



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LAVIE



## THESE

Présentée à

L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Spécialité : Nutrition et santé

Pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR EN SCIENCES**

De l'université de Mostaganem

Par

**Kheira ZERROUKI**

# Profil phénolique de quelques ressources végétales et pouvoir antioxydant

*Soutenu le 24 / 06 / 2020 devant le jury d'examen composé de :*

<b>Président :</b>	Pr Halbouche Miloud	Université de Mostaganem
<b>Examineurs :</b>	Pr Benali Mohamed	Université de Sidi-Bel-Abbes
	Pr Krouf Djamil	Université d'Oran 1
	Pr Boualga Ahmed	Université d'Oran 1
	Dr Boufadi Mokhtaria Yasmina (MCA)	Université de Mostaganem
<b>Directeur de thèse:</b>	Pr Riazi Ali	Université de Mostaganem

**Année Universitaire : 2019/2020**

## ***Avant propos***

*Le présent travail a été initié au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem sous la direction scientifique du Pr. A. RIAZI en partenariat avec les laboratoires suivants :*

*- Génie des procédés du centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) de l'université de Liège (Gembloux Agrobiotech) en Belgique sous la direction du professeur Philippe THONART.*

*- des Biomarqueurs et Nutri Metabolomics du département de la nutrition et des sciences de l'alimentation à la faculté de pharmacie, université de Barcelone (Espagne) supervisé par la professeure Cristina Andres-Lacueva.*

*- de Biologie moléculaire et génie biochimique (Biologia Molecular e Ingenieria Bioquimica) au département de nutrition et bromatologie de l'université Pablo de Olavide à Seville en Espagne, sous la direction scientifique du professeur Martin Bermudo Francisco Manuel.*

*Tout d'abord, je tiens à présenter ma gratitude, ma reconnaissance et mes vifs remerciements au Pr. A. Riazi de l'université de Mostaganem pour ses conseils et directives constructives, pour les enseignements pédagogiques ainsi que l'encadrement scientifique de mes trois formations (Ingénieur, Magister et Doctorat). Je le remercie pour sa rigueur au travail, chose que j'ai appris à transmettre à mes étudiants aussi.*

*Mes sincères remerciements vont également à :*

*Mr Miloud HALBOUCHE, professeur à l'université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je lui adresse mon profond respect et vifs remerciements.*

*Mr Mohammed BENALI, professeur à l'université de Sid-Bel-Abbes pour avoir accepté d'examiner et de valoriser ce travail par ses critiques constructives et pertinentes. Qu'il trouve ici mes vifs remerciements.*

*Mr Krouf Djamil, professeur à l'université d'Oran1 de nous avoir honoré de faire partie de ce jury.*

*Mr Boualga Ahmed, professeur à l'université d'Oran I, je lui adresse mes remerciements les plus sincères d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*M<sup>elle</sup> Boufadi Mokhtaria Yasmina, maître de conférences de classe A à l'université de Mostaganem, d'être parmi le jury de cette thèse.*

*Je remercie sincèrement le professeur Philippe THONART et son assistante professeure Jackeline DESTAIN de l'unité CWBI (Centre Wallon de Biologie Industrielle) de l'Université de Liège (Gembloux Agrobiotech) en Belgique pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et m'avoir permis d'effectuer les dosages des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante des trois variétés de dattes algériennes, ainsi que l'identification chromatographique par HPLC des principaux composés phénoliques présents.*

*Je tiens à remercier Cristina Andres-Lacueva, professeure au département de nutrition et des sciences alimentaires de la faculté de pharmacie à l'université de Barcelone (Espagne), où j'ai effectué le dosage des polyphénols.*

*Mes vifs remerciements vont également au professeur Franz Martin du département de nutrition et bromatologie à l'université de Seville (Espagne), pour la détermination de l'activité antioxydante par l'ORAC-FL et la fermentation du jus d'orange.*

*Je remercie également le Dr. Olivier Debauche et son épouse de la faculté agronomique de Gembloux (université de Liège), pour leur aide et présence durant mon séjour scientifique en Belgique.*

*Je tiens à remercier Mr Chouieb Mohamed, professeur au département d'agronomie à l'université de Mostaganem pour son aide concernant le traitement statistique des résultats.*

*Enfin, mes remerciements s'adressent aussi à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**Mostaganem, Octobre 2019**

## Liste des abréviations

<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SOD</b>	Superoxyde Dismutase
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GR</b>	Gluttathion Réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>PPO</b>	Polyphénol oxydase
<b>GN</b>	Garnatxa Negra
<b>CS</b>	Cabernet Sauvignon
<b>MT</b>	Merlot
<b>CH</b>	Chardonnay
<b>BHT</b>	Buthyl HydroxyToluène
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>GAE</b>	Gallic Acid Equivalent
<b>QE</b>	Quercétine Equivalent
<b>AFE</b>	Acide FéruliqueEquivalent
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-picrylhydrazyl
<b>ORAC-FL</b>	Oxygen Radical Antioxidant Capacity-Fluorescein
<b>ANOVA</b>	Analysis Of Variance
<b>TE/g</b>	Trolox Equivalent/ gramme
<b>mUA</b>	Milliunités d'absorption

## Liste des figures

	<b><u>Chapitre I: Les antioxydants</u></b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b>	Localisation de la production intracellulaire des espèces réactives oxygénées (ROS) (Machlin et al., 1987).	<b>04</b>
<b>Figure 2 :</b>	Les principaux acides phénoliques (Ribereau-Gayon, 1980).	<b>10</b>
<b>Figure 3 :</b>	L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (Ribereau -Gayon, 1980).	<b>12</b>
<b>Figure 4 :</b>	Exemples des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (Hakala et al., 2002)	<b>13</b>
	<b><u>Chapitre II: Matériels et méthodes</u></b>	<b>20</b>
<b>Figure 5 :</b>	Microplaque Oasis <sup>®</sup> MAX 96-Well plate cartidges (Ref.269620)	<b>21</b>
<b>Figure 6 :</b>	Extraction des polyphénols totaux de différentes parties de l'olivier (pulpe, noyau et feuille) (méthode de Singleton et Rossi, 1965 modifiée par Lafka et al. 2013).	<b>24</b>
<b>Figure 7 :</b>	Protocole de dosage des polyphénols totaux dans les échantillons datte, olivier et orange (Medina Remon et al., 2009).	
	<b><u>Chapitre III: Résultats et discussions</u></b>	<b>34</b>
<b>Figure 8 :</b>	Polyphénols totaux de peau de raisins rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais des raisins rouges et blancs.	<b>34</b>
<b>Figure 9 :</b>	Polyphénols totaux de pulpe de raisins rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais de pulpe	
<b>Figure10:</b>	Polyphénols totaux de pépin de raisins rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais de pépins.	<b>35</b>

<b>Figure11:</b>	Polyphénols totaux extraits à l'acétate d'éthyle (mg GAE/100 g de poids frais) de pulpe et de noyau des deux variétés d'olivier : Sigoise et Chemlal.	<b>38</b>
<b>Figure12:</b>	Contenu phénolique total (mg GAE/100mL) d'extraits aqueux (H <sub>2</sub> O), éthanol-eau (ETOH) (80/ 20 : V/V) et méthanol-eau (MTOH) (80/ 20 : V/V) du jus d'orange traditionnel (orange pressée).	<b>40</b>
<b>Figure13:</b>	Contenu phénolique total (mg GAE/100mL) d'extraits aqueux (H <sub>2</sub> O), méthanol-eau (MTOH) (80:20) et éthanol-eau (ETOH) (80 :20) de jus d'orange industriel.	<b>40</b>
<b>Figure14 :</b>	Activité antioxydante d'extraits de <b>peau</b> de différentes variétés de raisins rouge et blanc mesurée par le test de DPPH. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'écart type du % DPPH inhibé.	<b>46</b>
<b>Figure15 :</b>	Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH (exprimée en % DPPH inhibé) de la <b>pulpe</b> des variétés de raisins rouge et blanc	<b>46</b>
<b>Figure16 :</b>	Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH (exprimée en % DPPH inhibé) <b>des pépins</b> des variétés de raisins rouge et blanc	<b>48</b>
<b>Figure17 :</b>	Représentation graphique des composés phénoliques de pépins de raisins blancs (venant de vignobles irrigué et non irrigué) extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC ; avant et après la maturation du fruit. La séparation sur une colonne Inertsil OD-5 C-18(waters, Milford, USA). Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	<b>53</b>
<b>Figure18 :</b>	Représentation graphique des composés phénoliques de la peau de raisins blancs extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC ; avant	<b>53</b>

	et après la maturation du fruit. La séparation a été réalisée sur une colonne Inertsil OD-5 C- 18(waters, Milford, USA).Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	55
<b>Figure19 :</b>	Représentation graphique des acides phénoliques et des flavanols de la peau de raisins blancs extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC ; avant et après la maturation du fruit. La séparation a été réalisée sur une colonne Inertsil OD-5 C- 18(waters, Milford, USA). Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	55
<b>Figure20 :</b>	Représentation graphique des acides phénoliques (hidroxcinnamiques et benzoïques) de la pulpe de raisins extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC ; avant et après la maturation du fruit. La séparation a été réalisée sur une colonne Inertsil OD-5 C- 18(waters, Milford, USA). Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	57
<b>Figure21 :</b>	Représentation graphique des flavonols de la pulpe de raisins blancs extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC ; avant et après la maturation du fruit. La séparation a été réalisée sur une colonne Inertsil OD-5 C-18 (waters, Milford, USA). Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	57
<b>Figure22 :</b>	Représentation graphique des flavanols et des procyanidines de la pulpe de raisins extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysées par HPLC ; avant et après la maturation du fruit. La séparation a été réalisée sur une colonne Inertsil OD-5 C- 18 (waters, Milford, USA). Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.	63
<b>Figure23 :</b>	Evolution du contenu phénolique total au cours de la fermentation alcoolique de jus de dattes par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à 30°C et en anaérobiose. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures $\pm$ écart type et sont exprimées en mg GAE/100 mL de jus de dattes	
<b>Figure24 :</b>	Evolution des polyphénols totaux en mg GAE/100 mL de jus d'orange au cours de 16 jours de fermentation anaérobique par la souche <i>Pichia kluyveri</i> à 30°C. Les valeurs sont exprimées en mg GAE/100 mL de jus	63

