank (DPPH methanolic solution). A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of Trolox as a standard (0.1, 0.3, 0.7, 1, 1.3, 1.7 and 2 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of Trolox equivalents per gram of dry weight (mg TE/g DW).³⁶

2.6 | LC-UV-ESI-MS analyses

The bioactive compounds were determined using Shimadzu LC-MS 2020 equipment, an HPLC unit coupled to a UV detector and an ESI source allowing the MS detection. The column used was a Gemini 3 mm C18 130 Å reversed phase column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) of 150 mm length and 4.6 mm internal diameter.

2.6.1 | Analytical conditions

The column oven temperature was set at 30°C, the volume injection was 20 μ L and the quaternary pump delivered a flow rate of 0.6 mL/min. The mobile phase was a mixture of (A) water (acidified to 0.5% with formic acid) and (B) acetonitrile. For fennel analyses, the following elution gradient was used: 0–10 min from 90:10 to

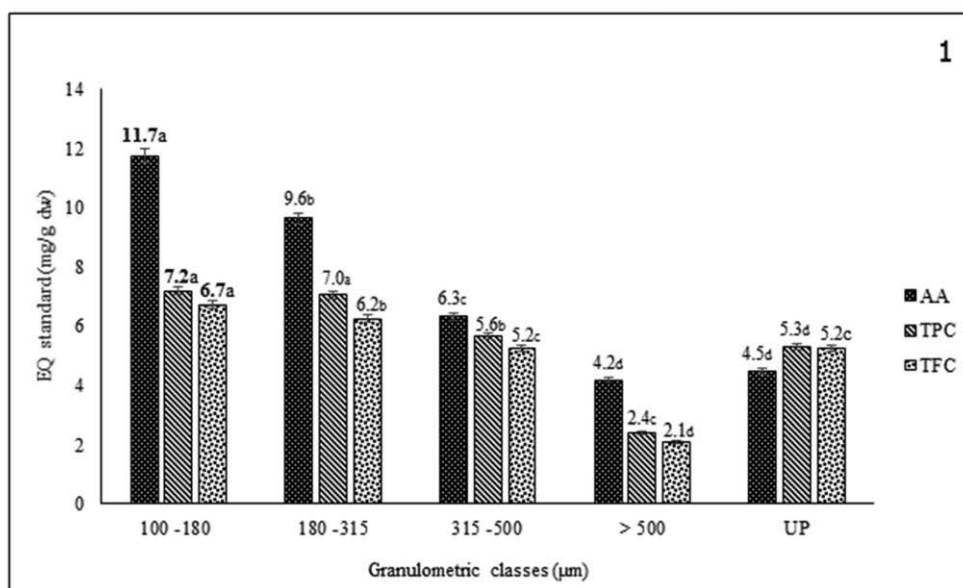


FIGURE 1 Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (AA) of the following granulometric classes of superfine fennel powders: 100–180 μ m, 180–315 μ m, 315–500 μ m, > 500 μ m and unsieved powders (UP). All values were expressed as means $\pm$ standard deviations of triplicate measures. Bars topped by different letters in each analyse were statistically different ($P < 0.05$).

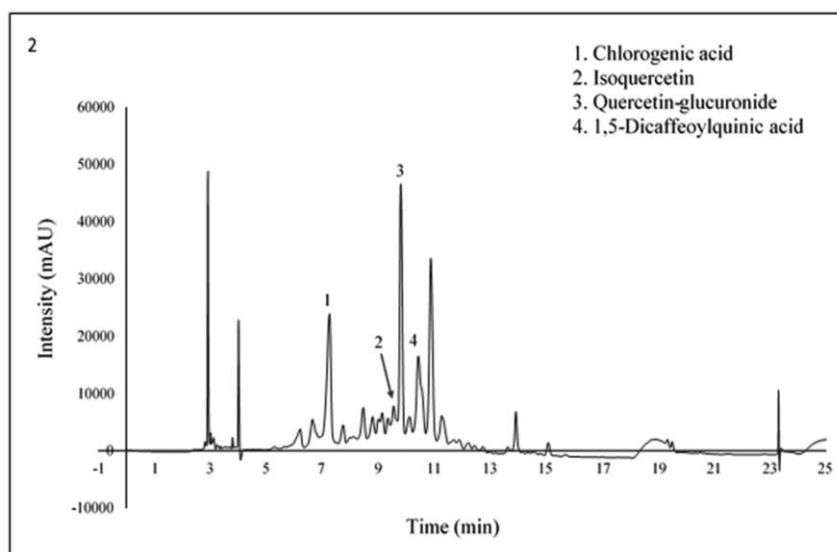


FIGURE 2 UV chromatogram of the 100–180 μm fraction of superfine fennel powders at 320 nm. The assignment of the peaks was confirmed by the retention times (t_R) of the corresponding external standard compounds

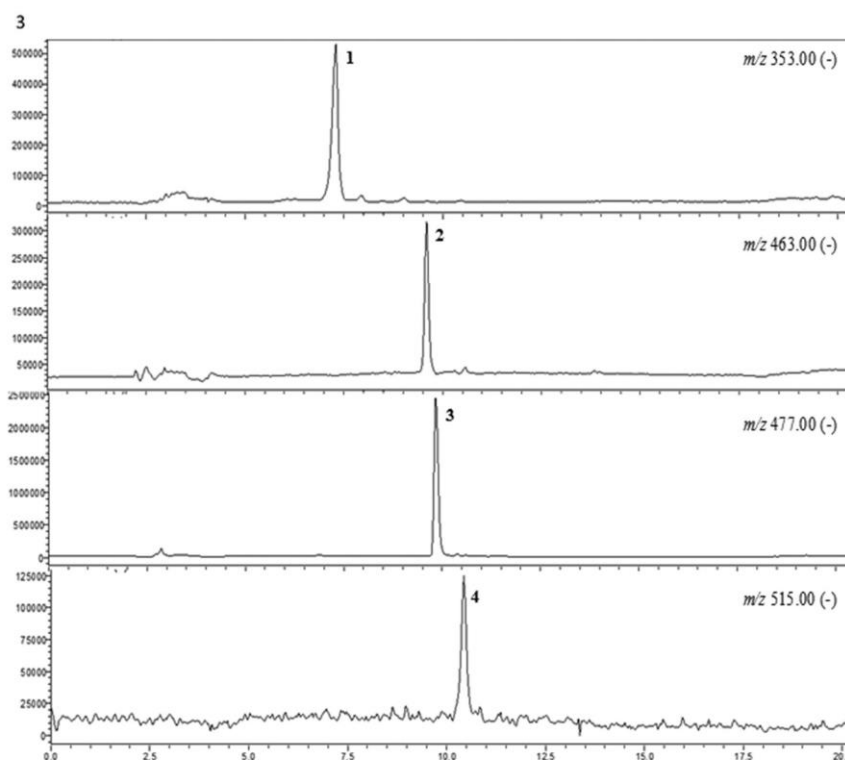


FIGURE 3 LC-ESI-MS extracted-ion chromatogram of the 100–180 μm fraction of superfine fennel powders. The assignment of the peaks was confirmed by the retention times (t_R) and m/z ratios of the corresponding external standard compounds. The characterised compounds were: 1, chlorogenic acid (m/z 353); 2, isoquercetin (m/z 463); 3, quercetin-glucuronide (m/z 477); 4, 1,5-dicaffeoylquinic acid (m/z 515)

55:45 (A:B) (linear gradient); 10–11 min from 55:45 to 40:60 (linear gradient); 11–15 min isocratic elution at 40:60; 15–15.50 min from 40:60 to 10:90 (linear gradient); 15.50–20 min isocratic elution at 10:90; 20–20.50 min from 10:90 to 90:10; 20.50–25 min isocratic elution at 90:10. For basil analyses, the following elution gradient was used: 0–15.50 min from 90:10 to 50:50 (linear gradient); 15.50–16 min from 50:50 to 10:90 (linear gradient); 16–20.50 min isocratic elution at 10:90; 20.50–21 min from 10:90 to 90:10; 21–25 min isocratic elution at 90:10. MS settings were as follow: 1.5 L/min nebulisation gas flow, 10 L/min drying gas flow, 250°C desolvation line temperature, 350°C source temperature, –4 kV probe voltage, negative electrospray mode. According to m/z ratios and the retention times of corresponding external standards, phenolic compounds were identified.

2.6.2 | Calibration method

For the determination of calibration curves, different solutions of standard compounds were prepared in 70/30 (v/v) methanol/water. The concentration of each phenolic compound was expressed as milligram of its standard per gram of dry weight. Quantification of standards was performed using the Selected Ion Monitoring (SIM) mode. The method sensitivity and linearity were assessed by determining the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), defined as the concentrations leading to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively.

2.7 | GC–MS

The essential oils were determined using a GCMS-QP2010 Model of GC–MS Shimadzu, equipped with a ZB-5MS (Phenomenex), of 30 m length, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μ m film thickness.

2.7.1 | Analytical conditions

Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature gradient was programmed at 60°C for 3 min, and then increase to 300°C at the rate of 10°C/min and kept there for 3 min (30 min in total). Injector and detector temperatures were 300°C and 200°C, respectively. The injected volume was 2 μ L and the injection was in split mode with a split ratio of 10:1. For GC–MS detection, electron ionisation (EI) was used with an energy of 70 eV. Under these conditions, the ionisation leads to the detection of M^{+} radical ions. The essential oils were identified thanks to the library provided with the control software (Mass Spectral Library NIST 11).