<b>Figure25 :</b>	d'orange. Evolution de la concentration en flavonoïdes totaux au cours de la fermentation du jus de dattes par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à 30°C et en anaérobiose. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures $\pm$ écart type et sont exprimées en mg d'équivalent quercétine (QE)/100 mL de dattes fraîches.	<b>66</b>
<b>Figure26 :</b>	Evolution de la concentration en flavonoïdes totaux au cours de 15 jours de fermentation anaérobie à 30°C du jus d'orange par la souche <i>Pichia kluyveri</i> . Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures $\pm$ écart type et sont exprimées en mg QE/100 mL de jus d'orange.	<b>66</b>
<b>Figure27 :</b>	Evolution de l'activité antioxydante mesurée par la méthode ORAC-FL ( $\mu$ moles Trolox équivalent/100 mL) des échantillons de jus d'orange au cours des périodes de fermentation anaérobie à 30°C de J1 à J5 ( <b>A</b> ), de J6 à J10 ( <b>B</b> ) et de J11 à J15 ( <b>C</b> ) par la levure <i>Pichia kluyveri</i> .	<b>70</b>

## Liste des tableaux

	<b><u>Chapitre I. Bref rappel bibliographique : Les antioxydants</u></b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 :</b>	Classification des composés phénoliques majeurs ( <b>Bruneton, 2009</b> )	<b>09</b>
<b>Tableau 2 :</b>	Les principales anthocyanidines des végétaux ( <b>Macheix et al., 2005</b> )	<b>14</b>
	<b><u>Chapitre II: Matériels et méthodes</u></b>	
<b>Tableau 3:</b>	Composition des milieux réactionnels de la microplaque pour le dosage des polyphénols totaux de raisin	<b>24</b>
	<b><u>Chapitre III: Résultats et discussion</u></b>	
<b>Tableau 4:</b>	Polyphénols totaux (mg FAE/100g) de pulpe de trois variétés de dattes fraîches: Deglet-Nour; Ghars et Ajwa extraits à l'eau distillée et au mélange acétone-eau (70/30:V/V).	<b>32</b>
<b>Tableau 5:</b>	Les surfaces des pics de composés phénoliques d'extraits aqueux de la datte Deglet-Nour fractionnés par HPLC.	<b>51</b>
<b>Tableau 6 :</b>	Concentrations des flavanones détectés dans le jus d'orange industriel	<b>59</b>
<b>Tableau 7 :</b>	Evolution des flavanones individuels et totaux au cours de la fermentation de jus d'orange industriel	<b>67</b>
<b>Tableau 8 :</b>	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et pouvoir antioxydant du jus d'orange industriel au cours de sa fermentation	<b>71</b>

## **RESUME**

Dans ce travail, nous avons réalisé des extractions de composés phénoliques à l'eau et aux solvants organiques à partir de différents végétaux (dattes, orange, raisin et olive) d'origine algérienne et espagnole. Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que le mélange acétone-eau (70/30:V/V) s'est révélé le plus efficace dans l'extraction des polyphénols de dattes. Le contenu phénolique total obtenu par le mélange acétone: eau (70/30:V/V) est de 246, 86.6 et 81.1mg ferrulic acid equivalent (FAE)/100g) pour les trois variétés de dattes Deglet-Nour, Ghars et Ajwa, respectivement. Une activité antioxydante (exprimée en  $\mu\text{M}$  Trolox/100g de poids frais) plus élevée a été enregistrée pour la variété Deglet-Nour ( $5380 \pm 192$ ) suivie des variétés Ajwa et Ghars ( $4041 \pm 161$  et  $2710 \pm 71$ ). Les résultats de l'analyse quantitative des polyphénols totaux ont montré que le raisin rouge est plus riche que le raisin blanc en composés phénoliques quelque soit la partie du fruit considérée : enveloppe, pulpe ou pépin. L'extrait phénolique de la pulpe de toutes les variétés de raisin a présenté des activités antioxydantes plus fortes que celles de l'extrait phénolique de la peau de raisin. Pour l'olive, la variété « sigoise » renferme nettement plus de polyphénols que la variété chemlal dans la pulpe ( $103.77 \pm 5,042$  vs  $49.79 \pm 3.04$  mg GAE/100g de poids frais) et dans le noyau ( $111.12 \pm 0.91$  vs  $79.37 \pm 1.57$  mg GAE/100g de poids frais). Les flavonoïdes totaux dans le jus d'orange ont significativement augmenté au cours des 15 jours de sa fermentation (de  $3.08 \pm 0.01$  à  $9.57 \pm 0.63$  mg/100 mL). L'effet de la fermentation du jus d'orange sur son activité antioxydante a été net également puisque celle-ci a augmenté de  $6044 \pm 247$  à  $7889 \pm 382 \mu\text{M}$  Trolox/100 mL. L'HPLC des extraits phénoliques des fruits étudiés a révélé une richesse en composants phénoliques qui, dans le cas des pépins de raisin, sont représentés principalement par des acides phénoliques, des catéchines et des procyanidines ; alors que dans les extraits de peau de raisin, ce sont les flavanols comme la quercétine, l'isoquercétine et le kampferol qui prédominent. Les acides hydroxycinnamique et benzoïque sont dominants dans les extraits de pulpe de raisin rouge et blanc ; alors que les acides galliques, ferrulique, hydroxybenzoïque, vanillique et p-coumarique sont les plus présents dans l'extrait de pulpe de dattes.

**MOTS-CLÉS:** Polyphénols-Jus d'orange – Dattes – Raisins – Olive- Fermentation- Antioxydants.

## **ABSTRACT**

In this work, we carried out extractions of phenolic compounds with water and organic solvents from different plants (dates, orange, grapes and olives) of Algerian and Spanish origin. The results obtained in this work showed that the acetone-water mixture (70/30: V/V) is the most effective in the extraction of date polyphenols. The total phenolic contents extracted by the mixture of acetone and water (70/30: V / V) were about 246, 86.6 and 81.1mg ferrulic acid equivalent (FAE) / 100g for the three varieties of dates Deglet-Nour, Ghars and Ajwa respectively . A higher antioxidant activity (expressed in  $\mu\text{M}$  Trolox / 100g fresh weight) was recorded for the Deglet-Nour variety ( $5380 \pm 192$ ) followed by the Ajwa and Ghars varieties ( $4041 \pm 161$  and  $2710 \pm 71$ ). Total polyphenol content of the red grape is higher than that of the white grape whatever the part of the fruit considered: skin grape, pulp or seed. The phenolic extract of the pulp of all grape varieties showed stronger antioxidant activity than the phenolic extract of the grape skin. For the olive, "sigoise" variety contains significantly more polyphenols than the chemlal variety in the pulp ( $103.77 \pm 5.042$  vs  $49.79 \pm 3.04$  mg GAE / 100g fresh weight) and in the core ( $111.12 \pm 0.91$  vs  $79.37 \pm 1.57$  mg GAE / 100g fresh weight). Total flavonoids in orange juice increased significantly during the 15 days of fermentation (from  $3.08 \pm 0.01$  to  $9.57 \pm 0.63$  mg/100 mL). The effect of the fermentation of orange juice on its antioxidant activity increased from  $6044 \pm 247$  to  $7889 \pm 382$   $\mu\text{M}$  Trolox / 100 mL). HPLC of the phenolic extracts of the fruits studied revealed richness in phenolic components, which, in the case of grape seeds, are mainly represented by phenolic acids, catechins and procyanidines; whereas in grape skin extracts, flavanols such as quercetin, isoquercetine and kampferol predominate. Hydroxycinnamic and benzoic acids are dominant in red and white grape pulp extracts; while gallic, ferrulic, hydroxybenzoic, vanillic and p-coumaric acids are most present in the date pulp extract.