2.8 | Statistical analysis

AAs, TPC, TFC, phenolic compounds, and essential oils concentrations were each subjected to analysis of variance (ANOVA) to determine the occurrence of statistically significant differences ($P < 0.05$). Analyses were carried out in triplicate and the results were expressed as means $\pm$ standard deviations.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)

3.1.1 | TPC, TFC and AA analyses

TPC, TFC and AA of all granulometric classes and unsieved superfine powders are shown in Figure 1. The analyses showed that the 100–180 μ m fraction had the maximum TPC with 7.2 mg GAE/g

TABLE 1 Concentrations of characterised phenolic compounds in four granulometric classes and unsieved powders (UP) of fennel seeds

Compound (m/z)	Molecular family	t_R (min)	Concentrations (mg/g DW)				
			100–180 μ m	180–315 μ m	315–500 μ m	> 500 μ m	UP
Chlorogenic acid (353)	Phenolic acid	7.3	0.01 $\pm$ 0.01 ^a	0.02 $\pm$ 0.01 ^a	0.01 $\pm$ 0.01 ^a	0.01 $\pm$ 0.01 ^a	0.01 $\pm$ 0.01 ^a
Isoquercetin (463)	Flavonoid	9.5	0.48 $\pm$ 0.01^a	0.47 $\pm$ 0.01 ^a	0.35 $\pm$ 0.03 ^b	0.14 $\pm$ 0.02 ^c	0.31 $\pm$ 0.03 ^b
Quercetin-glucuronide (477)	Flavonoid	9.8	2.11 $\pm$ 0.01^a	1.92 $\pm$ 0.02 ^b	1.48 $\pm$ 0.02 ^c	0.59 $\pm$ 0.02 ^d	1.33 $\pm$ 0.01 ^e
1,5-Dicaffeoylquinic acid (515)	Phenolic acid	10.5	0.25 $\pm$ 0.01^a	0.23 $\pm$ 0.01 ^a	0.17 $\pm$ 0.01 ^b	0.07 $\pm$ 0.01 ^c	0.14 $\pm$ 0.03 ^b

In the same line, means $\pm$ standard deviations followed by the same subscripted letters were not statistically different ($P < 0.05$). The maximum concentration of each compound is indicated in bold.

TABLE 2 Concentrations of characterised terpenoids in four granulometric classes and unsieved powders (UP) of fennel seeds

Compound (M^{+})	Molecular family	t_R (min)	Concentrations (μ g/g DW)				UP
			100–180 μ m	180–315 μ m	315–500 μ m	> 500 μ m	
D-Limonene	Terpenoid	7.6	0.52 $\pm$ 0.01 ^a	3.19 $\pm$ 0.02 ^b	5.11 $\pm$ 0.03^c	4.61 $\pm$ 0.02 ^d	3.97 $\pm$ 0.01 ^e
Fenchone	Terpenoid	8.6	0.28 $\pm$ 0.01 ^a	0.84 $\pm$ 0.02 ^b	0.97 $\pm$ 0.01^c	0.73 $\pm$ 0.02 ^d	0.71 $\pm$ 0.01 ^d
Estragole	Terpenoid	10.4	11.71 $\pm$ 0.02 ^a	17.12 $\pm$ 0.01 ^b	17.91 $\pm$ 0.02^c	15.91 $\pm$ 0.01 ^d	14.91 $\pm$ 0.02 ^e
Anethole	Terpenoid	12.4	0.32 $\pm$ 0.01 ^a	0.52 $\pm$ 0.01 ^b	0.57 $\pm$ 0.02^c	0.48 $\pm$ 0.01 ^d	0.43 $\pm$ 0.02 ^e

In the same line, means $\pm$ standard deviations followed by the same subscripted letters were not statistically different ($P < 0.05$). The maximum concentration of each compound is indicated in bold.

DW. Powders with particle sizes greater than 500 μm had the lowest content of polyphenols with 2.4 mg GAE/g DW, which was 30% of the maximum value. Moreover, the best AA was obtained for the 100–180 μm fraction with 11.7 mg TE/g DW and the worst one

was for the > 500 μm fraction with 4.2 mg TE/g DW. Figure 1 shows that the AA does not directly correlate to TPC. This result indicates that other antioxidants such as vitamin C³⁷ have a role in AA, particularly for the smaller particles sizes.

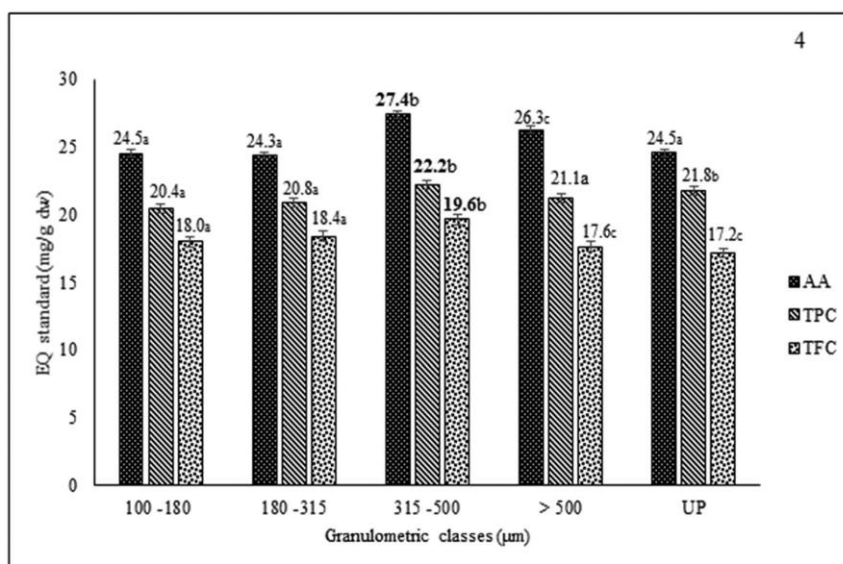


FIGURE 4 Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (AA) of the following granulometric classes of superfine basil powders: 100–180 μm , 180–315 μm , 315–500 μm , > 500 μm and unsieved powders (UP). All values were expressed as means $\pm$ standard deviations of triplicate measures. Bars topped by different letters in each analyse were statistically different ($P < 0.05$)

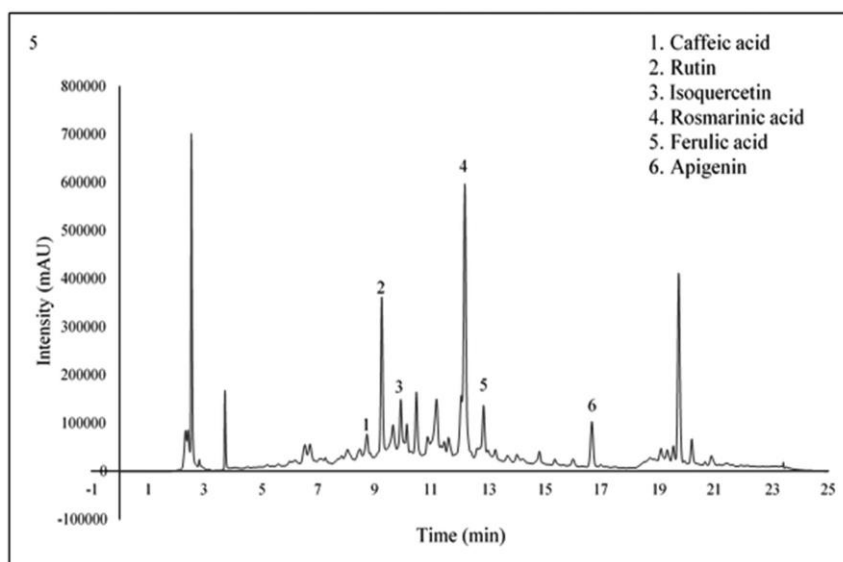


FIGURE 5 UV chromatogram of the 315–500 μm fraction of superfine basil powders at 320 nm. The assignment of the peaks was confirmed by the retention times (t_R) of the corresponding external standard compounds

3.1.2 | Identification and characterisation of phenolic compounds by LC-UV-ESI-MS

Some phenolic compounds were identified using HPLC-UV. In Figure 2, UV chromatogram of the 100–180 μm fraction at 320 nm, which revealed the best detection is shown. According to the retention times (t_R values) of corresponding external standards, two phenolic acids: chlorogenic acid at $t_R = 7.3$ min and 1,5-dicaffeoylquinic acid at $t_R = 10.5$ min and two flavonoids: isoquercetin at $t_R = 9.5$ min and quercetin-glucuronide at $t_R = 9.8$ min were identified. These phenolic compounds were characterised by their m/z ratios using LC-ESI-MS. The mass chromatogram of the 100–180 μm fraction is shown in Figure 3. The chromatogram showed the appearance of an intense signal for quercetin-glucuronide (m/z 477).

3.1.3 | Quantification of phenolic compounds by LC-ESI-MS

Using LC-ESI-MS, the concentrations of characterised phenolic compounds were measured and the results are reported in Table 1. The

dry fractionation between 100 μm and 180 μm makes it possible to obtain the best extraction of isoquercetin, quercetin-glucuronide and 1,5-dicaffeoylquinic acid. The maximum concentration belonged to quercetin-glucuronide with 2.11 mg/g DW in the 100–180 μm fraction. In the >500 μm fraction, only 30 to 35% of the maximum concentrations were collected.

3.1.4 | Quantification of essential oils by GC-MS

Using GC-MS, the concentrations of four terpenes were measured (Table 2). The results show that all terpenes: D-limonene at $t_R = 7.6$ min, fenchone at $t_R = 8.6$ min, estragole at $t_R = 10.4$ min, and anethole at $t_R = 12.4$ min were concentrated in the 315–500 μm fraction with 5.11, 0.97, 17.9 and 0.57 $\mu\text{g/g}$ DW, respectively. The maximum concentration belonged to estragole. By reducing the particle sizes lower than 315 μm , the concentration of these terpenoids would decrease.

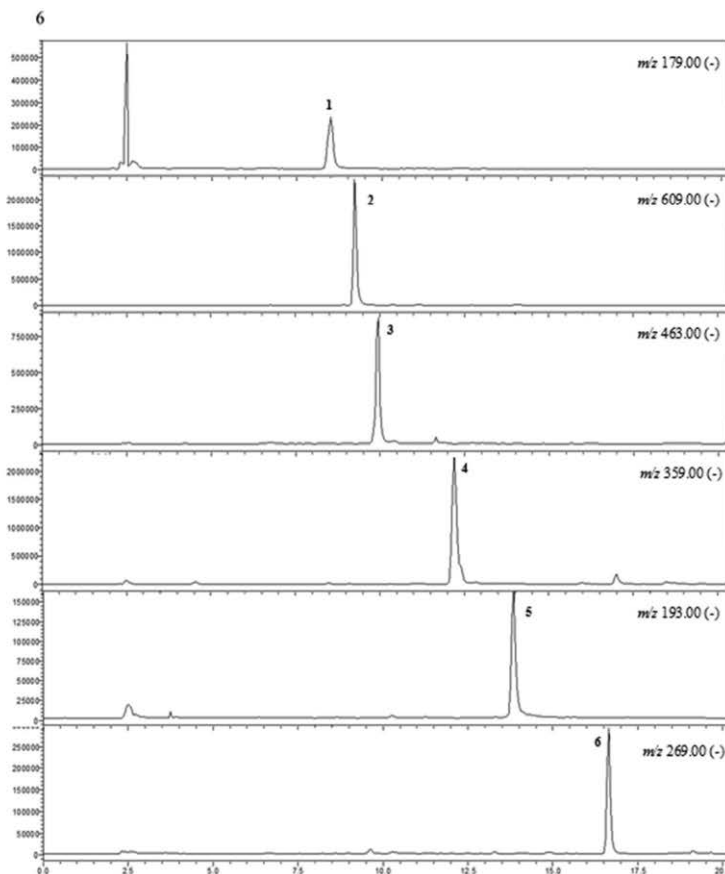


FIGURE 6 LC-ESI-MS extracted-ion chromatogram of the 315–500 μm fraction of superfine Basil powders. The assignment of the peaks was confirmed by the retention times (t_R) and m/z ratios of the corresponding external standard compounds. The characterised compounds were: 1, caffeic acid (m/z 179); 2, rutin (m/z 609); 3, isoquercetin (m/z 463); 4, rosmarinic acid (m/z 359); 5, ferulic acid (m/z 193); 6, apigenin (m/z 269)

3.2 | Basil (*Ocimum basilicum* L.)

3.2.1 | TPC, TFC and AA analyses

TPC, TFC and AA of all granulometric classes and unsieved superfine powders, are shown in Figure 4. The highest TPC corresponded to the 315–500 μm fraction with 22.25 mg GAE/g DW. Moreover, the maximum level of AA was obtained for the 315–500 μm fraction with 27.4 mg TE/g DW. The positive correlation between AA, TPC and TFC was revealed.

3.2.2 | Identification and characterisation of phenolic compounds by LC-UV-ESI-MS

Some phenolic compounds were identified using HPLC-UV. In Figure 5, UV chromatogram of the 315–500 μm fraction at 320 nm, which revealed the best detection is shown. According to the retention times of corresponding external standards, three phenolic acids: caffeic acid at $t_R = 8.5$ min, rosmarinic acid at $t_R = 12.3$ min, ferulic acid at $t_R = 13.8$ min and three flavonoids: rutin at $t_R = 9.2$ min, isoquercetin at $t_R = 9.9$ min and apigenin at $t_R = 16.6$ min were identified. These phenolic compounds were characterised by their m/z ratios using LC-ESI-MS. The mass chromatogram of the 315–500 μm fraction is shown in Figure 6. In Figure 6, for the profile of m/z ratio 179, the first peak is due to the rapid elution of polar hexoses, which are presented in the sample. These hexoses (glucose, fructose, etc.) have unfortunately the same molecular mass (180) as the caffeic acid, explaining why under SIM (–) investigation it appears in

first. However, the use of caffeic acid standard permit to characterise it by its retention time and its m/z ratio, without any ambiguity. The chromatogram showed the appearance of an intense signal for rosmarinic acid (m/z 359).

3.2.3 | Quantification of phenolic compounds by LC-ESI-MS

Using LC-ESI-MS, the concentrations of characterised phenolic compounds were measured and the results are reported in Table 3. The contents show that the rosmarinic acid is the major compound in basil leaves. The concentration of rutin, isoquercetin, ferulic acid were positively affected by CDS process and they were concentrated in the < 315 μm fractions with 6.28, 1.11 and 0.74 mg/g DW, respectively. In contrast, CDS had no significant effect on increasing the concentration of apigenin, caffeic acid and rosmarinic acid.

3.2.4 | Quantification of essential oils by GC-MS

Using GC-MS, the concentrations of four terpenes were measured (Table 4). The results show that all terpenes: eucalyptol at $t_R = 7.6$ min, linalool at $t_R = 8.8$ min, estragole at $t_R = 10.4$ min and eugenol at $t_R = 12.7$ min were concentrated in the 315–500 μm fraction with 1.08, 1.69, 1.2 and 1.18 $\mu\text{g/g}$ DW, respectively. Therefore, the ideal particle sizes to have the best extraction of these essential oils are between 315 and 500 μm . By reducing the particle sizes lower than 315 μm , the concentration of these terpenoids would decrease.

TABLE 3 Concentrations of characterised phenolic compounds in four granulometric classes and unsieved powders (UP) of basil leaves

Compound (m/z)	Molecular family	t_R (min)	Concentrations (mg/g DW)				
			100–180 μm	180–315 μm	315–500 μm	> 500 μm	UP
Caffeic acid (179)	Phenolic acid	8.5	0.22 $\pm$ 0.01 ^a	0.25 $\pm$ 0.01 ^b	0.26 $\pm$ 0.01^b	0.26 $\pm$ 0.01^b	0.26 $\pm$ 0.01^b
Rutin (609)	Flavonoid	9.2	3.99 $\pm$ 0.01 ^a	6.28 $\pm$ 0.02^b	5.28 $\pm$ 0.03 ^c	6.09 $\pm$ 0.01 ^d	5.76 $\pm$ 0.01 ^e
Isoquercetin (463)	Flavonoid	9.9	0.72 $\pm$ 0.01 ^a	1.11 $\pm$ 0.02^b	1.08 $\pm$ 0.01 ^c	1.01 $\pm$ 0.01 ^d	1.03 $\pm$ 0.03 ^d
Rosmarinic acid (359)	Phenolic acid	12.3	7.63 $\pm$ 0.01 ^a	8.09 $\pm$ 0.02 ^b	8.14 $\pm$ 0.01 ^c	8.69 $\pm$ 0.01 ^d	8.75 $\pm$ 0.01^e
Ferulic acid (193)	Phenolic acid	13.8	0.74 $\pm$ 0.01^a	0.61 $\pm$ 0.01 ^b	0.61 $\pm$ 0.01 ^b	0.60 $\pm$ 0.04 ^b	0.67 $\pm$ 0.02 ^c
Apigenin (269)	Flavonoid	16.6	0.06 $\pm$ 0.02^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^a	0.04 $\pm$ 0.03 ^a	0.04 $\pm$ 0.02 ^a	0.05 $\pm$ 0.01 ^a

In the same line, means $\pm$ standard deviations followed by the same subscripted letters were not statistically different ($P < 0.05$). The maximum concentration of each compound is indicated in bold.