**KEY-WORDS:** Polyphenols -Orange juice - Dates - Grapes - Olive-Fermentation- Antioxidants.

## الملخص

في هذا العمل تمت عمليات استخلاص المركبات الفينولية بالماء و المذيبات العضوية من نباتات مختلفة (التمر، البرتقال، العنب و الزيتون) من أصل جزائري و اسباني. أظهرت النتائج أن مزيج الأستون و الماء (V/V:70/30) هو الأكثر فاعلية في استخراج البوليفينول. إجمالي محتوى الفينول الذي تم الحصول عليه بواسطة هذا الخليط هو 86.6 و 81.1 ملغ /100FAE (غ) للأصناف الثلاثة من التمر على التوالي: دجلة نور، غرس و عجوة. إن نشاط مضاد الأكسدة المقدر بـ ( $\mu\text{M}/1000 \text{ g}$ ) هو ( $192\pm 5380$ ) لدجلة نور متبوعا بالأصناف Ajwa و Ghars ( $161\pm 4041$ ) و ( $71\pm 2710$ ). أظهرت نتائج التحليل الكمي للبوليفينول الكلي للعنب الأحمر أغنى من العنب الأبيض بغض النظر عن جزء الثمرة (قشرة، لب أو بذرة). إن نشاط مضاد الأكسدة هو أقوى عند لب الثمرة منه عند القشرة. بالنسبة للزيتون، الصنف Sigoise يحتوي كمية أكبر من البوليفينول مقارنة بالصنف Chemlal بالنسبة للثمرة ( $5.042\pm 203.77$ ) مقابل ( $3.04\pm 49.79$  ملغ / 100 GAE / غ من الوزن الطازج). لقد سجل ارتفاع مجموعة الفلافونيدات في عصير البرتقال خلال 15 يوما من التخمر بمقدار ( $0.01\pm 3.08$  إلى  $0.63\pm 9.57$  ملغ/100 ل). تأثير التخمر كان واضحا أيضا بالنسبة لنشاط مضاد الأكسدة. نتائج التحليل بالـ HPLC أظهرت احتواء بذرة العنب على الأحماض الفينولية والبروميانيدين بينما تسود مجموعة flavanols لدى غلاف ثمرة العنب. بينما لب العنب اختص باحتوائه على الأحماض الهيدروكسينية و البنزينية. أظهرت نتائج HPLC احتواء مستخلص التمر على أحماض vanillique, Ferrulique, P-Coumarique .Gallique.

**الكلمات المفتاحية:** البوليفينول – عصير البرتقال – التمر – العنب – الزيتون – التخمر - Antioxydants .

## Sommaire

### « Profil phénolique de quelques ressources végétales et pouvoir antioxydant »

Dédicace

Avant-propos

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction**.....01

**Chapitre I. Bref rappel bibliographique**.....04

I.1. Les antioxydants.....05

I.1.1. Systèmes antioxydants naturels de l'organisme.....05

I.1.1.1. Système antioxydant enzymatique.....05

I.1.1.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....05

I.1.1.1.2. Glutathion peroxydase(GPX) et Glutathion Réductase (GR).....05

I.1.1.1.3. Catalase.....06

I.1.1.2. Système antioxydant non enzymatique.....06

I.1.1.2.1. Oligo-éléments.....06

I.1.1.2.2. Glutathion réduit (GSH).....06

I.1.1.2.3. Les vitamines E et C.....06

I.2. Les polyphénols comme antioxydants exogènes..... 07

I.2.1. Classification des composés phénoliques.....07

I.2.1.1. Composés phénoliques non flavonoïdes : Les acides hydroxycinnamiques.....08

I.2.1.2. Composés phénoliques flavonoïdes : les anthocyanes.....13

I.2.2. Propriétés des polyphénols.....	14
I.2.2.1. Propriétés physicochimiques des polyphénols.....	14
I.2.2.2. Propriétés antioxydantes des polyphénols.....	15
I.2.3. Intérêts des polyphénols .....	16
I.2.3.1. Intérêt dans les industries agro-alimentaires et la tannerie.....	16
I.2.3.2. Intérêt médical et pharmaceutique.....	16

## **Chapitre II. Matériels et Méthodes.....18**

II.1. Origine et préparation des échantillons pour les différentes analyses .....	18
II.1.1 La datte .....	18
II.1.2. Le raisin .....	18
II.1.3. L'olive .....	18
II.1.4. L'orange .....	19
II.2. Extraction des polyphénols totaux .....	19
II.2.1. Extraction des polyphénols totaux de pulpe de dattes.....	19
II.2.2. Extraction des polyphénols totaux de raisins.....	19
II.2.3. Extraction des polyphénols totaux de l'olivier.....	20
II.2.4. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange artisanal et industriel.....	21
II.2.4.1. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange artisanal (orange pressée).....	21
II.2.4.2. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange industriel espagnol «Don Simon » .....	22
II.3. Dosage des polyphénols totaux .....	22
II.3.1. Principe de la méthode.....	22
II.3.2. Préparation de la droite étalon .....	23
II.3.3. Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	23
II.3.3.1. Dosage des polyphénols totaux dans le jus de datte, la pulpe d'olive et le jus d'orange.....	23
II.3.3.2. Dosage des polyphénols totaux dans la peau, la pulpe et le pépin de raisin .....	23
II.4. Dosage des flavonoïdes totaux dans les jus de dattes et d'orange industriel.....	23

II.4.1. Principe .....	23
II.4.2. Procédure de dosage.....	25
II.5. Dosage des anthocyanes des dattes .....	25
II.5.1. Principe de la méthode .....	25
II.5.2. Procédure .....	25
II.6. Détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques .....	26
II.6.1. Méthode de piégeage du radical DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	26
II.6.2. Méthode Oxygen Radical Antioxidant Capacity-Fluorescein (ORAC-FL).....	27
II.7. Analyse des extraits phénoliques par chromatographie (HPLC).....	27
II.7.1. HPLC de l'extrait phénolique de jus de datte.....	27
II.7.2. Analyse chromatographique de jus d'orange industriel et de raisin.....	28
II.8. Procédure et conditions de fermentation du jus de dattes et du jus d'orange industriel..	29
II.8.1. Fermentation du jus de dattes.....	29
II.8.2. Fermentation de jus d'orange industriel.....	29
II.9. Analyse statistique des résultats.....	30
<b>Chapitre III. Résultats et discussion.....</b>	<b>31</b>
III.1. Teneurs en polyphénols totaux des différentes sources végétales.....	31
III. 1. 1. Teneurs en polyphénols totaux de la pulpe de dattes.....	31
III. 1. 2. Teneurs en polyphénols totaux de raisin .....	33
III.1.3. Polyphénols totaux de la pulpe, du noyau et de la feuille d'olivier.....	37
III.1.4. Teneurs en polyphénols totaux du jus d'orange traditionnel (orange pressée) et industriel espagnol (Don Simon).....	39
III. 2. Teneurs en anthocyanes de la pulpe de datte.....	42
III.3. Résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des différents fruits .....	43
III.3.1. Activité antioxydante d'extraits phénoliques de pulpe de dattes.....	43
III.3.2. Activité antioxydante des extraits phénoliques de raisin.....	45
III.3.3. Activité antioxydante des extraits phénoliques de jus d'orange .....	49
III.4. Résultats de l'analyse des composés phénoliques par HPLC.....	50
III.4.1. HPLC des extraits phénoliques aqueux de pulpe de dattes.....	50
III.4.2. HPLC des extraits phénoliques de peau, de pulpe et de pépins de raisins.....	51
III.4.2.1. HPLC des extraits phénoliques de pépins de raisins.....	51
III.4.2.2. HPLC des extraits phénoliques de la peau de raisins.....	52
III.4.2.3. HPLC des extraits phénoliques de la pulpe de raisins.....	54
III.4.3. HPLC des extraits phénoliques du jus d'orange industriel .....	59
III.5. Evolution des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux en fonction de la durée de fermentation du jus de dattes et du jus d'orange. ....	60

III.5.1. Evolution des polyphénols totaux au cours de la fermentation des jus de dattes et d'orange. ....	60
III.5.1.1. Polyphénols totaux au cours de la fermentation du jus de dattes.....	60
III.5.1.2. Polyphénols totaux au cours de la fermentation du jus d'orange commercial industriel espagnol « Don Simon ».....	62
III.5.2. Evolution des flavonoïdes totaux au cours de la fermentation des jus de dattes et d'orange .....	65
III.5.2.1. Fermentation du milieu jus de dattes et flavonoïdes totaux.....	65
III.5.2.2. Fermentation du jus d'orange commercial espagnol « Don Simon » et flavonoïdes totaux.....	65
III.6. Evolution de l'activité antioxydante du jus d'orange industriel espagnol « Don Simon » au cours de la fermentation.....	68
<b>Conclusion</b> .....	75
<b>Références bibliographiques</b> .....	78

## **Annexes**

### **Publication**

### **Communications**

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Depuis longtemps, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Les fruits couramment consommés, tels que les raisins, les oranges / jus d'orange, les dattes, contiennent des composés polyphénoliques qui ont été étudiés pour leurs effets médicamenteux tels que l'inflammation, maladies cardiovasculaires et autres, mais la nature de leurs effets chez l'homme reste à éclaircir (**Shama et al., 2015**).