TABLE 4 Concentrations of characterised terpenoids in four granulometric classes and unsieved powders (UP) of basil leaves

Compound (M^{+1})	Molecular family	t_R (min)	Concentrations ($\mu\text{g/g}$ DW)				UP
			100–180 μm	180–315 μm	315–500 μm	> 500 μm	
Eucalyptol	Terpenoid	7.6	0.63 $\pm$ 0.01 ^a	0.95 $\pm$ 0.03 ^b	1.08 $\pm$ 0.02^c	1.04 $\pm$ 0.01 ^d	0.91 $\pm$ 0.02 ^b
Linalool	Terpenoid	8.8	1.31 $\pm$ 0.02 ^a	1.58 $\pm$ 0.01 ^b	1.69 $\pm$ 0.03^c	1.61 $\pm$ 0.01 ^d	1.46 $\pm$ 0.01 ^e
Estragole	Terpenoid	10.4	0.85 $\pm$ 0.01 ^a	1.05 $\pm$ 0.01 ^b	1.22 $\pm$ 0.01^c	1.21 $\pm$ 0.02 ^c	1.01 $\pm$ 0.02 ^e
Eugenol	Terpenoid	12.7	0.97 $\pm$ 0.02 ^a	1.14 $\pm$ 0.01 ^b	1.18 $\pm$ 0.02^c	1.05 $\pm$ 0.03 ^d	0.98 $\pm$ 0.01 ^a

In the same line, means $\pm$ standard deviations followed by the same subscripted letters were not statistically different ($P < 0.05$). The maximum concentration of each compound is indicated in bold.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Bensina Natural Limited for financial support. In addition, thanks to the Lorraine region to support the Extrapole programme and AGRITECH for authorisation to carry out the work according to the CDS patent. The authors also wish to thank Dr Jeremy Petit and LiBio laboratory for their help during the preparation of the superfine powders.

ORCID

Ali Zaiter  <https://orcid.org/0000-0002-1048-5801>

REFERENCES

- Sharma PP, Mujumdar AM. Traditional knowledge on plants from Toranmal plateau of Maharashtra. *IJTK*. July. 2003;2(3):292-296.
- Kunwar RM, Mahat L, Acharya RP, Bussmann RW. Medicinal plants, traditional medicine, markets and management in far-west Nepal. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2013;9(1):24.
- Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmet Sci*. 1997;19(6):299-307.
- Aburjai T, Natsheh FM. Plants used in cosmetics. *Phytother Res*. 2003;17(9):987-1000.
- Wong SP, Leong LP, William Koh JH. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem*. 2006;99(4):775-783.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 2004;74(17):2157-2184.
- Ayoola GA, Coker HA, Adesegun SA, et al. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Trop J Pharm Res*. 2008;7:1019-1024.
- Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kerscher M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. 2015;37(5):455-464.
- Daferer DJ, Zlogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*. 2000;48(6):2576-2581.
- Čujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljaković D, Zdunić G, Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem*. 2016;194:135-142.
- Esclapez MD, García-Pérez JV, Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev*. 2011;3(2):108-120.
- Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr A*. 2004;1043(2):323-327.
- Zhu F, Du B, Xu B. Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less barley) grown in Qinghai-Tibet plateau, China. *J Cereal Sci*. 2015;65:43-47.
- Becker L, Zaiter A, Petit J, et al. Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* powders using successive grinding and sieving. *Ind Crop Prod*. 2016;87:116-123.
- Zaiter A, Becker L, Petit J, et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders. *Powder Technol*. 2016;301:649-656.
- Choi E-M, Hwang J-K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*. 2004;75(6):557-565.
- Goswami N, Chatterjee S. Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L. (carom) and *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) seed extracts. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-8.
- Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu Öİ. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Sci Technol*. 2003;36(2):263-271.
- Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(10):2458-2464.
- Rather MA, Dar BA, Sofi SN, Bhat BA, Qurishi MA. *Foeniculum vulgare*: a comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab J Chem*. 2016;9:S1574-S1583.
- Diao W-R, Hu Q-P, Zhang H, Xu J-G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*. 2014;35(1):109-116.
- Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr J*. 2009;24(4):170-176.
- Anwar F, Hussain AI, Sherazi STH, Bhangar MI. Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. *J Herbs Spices Med Plants*. 2009;15(2):187-202.
- Singh G, Maurya S, de Lampasona MP, Catalan C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*. 2006;17(9):745-752.
- El-Soud N, El-Laithy N, El-Saeed G, et al. Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats. *Maced J Med Sci*. 2011;4:139-146.
- Rasul A, Akhtar N, Khan BA, Mahmood T, Zaman SU, Khan HMS. Formulation development of a cream containing fennel extract: *in vivo* evaluation for anti-aging effects available online. <http://ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2012/00000067/00000001/art00008>. Accessed on 4 October 2018.
- de Almeida I, Alviano DS, Vieira DP, et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res*. 2007;101(2):443-452.
- Berić T, Nikolić B, Stanojević J, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):724-732.
- Adigüzel A, Güllüce M, Şengül M, Ögütçü H, Şahin F, Karaman İ. Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turk J Biol*. 2005;29:155-160.
- Dasgupta T, Rao AR, Yadava PK. Chemomodulatory efficacy of basil leaf (*Ocimum basilicum*) on drug metabolizing and antioxidant enzymes, and on carcinogen-induced skin and forestomach papillomagenesis. *Phytomedicine*. 2004;11(2-3):139-151.
- Kwee EM, Niemeyer ED. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chem*. 2011;128(4):1044-1050.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J Food Eng*. 2013;117(4):426-436.
- Muanda F, Koné D, Dicko A, Soulimani R, Younos C. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts available online. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/674320/>. Accessed on 29 May 2018.

34. Chen G, Chen H. Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. *Food Chem.* 2011;126(4):1934-1938.
35. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001;15(2):127-130.
36. van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999;66(4):511-517.
37. Salama ZA, El Baz FK, Gaafar AA, Zaki MF. Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *J Saudi Soc Agric Sci.* 2015;14(1):91-99.

How to cite this article: Mousavi M, Zaiter A, Becker L, Modarressi A, Baudelaire E, Dicko A. Optimisation of phytochemical characteristics and antioxidative properties of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds and *Ocimum basilicum* L. leaves superfine powders using new parting process. *Phytochemical Analysis.* 2019;1-10. <https://doi.org/10.1002/pca.2875>



The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders

Mahta Mousavi^a, Ali Zaiter^b, Ali Modarressi^a, Elie Baudelaire^b, Amadou Dicko^{a,*}

^a Université de Lorraine, LCP-A2MC (Laboratoire de Chimie et Physique - Approche Multi-échelles des milieux Complexes), 1, Boulevard Arago, Metz Cedex 03 57078, France

^b AGRITECH-France, 4, Rue Piroux, 54000 Nancy, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Polyphenols
Superfine powders
Antioxidant activity
LC-UV-ESI/MS

ABSTRACT

This study reveals the positive effect of a new process, consisting to grind and to sieve, on the improvement of the phytochemical properties of superfine powders of cherry (*Prunus avium* L.), peach (*Prunus persica* L.) and damson (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.). Four Granulometric classes: 180, 180–315, 315–500, > 500 µm and unsieved superfine powders were selected. Their antioxidant activities (AA) were evaluated using ABTS and DPPH assays. Phenolic compounds and malic acid were quantified using liquid chromatography coupled with UV detector and mass spectrometry (LC-UV-ESI/MS). The 180–315 µm fraction of cherry exhibited the highest AA: 59.4 and 149.8 mg trolox equivalent/g dry weight, using DPPH and ABTS, respectively. The > 500 µm fraction of peach and damson showed the best AA; in peach: 49.2 and 148.2 mg TE/g dw and in damson: 27.6 and 86.5 mg TE/g dw using DPPH and ABTS, respectively. In cherry and damson, the 180–315 µm fraction had maximum malic acid content: 4.57 and 3.85 mg/g dw, respectively. In peach, malic acid was concentrated in the > 500 µm fraction: 3.72 mg/g dw. Results showed that this new process improves the phytochemical properties of these fruits superfine powders, under specific particle sizes.

1. Introduction

Antioxidants act as free radical hunters, they inhibit or delay the oxidation of other molecules and they prevent and repair damage done by the free radicals in oxidant-antioxidant system [1]. One natural way of increasing the antioxidant intake in the human diet is consuming fruits as rich sources of antioxidants and the other way is enriching food with fruits antioxidants [2]. In food industry, fruit powders can be used as additives [3,4]. Certain fruits which are rich in the variety of antioxidants have pharmaceutical aspects and they can be used to protect against diseases, including cancer and cerebrovascular diseases [5,6]. Many researches focused on fruits which are rich sources of phenolic compounds such as chlorogenic acid, rutin, quercetin and (+)-catechin [7]. *Prunus* family exhibits high antioxidant activity [8,9] and the plums have high level of phenolic contents [10,11]. In addition, malic acid is a characteristic compound in many fruits including apple, pineapple and citron [12]. Malic acid is used extensively in the pharmaceutical industry and as a food additive. Researches show eating

foods with high malic acid content or supplementing with malic acid can help to reduce muscle pain and muscle soreness in people who suffer from fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome [13].

Current developments are focused on improving the extraction yields of bioactive compounds [14] using green methods such as ultrasound [15], microwaves [16] and superfine grinding process [17]. Recently, a new process (patent PCT/FR2011/000561), consisting of Comminution and to control Diffraction Sieving (CDS), has received increasing attention due to the raising desire to develop ecological extraction technologies of natural and active ingredients without any solvent [18,19]. For the first time, this paper validated the positive effect of CDS on the phytochemical properties of three fruits: cherry (*Prunus avium* L.), peach (*Prunus persica* L.) and damson (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) from Lorraine region in France. This study showed that, in specific particles sizes, the CDS increases the extraction yields of bioactive compounds from these superfine fruits powders, without any solvent.

* Corresponding author.

E-mail address: amadou.dicko@univ-lorraine.fr (A. Dicko).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103962>

Received 24 April 2019; Received in revised form 27 May 2019; Accepted 27 May 2019

Available online 29 May 2019

0026-265X/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

2. Materials and methods

2.1. Fruits and powders

Three fruits with the common names: cherry, peach and damson were collected from Lorraine region in France and provided by the VEGA FRUITS company. These superfine fruits powders were prepared using "Ultra Centrifugal Mill ZM 200" (Retsch, France) for grinding and "vibratory sieve shaker Analysette 3 Spartan" (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany) for sieving. They were purchased from Laboratory of Biomolecular Engineering (LJBio) of Lorraine University in France. The superfine powders were classified as follow: < 180 μm , 180–315 μm , 315–500 μm , > 500 μm and the unsieved superfine powders.

2.2. Chemicals

Folin-Ciocalteu reagent, chlorogenic acid, malic acid, isoquercetin, (+)-catechin, (–)-epicatechin, rutin, *p*-coumaroylquinic acid, procyanidin B2, gallic acid, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), HPLC-grade methanol, water, acetonitrile and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sodium nitrate (NaNO_3), sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride (AlCl_3) and sodium hydroxide (NaOH) were acquired from Acros Organics (Geel, Belgium).

2.3. Hydromethanolic extraction

The extraction of bioactive compounds from all fruits granulometric classes were carried out by hydromethanolic extraction [14] with slight modification. For this, 2 g of each fraction was macerated in 20 mL of 70% methanol for 24 h at room temperature with stirring (Fisherbrand Seastar digital orbital shaker) at 11000 rpm. The extract was filtered (filter paper: 10 to 20 μm) and it was stored in a sealed dark bottle at 4 °C until required.

2.4. UV-visible analyses

Colorimetric determination of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (AA) were performed by UV-Visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, California, USA). All values were expressed as means $\pm$ standard deviations of triplicate measures.

2.4.1. Total phenolic content (TPC)

Total phenolic content (TPC) was measured based on the method described by Muanda et al. [20] with slight modifications. Therefore, 100 μL of each fraction extract was added to a tube test containing 5 mL of distilled water, 500 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1 N) and 2 mL of Na_2CO_3 (7%). After 1 h of incubation at room temperature, the absorbance was recorded at 725 nm against the blank (methanol). Different gallic acid methanolic solutions with different concentrations (from 500 to 2500 ppm) were used to obtain a calibration curve. Total phenolic content was expressed as milligram gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/g dw).

2.4.2. Total flavonoid content (TFC)

Total flavonoid content (TFC) was measured based on the method described by Chen et al. [21] with some modifications. In brief, 100 μL of each fraction extract was added to a tube test containing 5 mL of distilled water and 300 μL NaNO_2 (5%). After 5 min, 300 μL AlCl_3 (10%) and 2 mL of NaOH (1 M) were added and the sample was thoroughly mixed. The absorbance was recorded at 510 nm against the blank (methanol). Different catechin methanolic solutions with

different concentrations (from 100 to 1000 ppm) were used to obtain a calibration curve. Total flavonoid content was expressed as milligram catechin equivalent per gram of dry weight (mg CE/g dw).

2.4.3. Antioxidant activity (AA), DPPH assay

Antioxidant activity (AA) was evaluated by DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) scavenging activity assay [22]. Briefly, 3 mL of DPPH methanolic solution (200 μM) was mixed with 100 μL of each fraction extract. The mixture was incubated in the dark for 30 min and then the absorbance was recorded at 518 nm. Different trolox methanolic solutions with different concentrations (from 100 to 1000 ppm) were used to obtain a calibration curve [23]. The AA was expressed in terms of milligram trolox equivalent per gram of dry weight (mg TE/g dw).

2.4.4. Antioxidant activity (AA), ABTS assay

Antioxidant activity (AA) was also evaluated by ABTS test [20] with small modifications. Briefly, NaOH (150 mM) was added to a solution containing KH_2PO_4 (100 mM) to receives in $\text{pH} = 7.4$ (buffer). Two different solutions consisting of AAPH (1 mM) and ABTS (2.5 mM) were separately prepared using buffer solution mentioned. They were mixed and incubated in the dark, at 68 °C for 20 min. The blue-green solution obtained ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) gives an absorbance of 0.65 ± 0.02 at 734 nm at ambient temperature. Then, 20 μL of the fraction extract was added to 3 mL of the $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min in the dark. The absorbance was recorded at 734 nm. Different trolox methanolic solutions with different concentrations (from 100 to 1000 ppm) were used to obtain a calibration curve and the AA expressed in terms of mg TE/g dw.

2.5. LC-UV-ESI/MS

The bioactive components were determined by Shimadzu LC-MS 2020 equipment, which contain an HPLC unit, coupled to an electrospray ionization source permitting the MS detection. The injection volume was 20 μL , the quaternary pump delivered a flow rate of 0.6 mL/min and the oven temperature was set at 30 °C. Separation was performed on C18 reverse phase Gemini column, having the following parameters: internal diameter 4.6 mm, length 150 mm, particle size 3 μm and pore size 130 Å. The two eluent solvents were water (A), acidified to 0.5% with formic acid, and acetonitrile (B). The 24 min used gradient was as follow: 0–15.50 min from 90:10 to 50:50 (A:B) (linear gradient); 15.50–16 min from 50:50 to 10:90 (A:B) (linear gradient); 16–20.50 min held at 10:90 (A:B); 20.50–21 min from 10:90 to 90:10 (A:B) (linear gradient); 21–24 min held at 90:10 (A:B) (re-equilibration). In mass detector, the nebulization gas flow was set at 1.5 L/min, drying gas flow was set at 10 L/min, the desolvation line temperature was set at 250 °C and the source temperature was set at 350 °C. The probe voltage was set at –4 kV and the electrospray ionization mode was in negative.

2.5.1. Calibration curve

Each bioactive compound was quantified based on a calibration curve of its corresponding external standard. The calibration curve was obtained by injection of the different concentrations (from 0.1 to 10 ppm 70% methanol) of the standard. Using the selected ion monitoring (SIM) mode, quantification of standards was performed. The linearity and sensitivity were evaluated by determining the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), defined as the concentration leading to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10 respectively.

2.5.2. Statistical analyses

All data were expressed as means $\pm$ standard deviations of triplicate measures. Statistical analyses (ANOVA) was conducted using SAS software (SAS Institute, NC, USA) with $p < 0.05$ as significance level.

3. Results and discussion

Identification of bioactive compounds was confirmed by retention times (t_R) of the corresponding external standard compounds, as well as the m/z ratios. Under the applied column and solvents gradients, malic acid, due to its polarity, was not retained in the column and it was eluted after 2.8 min. For all experiments, the mean value and standard deviation of triplicate measures were calculated.

3.1. Cherry

3.1.1. TPC, TFC and antioxidant activity (AA) analyses

The evolution of TPC, TFC and AA of four granulometric classes and unsieved superfine cherry powders were performed and the results are shown in Figs. S1 and S2. The 180–315 μm fraction had maximum values of TPC and TFC with 38.9 mg GAE/g dw and 24.3 mg CE/g dw, respectively (Fig. S1). This fraction also showed the best antioxidant activities: 59.4 mg TE/g dw using DPPH and 149.8 mg TE/g dw using ABTS (Fig. S2). These analyses show that CDS is a successful method to increase antioxidant activity of superfine cherry powders in the special particle sizes: 180–315 μm .

3.1.2. Identification and characterization of bioactive compounds by LC-UV-ESI/MS

Six phenolic compounds were identified in extract of superfine cherry powders using UV detector. The chromatogram profile of the 180–315 μm fraction is shown in Fig. 1 (this fraction exhibited the highest antioxidant activity). The best intensity was reached at 340 nm for phenolic compounds. Two phenolic acids: chlorogenic acid at $t_R = 5.7$ min and *p*-coumaroylquinic acid at $t_R = 7$ min were identified. In addition, one tannin: procyanidin B2 at $t_R = 7.4$ min and three flavonoids: (–)-epicatechin at $t_R = 8.2$ min, rutin at $t_R = 9.3$ min and isoquercetin at $t_R = 10$ min were identified.

The previously identified compounds were characterised by their m/z ratios using ESI/MS detector. The results are shown in Fig. 2. Note that under the same peak at 7 min, two compounds were coeluted: chlorogenic acid (m/z 353) and *p*-coumaroylquinic acid (m/z 337). However, their different m/z ratios permit to characterise each of them. Due to the absence of a chromophore group on malic acid, it is not detectable by means of a UV detector. Therefore, the ESI/MS detector has characterised malic acid.

3.1.3. Quantification of bioactive compounds by LC-ESI/MS

Using LC-ESI/MS, concentrations of malic acid and characterised phenolic compounds were calculated in all cherry fractions (Table 1). According to these results, the 180–315 μm fraction had the highest concentration of malic acid with 4.57 ± 0.04 mg/g dw. In addition, all identified phenolic compounds were concentrated in the 180–315 μm fraction and the best concentration in this fraction was belonged to *p*-coumaroylquinic acid with 4.56 ± 0.03 mg/g dw. These results indicate that CDS increase significantly the concentrations of bioactive compounds in the 180–315 μm fraction of cherry powders. During CDS process, the huge molecules such as carbohydrates and fibres remain in the large particles; so, by decreasing the particle size, carbohydrate contents decreased, whereas the contents of other compounds (lipids, proteins and polyphenols) increased. Therefore, the smaller granulometric classes revealed the higher concentration of bioactive compounds [19].