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle s'appuie, d'abord sur la connaissance de la flore d'intérêt pharmaceutique et médicinal et de sa répartition spatiale et ensuite sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, et enfin sur les études phytochimiques et pharmacologiques qui vont préciser la composition et les propriétés des constituants (**Cai et al., 2003**).

De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays. Les fruits et les légumes constituent des sources importantes en composés phénoliques, d'où la nécessité d'évaluer leur contenu en ces molécules bioactives et de connaître leur disponibilité dans nos aliments, leurs propriétés biologiques, ainsi que leur rôle dans la prévention des différentes maladies associées avec le stress oxydatif, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Scalbert, 2000; Manach et al., 2008 ; Morand et al., 2011**).

L'importance des composés phénoliques dans les aliments est principalement due à leur capacité antioxydante. Ce sont des capteurs de radicaux libres et ont la capacité de chélater les ions de métaux de transition, arrêtant ainsi les réactions de la chaîne oxydative dans les cellules (**Cortes-Castell et al., 2016**).

La datte (*Phoenix dactylifera* L.) est un fruit de haute valeur nutritionnelle. L'Algérie est le quatrième producteur mondial de dattes avec une production annuelle d'environ 789.36 tonnes pendant l'année 2012 comme exemple et dont la variété Deglet-Nour représente plus de 50 % (FAO, 2013). Si la composition de la datte en sucres, protéines, lipides, fibres, vitamines et minéraux est connue, celle de ses constituants phénoliques l'est moins, en l'occurrence pour les variétés algériennes. Un regain d'intérêt croissant pour ces constituants phénoliques a été suscité chez le grand public suite à la démonstration des propriétés biologiques à bénéfice santé qu'ils procurent à l'organisme. C'est pourquoi une partie de ce

travail a été consacrée à la quantification des polyphénols de trois variétés algériennes de dattes Deglet-Nour, Ghars et Ajwa) et à la mise en évidence de leurs propriétés biologiques.

Le raisin, (fruit de la vigne *Vitis vinifera*), est apprécié par les consommateurs méditerranéens, et en particulier par les Algériens. Les trois parties de ce fruit ont été utilisées pour l'obtention d'ingrédients entrant dans l'élaboration d'aliments fonctionnels (**Goni et al., 2005**). Les polyphénols représentent la troisième classe parmi les constituants majeurs du raisin après les sucres et les acides. Dans ce travail, nous avons essayé de répondre à certaines préoccupations concernant les facteurs clés qui peuvent affecter la qualité nutritionnelle du raisin dont les stades de maturation du fruit et l'irrigation ou non de la vigne font une partie.

L'olivier (*Olea europaea*) avec toutes ses parties et spécialement son fruit contient des molécules hautement bioactives. Le grand intérêt accordé aux composés phénoliques de l'huile d'olive a été renvoyé au fruit (l'olive). L'Algérie occupe le neuvième rang dans la production mondiale d'olives après l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Syrie, le Maroc, la Tunisie et l'Égypte (**Oteros, 2014 ; Anonyme, 2015**). Les variétés locales sont représentées surtout par la variété chemlal qui se rencontre dans toute la Kabylie et dans la vallée de la Soummam. Elle est considérée comme étant bonne productrice d'huile de bonne qualité. D'autres variétés comme LimLi, Azaradj et Bouchouk se rencontrent surtout dans la vallée de la Soummam. Ces quatre variétés représentent à elles seules les trois quarts de la production oléicole nationale.

Une autre variété, plutôt destinée à la consommation directe (olive de table) qu'à la production d'huile est la variété dite « sigoise », de la région de Sig à l'Ouest du pays. Le développement de nouvelles oliveraies fait de l'olive et de l'huile d'olive des produits à large consommation en Algérie et c'est qui pourrait justifier l'évaluation de leur contenu phénolique dans ce travail.

L'orange (*Citrus sinencis* L.) représente une source importante en polyphénols avec une concentration élevée en caroténoïdes et en acide ascorbique (**Sanchez-Moreno et al., 2003**). L'Algérie est un pays agrumicole de longue date classé en 19<sup>ème</sup> position avec une production d'orange qui a dépassé 571000 tonnes en 2012 (**FAO, 2012**). Le jus d'orange est également un produit de grande consommation qui renferme des substances bioactives tels que les polyphénols en plus de la vitamine C. Les bénéfices santé que l'on peut tirer de la consommation de jus d'orange dépendent, entre autres, de la nature et de la teneur en ces substances bioactives. C'est pourquoi, dans la présente étude, nous avons procédé à l'évaluation du contenu phénolique du jus d'orange, ainsi qu'à l'effet de la fermentation

alcoolique sur ce contenu. Les propriétés antioxydantes du jus d'orange frais et fermenté ont également été explorées.

Dans ce manuscrit, nous présenteront dans un premier chapitre l'état des connaissances sur les systèmes antioxydants naturels endogènes et exogènes, ainsi que les différentes sources potentielles en composés polyphénoliques et leurs propriétés antioxydantes. Dans un second chapitre est décrite la méthodologie et le protocole adopté dans cette étude. Les résultats sont présentés et discutés dans un troisième et dernier chapitre.

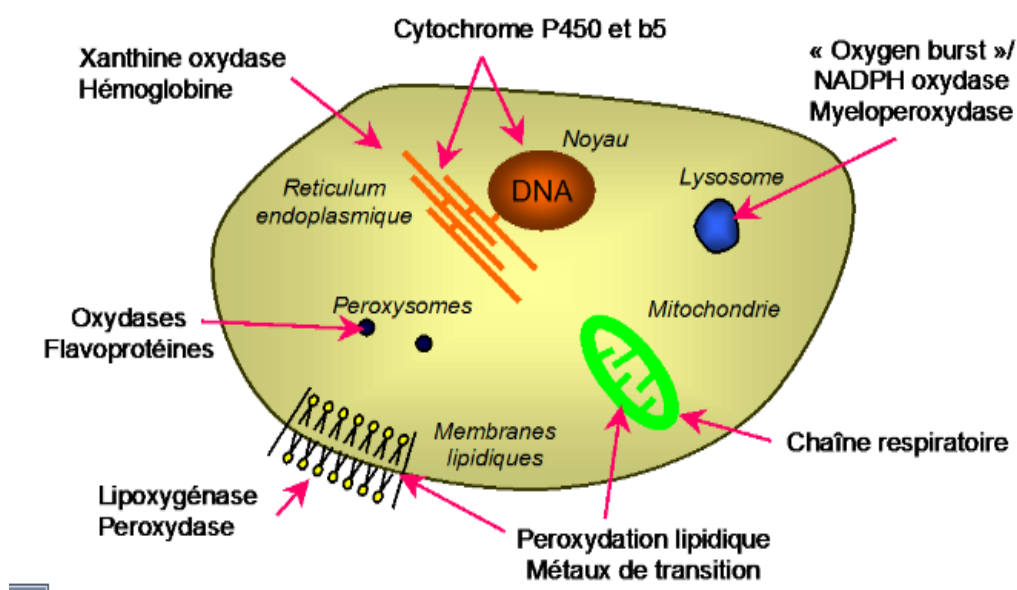
# **CHAPITRE I.**

## **Bref rappel bibliographique**

## Chapitre I. Bref rappel bibliographique

Les espèces réactives oxygénées (ROS) sont issues d'une réduction incomplète de l'oxygène. L'anion superoxyde  $O_2^-$  peut servir de précurseur à la formation d'autres types de ROS, telles que  $H_2O_2$  et  $OH^\cdot$ . Les ROS produites par les oxydations cellulaires sont éliminées ou piégées par des molécules douées de propriétés antioxydantes et dont le rôle dépasse de loin celui de simples piègeurs ou de suppresseurs de radicaux libres.

Les ROS sont efficaces dans la prévention et/ ou dans le traitement des affections parasitaires et non parasitaires. Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par le système antioxydant. Un déficit ou un dysfonctionnement de ce système engendre une augmentation des dommages tissulaires. Le système antioxydant est de nature enzymatique et non enzymatique. La figure1 illustre la localisation de la production des ROS.



**Figure1:** Localisation de la production intracellulaire des espèces réactives oxygénées (ROS)

(Machlin et al., 1987).

## **I.1. Systèmes antioxydants naturels de l'organisme**

### **I.1.1. Système antioxydant enzymatique**

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de l'organisme contre les ROS.

#### **I.1.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)**

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD).

Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire (**Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001**). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries.

#### **I.1.1.2. Glutathion peroxydase (GPX) et glutathion réductase (GR)**

La glutathion peroxydase (GPX) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (**Mates et al., 1999; Powers et Lennon, 1999**).

Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPX) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (**Mates et al., 1999 ; Nomura et al., 2000**).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la

GPX maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

### **I.1.1.3. Catalase**

La catalase est également responsable de l'élimination d' $H_2O_2$  par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . Contrairement à la GPX, l'affinité de la catalase pour l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (**Mates et al., 1999**). Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

### **I.1.2. Système antioxydant non enzymatique**

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydants nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

#### **I.1.2.1. Oligoéléments**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale nécessite du manganèse, la SOD cytosolique du cuivre et du zinc, la catalase du fer et la GPx du sélénium.

#### **I.1.2.2. Glutathion réduit**

Le glutathion réduit (GSH), assure la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer et al., 1997**).

Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' $H_2O_2$  est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé est augmenté (**Ji et al., 1992**).

#### **I.1.2.3. Les vitamines E et C**

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) ont une grande importance dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes

cellulaires et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Evans, 2000 ; Packer et al., 1997**).

De nombreuses études ont été réalisées pour élucider le rôle de la vitamine E dans la lutte contre le cancer. Jusqu'à la dernière décennie, l'accent était mis sur l' $\alpha$ -tocophérol et ses effets anticancéreux (**Abraham et al., 2018**).

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement les anions  $O_2^-$  et  $OH^\bullet$ .

## **I.2. Les polyphénols comme antioxydants exogènes**

Les polyphénols ou «composés phénoliques» sont des molécules spécifiques au règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées. En fait, le terme « polyphénols » devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols; ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques.

De cette diversité structurale découle une grande variabilité des propriétés physico-chimiques rendant impossible une présentation unique et générale d'une méthode qui permet l'extraction et la purification des polyphénols (**Harborn, 1993**).

L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...). À l'heure actuelle, il existe plus de 8000 molécules répondant à ces critères et qui ont été isolées et identifiées (**Harborn, 1993**).

Il y a 80% des composés phénoliques qui sont localisés essentiellement dans les tissus épidermiques des fruits. Ce sont des micronutriments et sont généralement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits jaune, orange et rouge (**Pekka, 2001**).

### **I.2.1. Classification des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre et le positionnement d'atomes de carbone (**Bravo, 1998**) (tableau1). Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques simples phénol en C6. Ce groupe comprend plusieurs composés parmi

lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthonnes.

#### **I.2.1.1. Composés phénoliques non flavonoïdes : Les acides phénoliques.**

On distingue deux principales classes d'acides phénoliques; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque dans les végétaux comestibles est généralement très faible. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine ; en revanche, ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents.

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type 6-C1 (fig.2). Ils sont particulièrement bien représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tanins.

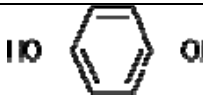
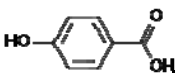

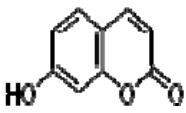

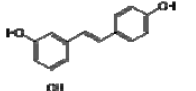
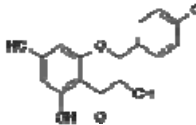
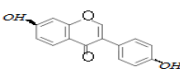
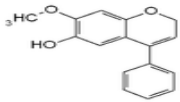

Les acides hydroxy-benzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou glucosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside, les esters méthyliques ou glycosylés (fig.2) représentent vraisemblablement des formes de stockage ou de circulation dans la plante **(Ribereau -Gayon, 1968)**.

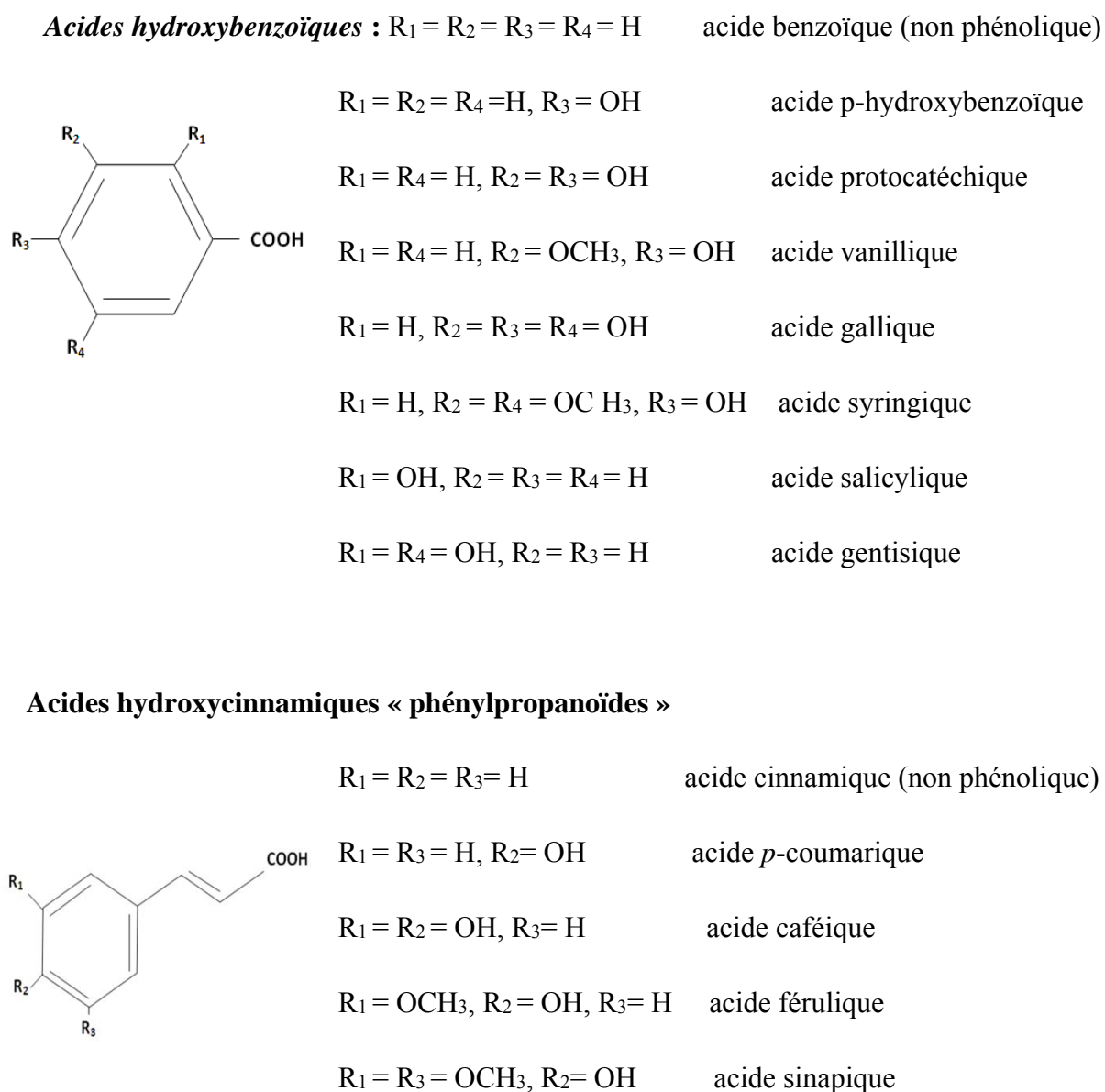
Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides férulique ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries d'isomères (cis ou **Z** et trans ou **E**) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes.

Les acides hydroxy-benzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou glucosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside, les esters méthyliques ou glycosylés (fig.2) représentent vraisemblablement des formes de stockage ou de circulation dans la plante **(Ribereau -Gayon, 1968)**.

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle

Tableau1: Classification des composés phénoliques majeurs (Bruneton, 2009)

Composés phénoliques				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Source
C6	<u>Phénols simples</u>	<u>hydroquinone</u>		<u>Busserole</u>
C6-C1	<u>Acides hydroxy-benzoïques</u>	<u>acide parahydroxy-benzoïque</u>		Epices, fraises
C6-C3	<u>Acides hydroxy-cinnamiques</u>	<u>acide p-coumarique</u>		Tomates, ail
	<u>Coumarines</u>	<u>Ombelliférone</u>		Carottes, coriandre
C6-C4	<u>Naphtoquinones</u>	<u>Juglon</u>		Noix
C6-C2-C6	<u>Stilbénoïdes</u>	<u>trans-resvératrol</u>		Raisin
C6-C3-C6	<u>Flavonoïdes</u> <i>latosensu</i>	<u>Kaempférol</u>		Fraises
	<u>Isoflavonoïdes</u>	<u>Daidzéine</u>		Graines de soja
	<u>anthocyanes</u>	Dalchiniol		Dalbergia sissou
(C6-C3) <sub>2</sub>	<u>Lignanes</u>	<u>Entérodiol</u>		Bactéries intestinales
(C6-C3) <sub>n</sub>	<u>Lignines</u>			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	<u>Tanins condensés</u>	<u>Procyanidol</u>		Raisins



**Figure 2:** Les principaux acides phénoliques (Ribereau -Gayon, 1968).

benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides férulique ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries d'isomères (cis ou **Z** et trans ou **E**) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes.