3.2. Peach

3.2.1. TPC, TFC and antioxidant activity (AA) analyses

The evolution of TPC, TFC and AA of all peach fractions were carried out and the results are collected in Table 2. These analyses show that the > 500 μm fraction had the highest levels of TPC and TFC: 27.68 mg GAE/g dw and 10.81 mg CE/g dw, respectively. This fraction also has the best antioxidant activities: 42.91 mg TE/g dw using DPPH and 148.21 mg TE/g dw using ABTS. These results prove that CDS is a beneficial procedure for increasing antioxidant activity of superfine peach powders particularly for particle sizes > 500 μm .

3.2.2. Identification and characterization of bioactive compounds by LC-UV-ESI/MS

Four polyphenols were identified in extract of superfine peach powders using UV detector. Fig. S3 shows the chromatogram profile of the > 500 μm fraction, which exhibits the highest antioxidant activity. The best intensity was reached at 340 nm for phenolic compounds. Chlorogenic acid at $t_R = 5.7$ min, isomer of chlorogenic acid (neo or crypto) at $t_R = 7$ min, rutin at $t_R = 9.3$ min and isoquercetin at $t_R = 10$ min were identified. Using ESI/MS detector, these polyphenols and malic acid (m/z 133) were characterised by their m/z ratios (Fig. S4).

3.2.3. Quantification of bioactive compounds by LC-ESI/MS

Concentrations of malic acid and characterised phenolic compounds

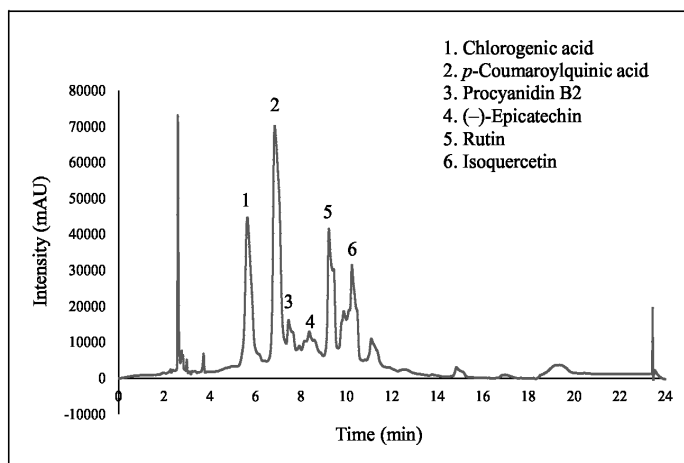


Fig. 1. LC-UV Chromatogram profile: fraction (180–315 μm) of superfine cherry powders.

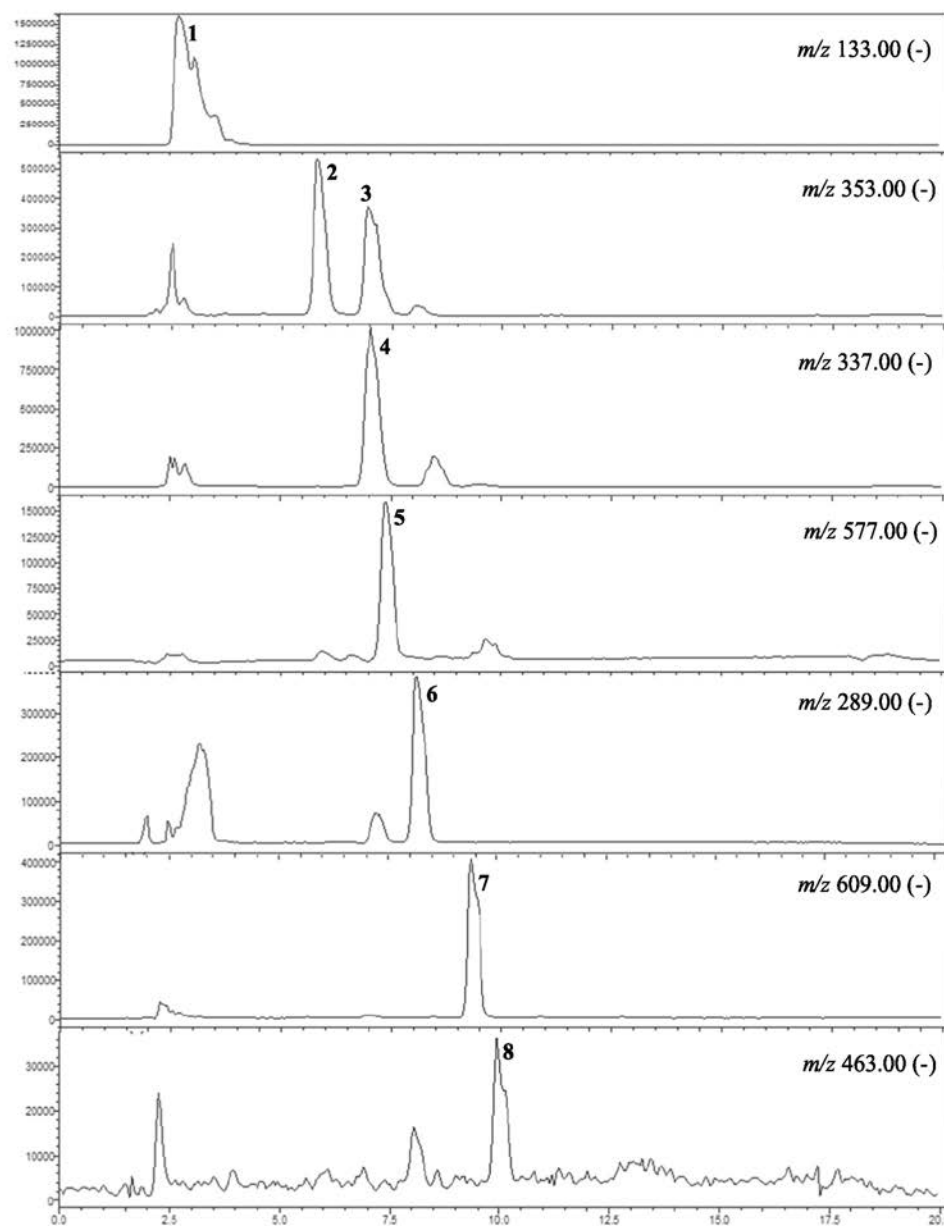


Fig. 2. LC-ESI/MS chromatogram profile: fraction (180–315 μm) of superfine cherry powders. 1. Malic acid (m/z 133), 2. Chlorogenic acid (m/z 353), 3. Chlorogenic acid-isomer (m/z 353), 4. p-Coumaroylquinic acid (m/z 337), 5. Procyanidin B2 (m/z 577), 6. (–)-Epicatechin (m/z 289), 7. Rutin (m/z 609) and 8. Isoquercetin (m/z 463).

were determined in all peach fractions (Table 3). According to these analyses, the concentrations of phenolic compounds were increased in the < 180 fraction and the highest one was obtained for isoquercetin with 3.43 ± 0.01 mg/g dw. However, malic acid was concentrated in the > 500 μm fraction with 3.72 ± 0.02 mg/g dw. The fact that the highest polyphenol concentrations were obtained from an optimal particle size range < 180 μm , confirms that CDS is an effective method to improve the extraction of phenolic compounds in the specific granulometric class of peach powders.

3.3. Damson

3.3.1. TPC, TFC and antioxidant activity (AA) analyses

TPC, TFC and AA of all damson fractions were evaluated and the results are shown in Table 4. The > 500 μm fraction had the highest values of TPC and TFC: 25.58 mg GAE/g dw and 12.96 mg CE/g dw, respectively. This fraction also exhibited the best antioxidant activities: 27.72 mg TE/g dw using DPPH and 86.51 mg TE/g dw using ABTS assay. These analyses show that CDS does not have a positive effect on the increase of the antioxidant activity in superfine damson powders with particle sizes < 500 μm .

Table 1

Concentrations of characterised bioactive compounds in all granulometric classes of superfine powders of cherry. Presented data are mean $\pm$ standard deviation of triplicate measures; in the same line, the mean values followed by the same superscript letters were not statistically different ($p < 0.05$). The bold numbers show the highest concentrations.