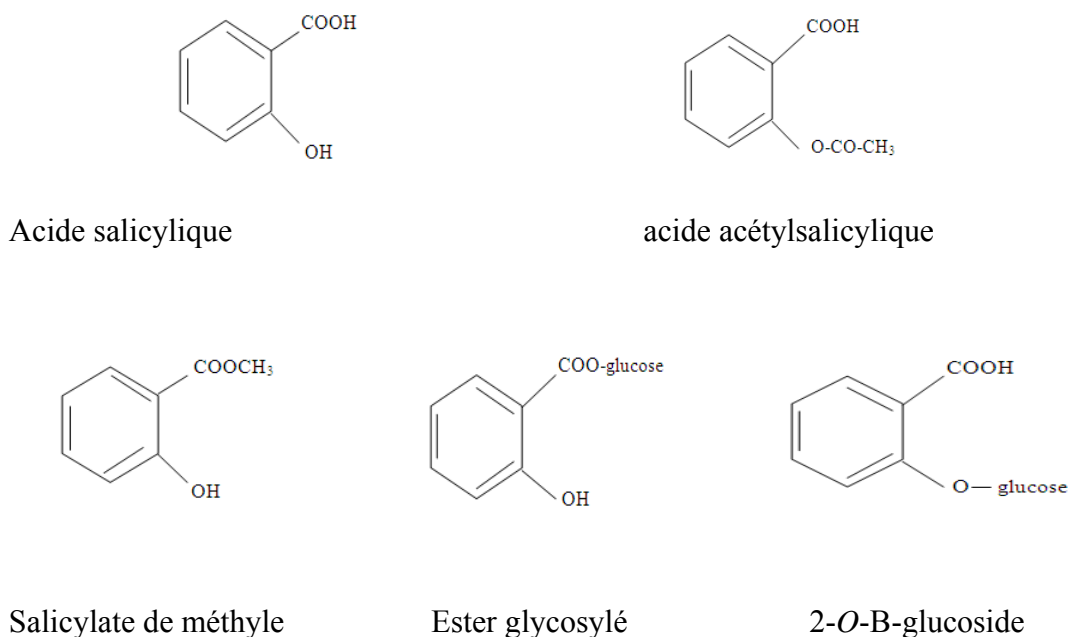
Dans une étude récente, **Zamora-Ros et al., (2018)** ont évalué l'association entre les apports alimentaires des classes totales, individuelles et des sous-classes de polyphénols et le risque de cancer colorectal (CRC) et ses sous-sites principaux, le côlon et le rectum. La cohorte comprenait 476 hommes et 160 femmes de 10 pays européens. Après un suivi moyen de 14 ans, il y a eu 5991 cas de CRC, dont 3897 dans le côlon et 2094 dans le rectum. La consommation d'acide phénolique, fortement corrélée à la consommation de café, était inversement associée au cancer du côlon chez les hommes et positivement associée au cancer du rectum chez les femmes. Les formes trans sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes cis ne correspondent qu'à des artéfacts d'extraction (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont représentées par l'acide *p*-coumarique (et ses isomères, les acides *o*- et *m*-coumariques), l'acide caféique et son dérivé 5-hydroxylé, et enfin l'acide sinapique (fig.2). L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de *phénylpropanoïdes* (**Clifford, 1999**).

Ces acides sont rarement présents à l'état libre et ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons impliquent souvent la fonction carboxylique conduisant alors à des esters (avec le glucose ou avec différents alcools-acides : comme les acides quinique, tartrique, shikimique, malique.....) ou à des phénolamides (avec des mono ou des di-amines: tyramine, putrescine, spermidine....). Les liaisons avec les sucres peuvent également se faire par l'intermédiaire de l'une des fonctions phénoliques, conduisant alors à des glucosides (par exemple le glucoside de l'acide *p*-coumarique) (**Clifford, 1999**).

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi universelle chez les végétaux, initialement isolé dès le XIX<sup>e</sup> siècle à partir des fruits et des graines du café où il est très abondant, il est souvent présent sous forme d'esters. L'acide chlorogénique (5-caféoylquinique) est le plus fréquemment rencontré, par exemple dans la pomme ou le café où il est très abondant, il est souvent présent sous forme d'esters.

L'acide chlorogénique (5-caféoylquinique) est le plus fréquemment rencontré, par exemple dans la pomme ou le café. Mais on le trouve également sous forme d'acide caféoyltartrique (désigné quelquefois sous le nom d'acide caftarique) dans le raisin, d'acide caféoylshikimique dans la datte, d'acide caféoylmalique dans le radis, de caféoylglucose, de caféoylputrescine (**Macheix et al., 2005**). Les acides hydroxybenzoïques et leurs isomères représentés essentiellement par l'acide salicylique et ses dérivés naturels (fig.3)



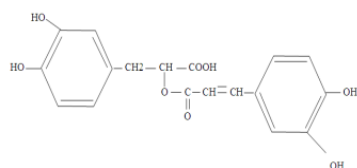
**Figure 3:** L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (**Ribereau -Gayon, 1968**).

Les acides hydroxycinnamiques existent aussi fréquemment sous forme d'esters multiples dont les acides di-caféoylquiniques, communément appelés iso-chlorogéniques. Des formes proches, comme l'acide rosmarinique (fig.4), sont des antioxydants naturels très classiques. Dans certains cas, la liaison avec des stérols conduit à des composés à caractère apolaire, par exemple le féruloysitostérol qui est abondant dans le son et les farines de diverses céréales.

Par ailleurs, comme cela sera développé plus loin, les acides hydroxycinnamiques peuvent être réduits en monolignols et participer alors à la formation des lignines. Les acides hydroxycinnamiques sont représentés par l'acide para-coumarique (PCA), l'acide férulique(AF) et ses dérivés qui sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols (alcools hydroxycinnamiques) (**Harris et Trethewey, 2010**).

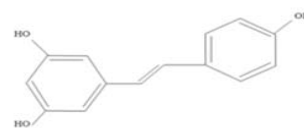
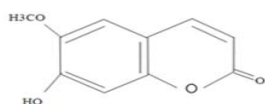
Dérivées des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale, les hydroxycoumarines sont également très nombreuses chez les végétaux, soit sous forme libre (umbelliférone, esculétine, scopolétine), soit sous forme plus complexes (glycosylées, prénylées...) (fig.4). Elles ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. Un autre

groupe de ces composés : les stilbènes, dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques, et qui apparaît chez la vigne en réponse à des attaques parasitaires (**Hakala et al., 2002**).



Acide rosmarinique

Un exemple d'hydroxycoumarine,  
la scopolétine



Un exemple de stilbène, le resvératrol

Un exemple de furanocoumarine  
le bergaptène

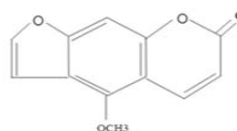


Figure 4: Exemples des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (**Hakala et al., 2002**)

### I.2.1.2. Composés phénoliques flavonoïdes : Les anthocyanes

L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) comprend plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes (tableau 1.) dont certaines, les anthocyanes, ont une très grande importance biologique et technologique. Il s'agit de pigments rouges ou bleus, les flavones et les flavonols, ou encore crème ou jaune clair, les flavanes, dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui sont bénéfiques pour la santé.

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (**Guignard, 1996**). Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle C. La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau "flavone" généralement glycosylé en position C3 (**Ribereau –Gayon, 1968**).

Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, ainsi que par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou

anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. Le terme « anthocyanes » a une signification générale (désignant les formes naturelles glycosylées). La partie phénolique seule est désignée sous le nom d'anthocyanidine (par exemple la pélargonidine ou la malvidine), alors que l'hétéroside (molécule phénolique + sucre associé) prend celui d'«anthocyanine » (tableau 2).

Tableau 2 : Les principales anthocyanidines des végétaux (Macheix et al., 2005).

R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub>	Anthocyanidine	Couleur	Plante
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =H	Pélargonidine	Orange-rouge	Pélagonium rouge
R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =H	Cyanidine	Rouge, pourpre	Pomme rouge
R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =H	Péonidine	Rose	Pivoine rose
R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =OH	Delphénidine	Bleue-violette	Mufler violet
R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =OH	Pétunidine	Violette	Pétuna violet

## I.2.2. Propriétés des polyphénols

### I.2.2.1. Propriétés physicochimiques des polyphénols

Les propriétés physiques telles que les points de fusion et d'ébullition, la solubilité, les spectres dans l'ultraviolet et l'infrarouge sont modifiées par les liaisons hydrogènes intramoléculaires des phénols. Ces phénols sont capables de précipiter les protéines, ils peuvent aussi former des complexes avec les glucides, les vitamines et les minéraux.

Les anthocyanes présentent l'avantage d'être relativement non sensibles à la chaleur et à la lumière mais leur caractère amphotère entraîne un changement de leur couleur en fonction du pH (Shahidi et Nacz, 1995). Les anthocyanes sont dégradés très rapidement et présentent des changements significatifs de couleur dans un environnement peu acide (HY et al., 2018). Les composés phénoliques s'oxydent facilement en quinones en présence d'oxygène sous l'action des polyphénols oxydases (PPO) et des peroxydases (POD).

Les quinones formées s'oxydent à leur tour et se polymérisent en donnant des composés bruns responsables de brunissement enzymatique qui est à l'origine de la coloration brune observée dans les produits végétaux d'où l'utilisation des antioxydants qui préservent la qualité des aliments de la détérioration par la prévention de l'oxydation et empêchent aussi l'auto-oxydation des lipides qui entraîne la formation des radicaux libres et le goût rance des matières grasses (**Shahidi et Naczk, 1995**).

Les réactions de brunissement enzymatique joueraient aussi un rôle de protection contre les microorganismes. On pense, en effet, que les polymères bruns qui se forment rapidement lorsqu'un tissu végétal est contusionné, lacéré ou infecté, peuvent constituer une barrière à la pénétration des microorganismes (**Cheftel et Cheftel, 1992**). Les polymères bruns constituent un revêtement efficace pour inhiber la croissance des bactéries aérobies mésophiles. Le revêtement a également réduit les populations de *E. coli*, *S. enteritidis* et *L. monocytogenes* (**Badwaik, 2014**).

### **I.2.2.2. Propriétés antioxydantes des polyphénols**

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés phénoliques. La relation structure – activité antioxydante des flavonoïdes et des composés phénoliques dépend de la position et du degré d'hydroxylation (**Igor Passi, 2002**).

En tant qu'antioxydants, tous les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent notre défense contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques qui lui sont associées. Ils ont aussi des propriétés spécifiques (affinité pour des récepteurs cellulaires comme les récepteurs des estrogènes, impact sur la signalisation cellulaire) qui induisent des réponses cellulaires très diverses. La somme de ces effets se traduit par des effets santé que l'on a commencé à comprendre à travers les expérimentations animales et cliniques il y a plus de 20 ans (**Daayf et al., 2003**).

### **I.2.3. Intérêts des polyphénols**

La consommation de fruits et légumes constitue un apport important en polyphénols dont les propriétés antioxydantes constituent un rempart indéniable contre la naissance de radicaux libres dans l'organisme. Parmi les principaux intérêts de ces molécules, on peut citer ceux dans les industries agro-alimentaires et la tannerie, ainsi que ceux dans le secteur médical et pharmaceutique.

#### **I.2.3.1. Intérêts dans les industries agro-alimentaires et la tannerie.**

Dans les industries agro-alimentaires, l'intérêt majeur des anthocyanines, c'est leur pouvoir colorant, d'où leur utilisation comme additif alimentaire. A l'heure actuelle, le chou rouge et les peaux de raisin dominent le marché des matières premières.

Comme beaucoup de composées phénoliques, les pigments anthocyaniques se comportent également comme des piègeurs de radicaux libres. Substances amères, astringentes ou sucrées, les polyphénols sont aussi des aromatisants de choix (tanins de chêne, vanilline, etc...). Comme exemple, il y a la vanilline qui est produite par oxydation de la lignine et que l'on trouve dans les liqueurs sulfuriques résiduelles issues de la fabrication de pâte à papier (**Mompon et al., 1996**).

Comme autres industries utilisatrices de substances phénoliques, il y a celle du cuir (tannerie) qui exploite la propriété qu'ont les tanins à précipiter le collagène des peaux d'animaux. Néanmoins, il faut signaler que dans les pays industrialisés, cet usage a régressé au profit d'autres utilisations: revêtements protecteurs, adhésifs et teintures (**Mompon et al., 1996**).

#### **I.2.3.2. Intérêt médical et pharmaceutique**

Sur le plan médical, les polyphénols ont des propriétés antioxydantes très importantes, permettant de lutter contre la formation de radicaux libres en excès dans l'organisme, et par ce fait jouent un rôle protecteur vis-à-vis de nombreuses maladies et en particulier les maladies dégénératives, comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies hormono-dépendantes, les allergies ou encore les inflammations (**Perret, 2001 ; Marfak, 2003**).

Les flavonoïdes sont des substances liposolubles et hydrosolubles ; ce sont surtout des protecteurs vasculaires améliorant la résistance et la perméabilité des vaisseaux aussi bien artériels que veineux. Ils augmentent aussi la résistance des vaisseaux en protégeant le tissu

conjonctif péri-vasculaire des dégradations enzymatiques. Ils protègent les LDL (lipoprotéines à faible densité) vis-à-vis de l'oxydation (**Hertog, 1993**). Dans une étude très récente (**Huang et al., 2018**), il a été démontré des effets protecteurs des anthocyanes (une classe de flavonoïdes) de myrtille contre les lésions oxydatives induites par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne humaines.

Sur le plan pharmaceutique, les polyphénols regroupent un ensemble de principes actifs rencontrés dans de nombreux médicaments (flavonoïdes). Ils sont extraits de divers végétaux comme l'eucalyptus, le sarrasin, le sophora ; tout comme on peut les trouver sous forme d'extrait de mélilot titré en coumarine, de podophyllotoxine (lignane), de résine de podophylle qui sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme protecteur vasculaire. Les oligomères procyanidoliques (OPC) de pépins de raisin sont aussi utilisés en cosmétique pour lutter contre les radicaux libres et les effets du soleil (**Mompon et al., 1996**).

# **CHAPITRE II.**

## **Matériels et méthodes**

## **Chapitre II. Matériels et Méthodes**

### **II.1. Origine et préparation des échantillons pour les différentes analyses**

#### **II.1.1. La datte**

Trois variétés de dattes ont été retenues dans ce protocole : Deglet-Nour de la région de Biskra et les variétés Ghars et Ajwa de Ouargla qui ont toutes été récoltées le mois de septembre. Les dattes sont d'abord dénoyautées pour récupérer la pulpe qui est ensuite pressée afin d'obtenir une pâte homogène pour la préparation d'un jus de dattes qui servira aux différentes analyses. Les noyaux de dattes ne sont pas concernés par ce protocole ; ils sont donc éliminés.

#### **II.1.2. Le raisin**

Dix variétés de raisins ont été utilisées dans cette étude ; des raisins rouges appartenant aux variétés Garnatxa *negra* (GN) : Lloar et Porrera ; *Cabernet sauvignon* (CS) : Mediona, Nerola et la variété *Merlot* (MT) : Tremp, Mediona, Penedes. Les raisins blancs sont du *Chardonnay* (CH) : Tremp et Jean Leon. Tous les raisins ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. L'effet de certains paramètres comme les stades de maturation du fruit ainsi que l'irrigation de la vigne sur le contenu phénolique du raisin a été étudié.

Pour leur analyse, les échantillons ont été manipulés à l'abri de la lumière et en présence de neige carbonique, afin d'éviter la décongélation rapide de la pulpe et la dégradation des composés à déterminer. Les raisins ont été manuellement débarrassés de leurs enveloppes extérieures et les trois parties du fruit (enveloppe, pulpe et pépin) ont été triés et gardés séparément. Ainsi, pour le raisin, nous disposons de 3 types d'échantillons : l'enveloppe (peau), la pulpe et le pépin.

#### **II.1.3. L'olive**

Plusieurs types d'échantillons sont concernés par cette manipulation : la pulpe d'olive préparée par dénoyautage suivi d'un broyage (broyeur électrique marque Severin, France) (2 échantillons correspondant chacun à une variété, chemlal récoltée en Février 2014 ou sigoise récoltée en Septembre 2015), le noyau d'olive (2 échantillons correspondant chacun à une variété, chemlal et sigoise dans la Wilaya de Mostaganem) et l'huile d'olive (2 échantillons représentés par deux types d'huiles : traditionnelle vierge de Tizi-Ouzou et industrielle de

marque « somazit »). Les noyaux d'olive et les feuilles d'olivier sont broyés et conservés jusqu'au moment de l'analyse.

#### **II.1.4. Le jus d'orange.**

Les échantillons « jus d'orange » retenus dans cette manipulation sont de deux types : le jus d'orange artisanal préparé manuellement à partir d'orange du nom de « Valencia » d'origine algérienne (récoltée à Chlef en 2013) et le jus d'orange industriel . Avant leur utilisation, les jus sont centrifugés (5000 tours/ min pendant 5 min) pour éliminer les particules insolubles, puis additionnés de BHT (Buthyl Hydroxy Toluène) à raison de 0,001 % (V/V) avant d'être conservés à -20°C jusqu'à leur analyse. Ceci afin d'éviter l'oxydation des caroténoïdes durant les analyses.

### **II.2. Extraction des polyphénols totaux**

#### **II.2.1. Extraction des polyphénols totaux de pulpe de dattes**

Deux types de solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols de pulpe de dattes : l'eau distillée à 60°C et le mélange acétone/eau (70/30: V/V). La méthode d'extraction comporte trois extractions successives à l'abri de la lumière et consiste à macérer l'échantillon pulpe de datte (10g) dans le solvant eau (100 mL) à 60°C pendant 3h30min; et 1h30 à 2h dans le mélange acétone/eau (100mL) ; laquelle est suivie d'une centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 min puis d'une filtration et d'une évaporation de ce mélange de solvants au rotavapor (**Al-Farsi et al., 2005**).

Les extraits obtenus sont réunis pour chaque solvant séparément (nous retiendrons que nous aurons deux échantillons d'extraits de polyphénols totaux de pulpe de datte pour trois variétés de dattes différentes) et conservés à 4° C à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'analyse.

#### **II.2.2. Extraction des polyphénols totaux de raisins**

L'extraction des polyphénols de trois échantillons de 10 variétés différentes de raisin (enveloppe, pulpe et pépins soit 30 échantillons raisin au total) a été opérée avec le mélange éthanol/eau (80/20 : V/V) additionné de peau (à raison de 10% : P/V), de pépins (à raison de 10 % : P/V), et de pulpe (50 % : P/V) (**Medina-Remon et al., 2009**).

Chaque échantillon est agité pendant 1min au vortex avant de subir une ultrasonification (5 min) ; suivie d'une centrifugation à 4000 trs/min pendant 20min à 4°C. Chaque culot est repris dans une deuxième extraction identique à la première et les

surageants de chaque échantillon sont réunis pour une évaporation du solvant sous flux d'azote liquide (appareil DRI-Block-DB-3D UEGHNE, Espagne).