Compounds	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Concentration (mg/g dw)				
			< 180 μ m	180–315 μ m	315–500 μ m	> 500 μ m	Unsieved powders
Malic acid	133	2.8	4.08 $\pm$ 0.01 ^a	4.57 $\pm$ 0.04^b	4.19 $\pm$ 0.01 ^c	4.49 $\pm$ 0.03 ^d	4.45 $\pm$ 0.02 ^d
Chlorogenic acid	353	5.7	1.61 $\pm$ 0.01 ^a	1.92 $\pm$ 0.01^b	1.73 $\pm$ 0.02 ^c	1.73 $\pm$ 0.04 ^c	1.81 $\pm$ 0.03 ^d
Chlorogenic acid-isomer	353	7	0.83 $\pm$ 0.02 ^a	1.21 $\pm$ 0.02^b	0.74 $\pm$ 0.01 ^c	0.71 $\pm$ 0.04 ^c	0.92 $\pm$ 0.03 ^d
<i>p</i> -Coumaroylquinic acid	337	7	4.07 $\pm$ 0.01 ^a	4.56 $\pm$ 0.03^b	4.38 $\pm$ 0.01 ^c	4.41 $\pm$ 0.01 ^d	4.48 $\pm$ 0.01 ^e
Procyanidin B2	577	7.4	0.67 $\pm$ 0.04 ^a	0.72 $\pm$ 0.01^b	0.64 $\pm$ 0.02 ^a	0.63 $\pm$ 0.02 ^a	0.71 $\pm$ 0.03 ^b
(–)-Epicatechin	289	8.2	0.72 $\pm$ 0.02 ^a	0.83 $\pm$ 0.01^b	0.76 $\pm$ 0.01 ^c	0.71 $\pm$ 0.02 ^a	0.81 $\pm$ 0.02 ^b
Rutin	609	9.3	0.49 $\pm$ 0.01 ^a	0.71 $\pm$ 0.02^b	0.53 $\pm$ 0.01 ^c	0.51 $\pm$ 0.01 ^a	0.54 $\pm$ 0.01 ^c
Isoquercetin	463	10	0.09 $\pm$ 0.01 ^a	0.27 $\pm$ 0.01^b	0.11 $\pm$ 0.02 ^a	0.11 $\pm$ 0.04 ^a	0.11 $\pm$ 0.01 ^a

Table 2

Antioxidant activities using DPPH and ABTS assays, total polyphenol and flavonoid contents (TPC and TFC) in all granulometric classes of superfine powders of peach. Presented data are mean $\pm$ standard deviation of triplicate measures; in the same column, the mean values followed by the same superscript letters were not statistically different. The bold numbers show the highest levels.

Particle sizes (μ m)	TPC (mg GAE/g dw)	TFC (mg CE/g dw)	Antioxidant activities	
			DPPH (mg TE/g dw)	ABTS (mg TE/g dw)
< 180	24.18 $\pm$ 0.34 ^a	9.87 $\pm$ 0.42 ^a	42.32 $\pm$ 0.14 ^a	134.51 $\pm$ 0.15 ^a
180–315	19.64 $\pm$ 0.09 ^b	8.01 $\pm$ 0.28 ^b	40.56 $\pm$ 0.18 ^b	104.82 $\pm$ 0.04 ^b
315–500	21.41 $\pm$ 0.61 ^c	7.62 $\pm$ 0.15 ^c	40.63 $\pm$ 0.07 ^c	109.71 $\pm$ 0.01 ^c
> 500	27.68 $\pm$ 0.52^d	10.81 $\pm$ 0.71^d	42.91 $\pm$ 0.02^d	148.21 $\pm$ 0.31^d
Unsieved powders	18.11 $\pm$ 0.11 ^e	8.21 $\pm$ 0.22 ^b	38.55 $\pm$ 0.03 ^e	130.83 $\pm$ 0.02 ^e

Table 3

Concentrations of characterised bioactive compounds in all granulometric classes of superfine powders of peach. Presented data are mean $\pm$ standard deviation of triplicate measures; in the same line, the mean values followed by the same superscript letters were not statistically different ($p < 0.05$). The bold numbers show the highest concentrations.

Compounds	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min)	Concentration (mg/g dw)				
			< 180 μ m	180–315 μ m	315–500 μ m	> 500 μ m	Unsieved powders
Malic acid	133	2.8	3.30 $\pm$ 0.03 ^a	3.40 $\pm$ 0.02 ^b	3.12 $\pm$ 0.03 ^c	3.72 $\pm$ 0.02^d	3.55 $\pm$ 0.01 ^e
Chlorogenic acid	353	5.7	0.26 $\pm$ 0.01 ^a	0.20 $\pm$ 0.02 ^b	0.21 $\pm$ 0.02 ^b	0.23 $\pm$ 0.01 ^b	0.21 $\pm$ 0.02 ^b
Chlorogenic acid-isomer	353	7	1.40 $\pm$ 0.02^a	1.23 $\pm$ 0.02 ^b	1.12 $\pm$ 0.01 ^c	1.23 $\pm$ 0.04 ^b	1.17 $\pm$ 0.04 ^b
Rutin	609	9.3	0.63 $\pm$ 0.01^a	0.56 $\pm$ 0.02 ^b	0.56 $\pm$ 0.03 ^b	0.47 $\pm$ 0.03 ^c	0.53 $\pm$ 0.01 ^b
Isoquercetin	463	10	3.43 $\pm$ 0.01^a	3.08 $\pm$ 0.01 ^b	3.05 $\pm$ 0.04 ^b	2.61 $\pm$ 0.02 ^c	3.11 $\pm$ 0.01 ^d

Table 4

Antioxidant activities using ABTS and DPPH assays, total polyphenol and flavonoid contents (TPC and TFC) in all granulometric classes of superfine powders of damson. Presented data are mean $\pm$ standard deviation of triplicate measures; in the same column, the mean values followed by the same superscript letters were not statistically different. The bold numbers show the highest levels.

Particle sizes (μ m)	TPC (mg GAE/g dw)	TFC (mg CE/g dw)	Antioxidant activities	
			DPPH (mg TE/g dw)	ABTS (mg TE/g dw)
< 180	20.96 $\pm$ 0.51 ^a	9.46 $\pm$ 0.32 ^a	25.27 $\pm$ 0.85 ^a	79.58 $\pm$ 0.05 ^a
180–315	20.75 $\pm$ 0.12 ^a	8.86 $\pm$ 0.35 ^a	24.39 $\pm$ 0.06 ^b	64.89 $\pm$ 0.17 ^b
315–500	18.82 $\pm$ 0.05 ^b	7.61 $\pm$ 0.15 ^b	23.09 $\pm$ 0.62 ^c	58.85 $\pm$ 0.36 ^c
> 500	25.58 $\pm$ 0.38^c	12.96 $\pm$ 0.28^c	27.72 $\pm$ 0.07^d	86.51 $\pm$ 0.09^d
Unsieved powders	21.15 $\pm$ 0.11 ^a	9.02 $\pm$ 0.56 ^a	26.47 $\pm$ 0.19 ^e	81.14 $\pm$ 0.04 ^e

3.3.2. Identification and characterization of phenolic compounds by LC-UV-ESI/MS

Three polyphenols were identified in extract of superfine damson powders using UV detector. Chromatogram profile of the > 500 fraction, at 340 nm, is shown in Fig. S5. The peaks corresponding to chlorogenic acid with *t_R* = 5.7 min, (+)-catechin with *t_R* = 7.2 min and rutin with *t_R* = 9.3 min were identified. These phenolic compounds and malic acid (*m/z* 133) were characterised by ESI/MS detector (Fig. S6).

The ratio *m/z* 289 corresponds to two peaks having different retention times; the first is (+)-catechin with *t_R* = 7.2 min and the last is (–)-epicatechin with *t_R* = 10 min.

3.3.3. Quantification of bioactive compounds by LC-ESI/MS

Concentrations of malic acid and characterised phenolic compounds were calculated in all damson fractions (Table 5). Malic acid was concentrated in the 180–315 μ m fraction with 3.85 $\pm$ 0.01 mg/g dw.

Table 5

Concentration of characterised bioactive compounds in all granulometric classes of superfine powders of damson. Presented data are mean $\pm$ standard deviation of triplicate measures; in the same line, the mean values followed by the same superscript letters were not statistically different ($p < 0.05$). The bold numbers show the highest concentrations.

Compounds	m/z	t_R (min)	Concentration (mg/g dw)				
			< 180 μm	180–315 μm	315–500 μm	> 500 μm	Unsieved powders
Malic acid	133	2.8	3.71 $\pm$ 0.01 ^a	3.85 $\pm$ 0.01^b	3.71 $\pm$ 0.01 ^a	3.35 $\pm$ 0.01 ^c	3.37 $\pm$ 0.02 ^c
Chlorogenic acid	353	5.7	2.67 $\pm$ 0.04^a	2.41 $\pm$ 0.01 ^b	2.33 $\pm$ 0.01 ^c	2.42 $\pm$ 0.03 ^b	2.15 $\pm$ 0.02 ^d
(+)-Catechin	289	7.2	0.02 $\pm$ 0.02 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.06 $\pm$ 0.01 ^b	0.03 $\pm$ 0.01 ^a
Rutin	609	9.3	0.35 $\pm$ 0.01^a	0.23 $\pm$ 0.03 ^b	0.25 $\pm$ 0.01 ^b	0.17 $\pm$ 0.01 ^c	0.21 $\pm$ 0.02 ^b
(–)-Epicatechin	289	10	0.02 $\pm$ 0.01 ^a	0.02 $\pm$ 0.01 ^a	0.02 $\pm$ 0.02 ^a	0.04 $\pm$ 0.02 ^b	0.02 $\pm$ 0.03 ^a

Chlorogenic acid with 2.67 ± 0.04 mg/g dw and rutin with 0.35 ± 0.01 mg/g dw were concentrated in the < 180 μm fraction. According to these results, the CDS is a successful method to concentrate the three mentioned compounds in the superfine damson powders with particle sizes < 315 μm .

4. Conclusion

The purpose of this study was to validate the positive effect of a new grinding and sieving process, CDS, on improving the phytochemical properties of cherry (*Prunus avium* L.), peach (*Prunus persica* L.) and damson (*Prunus domestica* subsp. *insititia* L.) superfine powders in the specific particle sizes. In superfine cherry powders, highest level of antioxidant activity, highest concentrations of malic acid and characterised phenolic compounds were obtained for the 180–315 μm fraction. In superfine peach and damson powders, the > 500 μm fraction presented the best antioxidant activity. The peach analyses showed that the > 500 μm fraction had highest concentration of malic acid; however, the maximum concentrations of chlorogenic acid, chlorogenic acid isomer, rutin and isoquercetin were obtained in the < 180 μm fraction. Based on the analyses of superfine damson powders, the concentrations of malic acid, chlorogenic acid and rutin reached their maximum levels in the fractions with particle sizes < 315 μm . In conclusion, all these results prove the interest of CDS as a new green successful method to concentrate the bioactive compounds, without any solvent, according to the distribution of the particle sizes of these superfine fruits powders.

Acknowledgements

The authors thank “BENSINA NATURAL LIMITED” company for financial support. In addition, thanks to the Lorraine region to support the Extrapolé program and AGRITECH for authorization to carry out the work according to the CDS patent. The authors also wish to thank Dr. Jeremy Petit and LiBio laboratory for their helps for preparation the superfine powders.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103962>.

References

- [1] Y.S. Veloglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4113–4117, <https://doi.org/10.1021/jf9801973>.
- [2] Y.-Y. Soong, P.J. Barlow, Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds, *Food Chem.* 88 (2004) 411–417, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>.
- [3] H. Palafox-Carlos, J.F. Ayala-Zavala, G.A. González-Aguilar, The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants, *J. Food Sci.* 76 (2011) R6–R15, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>.
- [4] V. Lavelli, S. Hippeli, K. Dornisch, C. Peri, E.F. Elstner, Properties of tomato powders as additives for food fortification and stabilization, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2037–2042.
- [5] H. Wang, G. Cao, R.L. Prior, Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 701–705, <https://doi.org/10.1021/jf950579y>.
- [6] F.I. Kanaze, C. Gabrieli, E. Kokkalou, M. Georgarakis, I. Niopas, Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 243–249, [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00289-9).
- [7] L.G. Malta, E.P. Tessaro, M. Eberlin, G.M. Pastore, R.H. Liu, Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits, *Food Res. Int.* 53 (2013) 417–425, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.024>.
- [8] V. Usenik, J. Fabčić, F. Stampar, Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Food Chem., Food Chem.* 107 (2008) 185–192, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.004>.
- [9] M. Vizotto, M. do C.B. Raseira, M.C. Pereira, M. da R. Fetter, Phenolic content and antioxidant activity of different genotypes of blackberry (*Rubus* sp.), *Rev. Bras. Frutic.* 34 (2012) 853–858, <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000300027>.
- [10] S. Cosmulescu, I. Trandafir, V. Nour, M. Botu, Total phenolic, flavonoid distribution and antioxidant capacity in skin, pulp and fruit extracts of plum cultivars, *J. Food Biochem.* 39 (2015) 64–69, <https://doi.org/10.1111/jfbc.12112>.
- [11] R. Jaiswal, H. Karaköse, S. Rühmann, K. Goldner, M. Neumüller, D. Treutter, N. Kuhnert, Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 12020–12031, <https://doi.org/10.1021/jf402288j>.
- [12] S. Cunha, J. Fernandes, I.M. Ferreira, HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars, *Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 67–71, <https://doi.org/10.1007/s002170100412>.
- [13] G.E. Abraham, J.D. Flechas, Management of fibromyalgia: rationale for the use of magnesium and malic acid, *J. Nutr. Med.* 3 (1992) 49–59, <https://doi.org/10.3109/13590849208997961>.
- [14] N. Čujić, K. Šavikin, T. Janković, D. Pljevljaković, G. Zdunić, S. Ibrić, Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique, *Food Chem.* 194 (2016) 135–142, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>.
- [15] M.D. Escalapez, J.V. García-Pérez, A. Mulet, J.A. Cárcel, Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Eng. Rev.* 3 (2011) 108, <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>.
- [16] M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 323–327, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>.
- [17] F. Zhu, B. Du, B. Xu, Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less barley) grown in Qinghai-Tibet Plateau, China, *J. Cereal Sci.* 65 (2015) 43–47, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.006>.
- [18] A. Zaiter, L. Becker, M.-C. Karam, A. Dicko, Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders, *J. Food Sci. Technol.* 53 (2016) 2025–2032, <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2201-4>.
- [19] L. Becker, A. Zaiter, J. Petit, D. Zimmer, M.-C. Karam, E. Baudelaire, J. Scher, A. Dicko, Improvement of antioxidant activity and polyphenol content of Hypericum perforatum and Achillea millefolium powders using successive grinding and sieving, *Ind. Crop. Prod.* 87 (2016) 116–123, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.036>.
- [20] F. Muanda, D. Koné, A. Dicko, R. Soulimani, C. Younos, Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2011), <https://doi.org/10.1093/ecam/nep109>.
- [21] G. Chen, H. Chen, Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion, *Food Chem.* 126 (2011) 1934–1938, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.025>.
- [22] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* 15 (2001) 127–130, <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- [23] R. van den Berg, G.R.M.M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chem.* 66 (1999) 511–517, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00089-8).

RÉSUMÉ

Cette étude se déroule en deux parties, la première partie est consacrée à la mise en place d'une méthodologie dans le but d'isoler les métabolites secondaires. La seconde partie décrit les propriétés phytochimiques de poudres issues de matrices végétales en fonction de leur granulométrie.

Dans la première partie, qui est consacrée à l'isolement de métabolites secondaires par HPLC semi-préparative, la mise en place du processus d'isolement de l'hédéracose C et l' α -hédérine, a été effectuée à partir d'extraits de parties aériennes du lierre (*Hedera helix* L.). La généralisation de ce processus d'isolement appliqué aux extraits de parties aériennes du millepertuis (*Hypericum perforatum* L.) a permis d'isoler avec succès un hypéroside qui est un des flavonoïdes marqueur du millepertuis.

Le but de cette deuxième partie est dans un premier temps, de valider le procédé de broyage et de tamisage du matériel végétal : PTC « Pulvérisation & Tamisage différentiel Contrôlés » à l'échelle industrielle pour la production de différentes classes granulométriques des poudres. A cet effet, les résultats d'analyses phytochimiques de classes granulométriques de neuf plantes de la Région Lorraine obtenues par PTC à l'aide d'un pilote industriel sont comparés à ceux obtenus à l'échelle du laboratoire. Les plantes sélectionnées sont : le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le saule blanc (*Salix alba* L.), le millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), l'ortie (*Urtica dioica* L.), la solidage (*Solidago virgaurea* L.), la piloselle (*Hieracium pilosella* Vaill.), le rosier des chiens (*Rosa canina* L.), la griffe du diable (*Harpagophytum* DC.) et le lierre (*Hedera helix* L.). L'évaluation de l'activité antioxydante ainsi que les analyses effectuées par LC-MS indiquent que la production des poudres à l'échelle du laboratoire est généralisable à l'échelle industrielle.

Par ailleurs, pour la première fois, l'application à quatre fruits : la cerise (*Prunus avium* L.), la pêche (*Prunus persica* L.), la quetsche (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) et la mirabelle (*Prunus domestica* subsp. *Syriaca*) de la Région Lorraine du procédé PTC à l'échelle du laboratoire montre que l'extraction par voie sèche est une nouvelle méthode pour enrichir certaines classes granulométriques en composés bioactifs.

ABSTRACT

This study is divided into two parts, the first one is devoted to the implementation of a methodology to isolate secondary metabolites. The second describes the phytochemical properties of powders of vegetal material according to their particle size.

In the first part, which is dedicated to the isolation of secondary metabolites by semi-preparative HPLC, setting up the isolation process for hederacoside C and α -hederin was performed using extracts of aerial parts of ivy (*Hedera helix* L.). The generalization of this isolation process applied to the extracts of aerial parts of st. john's wort (*Hypericum perforatum* L.) lead to successful isolation the hyperoside, which is one of the characteristic flavonoids of st. john's wort.

The purpose of this second part is to validate the process of grinding and sieving plant material: CDS « Comminution and to control Diffraction Sieving » under industrial scale to product different granulometric classes of powders.

For this purpose, the results of phytochemical analyses of granulometric classes of nine plants from the Lorraine Region obtained by CDS using an industrial pilot are compared with those obtained under laboratory scale. Selected plants are fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), white willow (*Salix alba* L.), st. john's wort (*Hypericum perforatum* L.), nettle (*Urtica dioica* L.), goldenrod (*Solidago virgaurea* L.), pilosella (*Hieracium Pilosella* Vaill.), dog rose (*Rosa canina* L.), devil's claw (*Harpagophytum* DC.) and ivy (*Hedera helix* L.). The evaluation of the antioxidant activity, as well as the analyses carried out by LC-MS, indicate that the production of powders under laboratory scale is generalizable to industrial scale.

In addition, for the first time, the application of the CDS process under laboratory scale for four fruits: cherry (*Prunus avium* L.), peach (*Prunus persica* L.), damson (*Prunus domestica* subsp. *Insititia* L.) and mirabelle (*Prunus domestica*. subsp. *Syriaca*) from Lorraine Region shows that CDS is a new dry extraction method to enhance bioactive compound concentrations in particular granulometric classes.