Une microplaque de 96 puits est utilisée pour multiplier l'analyse des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante des extraits de différents échantillons de raisin (fig.5).



Figure 5: Microplaque Oasis<sup>®</sup> MAX 96-Well plate cartidges (Ref. 269620)

### II.2.3. Extraction des polyphénols totaux de l'olivier

Dans cette manipulation, nous avons utilisé deux solvants séparément : l'acétate d'éthyle et le méthanol à l'état pur pour extraire les polyphénols totaux de pulpe du fruit olive, du noyau d'olive et des feuilles d'olivier.

L'extraction a été effectuée selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** légèrement modifiée sur le plan des volumes de solvants seulement par **Lafka et al. (2013)**. Cette méthode consiste à broyer 20 mg de pulpe, de noyau ou de feuille d'olivier auxquels on ajoute 20 mL d'hexane et laisser agir pendant 3 min. Ensuite, on agite et on laisse décanter pendant 10 min. La phase organique (huile) est éliminée et la phase aqueuse est récupérée pour subir une extraction par l'ajout de 10 mL de méthanol ou d'acétate d'éthyle (v/v) (comparaison de l'efficacité d'extraction de ces deux solvants). Ce nouveau mélange est agité 3 à 5 min puis centrifugé 20 min à 4000 trs/min. Le surnageant a été évaporé à 40°C à l'aide d'un évaporateur (BUCHI Switzerland) (fig.6).

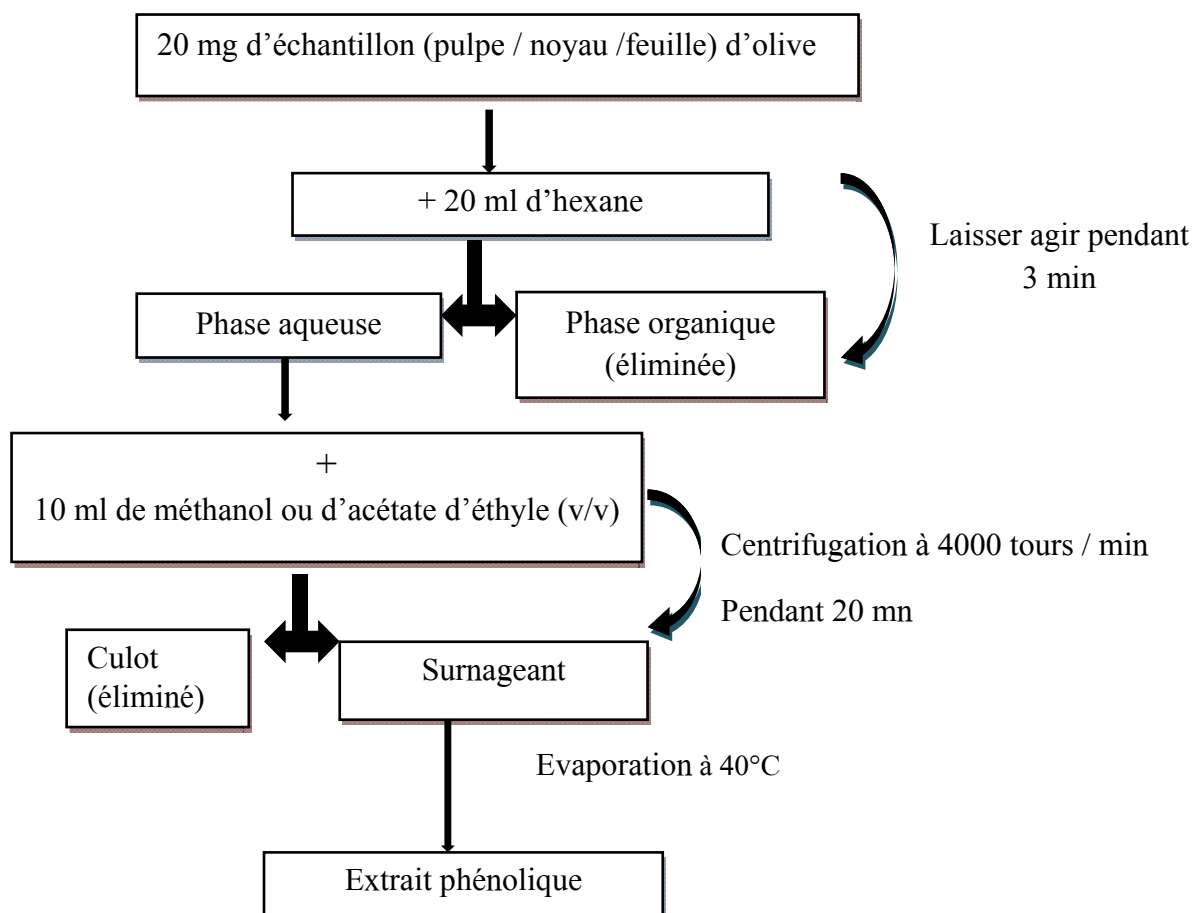


Figure 6: Extraction des polyphénols totaux de différentes parties de l'olivier- (pulpe, noyau et feuille) (méthode de Singleton et Rossi, 1965 modifiée par Lafka et al. 2013).

## II.2.4. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange artisanal et industriel.

### II.2.4.1. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange artisanal (orange pressée).

Le matériel végétal utilisé est un fruit d'orange *Citrus sinensis*. La variété utilisée est de nom valencia, caractéristique d'une forme légèrement ovale avec une peau fine parfois granuleuse de couleur orange claire à chair juteuse. Ce fruit a été récolté pendant le mois d'avril 2013 dans la région de Chlef. L'échantillon est représenté par le jus d'orange pressée.

Dans le but de déterminer le meilleur solvant d'extraction, 3 extractions distinctes des polyphénols totaux du jus d'orange artisanal (orange pressée) ont été réalisées avec de l'eau chaude (60° C), du méthanol/eau (80/20 : V/V) et de l'éthanol/eau (80/20:V/V). Afin d'extraire les polyphénols totaux par l'eau chaude (60° C), chaque échantillon (10 mL) est

placé dans un flacon contenant 20 mL d'eau distillée chaude (60° C) pendant 30 min. Les échantillons sont agités pendant 15 min à l'aide d'un agitateur à barreau magnétique puis filtrés (**Hemada et Klein, 1990 ; Macheix et al. 2005**). L'extraction par les solvants organiques éthanol/eau ou méthanol/eau (80/20:V/V) est réalisée selon le protocole de Macheix et al. 2005. Un volume de 10 mL de jus d'orange est additionné à 20 mL de solvant éthanol/eau ou méthanol/eau (80/20) durant 30 min à 4°C suivi d'une filtration. Le solvant (Éthanol ou méthanol) est ensuite évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapor et la solution obtenue est mise à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

Ces opérations d'extraction de polyphénols totaux de jus d'orange ont été réalisées avec trois répétitions pour chaque solvant utilisé (eau chaude, méthanol: eau (80/20) et l'éthanol : eau (80/20). Ce qui a fait un total de 18 extractions.

#### **II.2.4.2. Extraction des polyphénols totaux du jus d'orange industriel**

L'extraction de jus d'orange de la variété *Citrus sinensis* L. var. Navel late (Huelva, Spain) a été faite en utilisant des extracteurs de type FMC ("Food Machinery Corporation" d'origine espagnole). Par la suite, le produit est tamisé pour éliminer une partie de la pulpe et de l'écorce (clarification). Pour l'extraction des polyphénols totaux à partir de jus d'orange industriel, la même quantité d'échantillon jus d'orange (10 mL) et les mêmes solvants ont été utilisés : l'eau chaude (60° C), le mélange méthanol/eau (80/20 : V/V) et le mélange éthanol/eau (80/20:V/V) que pour le jus d'orange artisanal (jus d'orange pressé).

### **II.3. Dosage des polyphénols totaux**

#### **II.3.1. Principe de la méthode**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Germany) et décrite par **Singleton et Rossi (1965)**. La méthode est basée sur le principe de la réaction du réactif de Folin-Ciocalteu (qui est un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique) avec l'ensemble des composés phénoliques de l'échantillon.

Ce réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale entre 760 et 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols de l'échantillon (**Waterhouse, 2002**).

Une droite étalon est établie avec l'acide gallique pour le dosage des polyphénols de l'olivier, du raisin et de l'orange ; et avec l'acide férulique pour le dosage des polyphénols de dattes. Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique ou en mg d'acide férulique équivalent/100g d'échantillon frais.

### **II.3.2. Préparation de la droite étalon**

La droite étalon de l'acide férulique a été réalisée avec des concentrations graduelles d'acide férulique (30, 50, 70, 80 et 100 µg/mL) obtenues à partir d'une solution mère d'acide férulique à 10% (P/V). Cette droite étalon est réalisée au même moment et dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons.

La droite étalon de l'acide gallique est réalisée avec des concentrations graduelles d'acide gallique (5, 15, 25, 35, 45 et 50 µg/mL) obtenues à partir d'une solution aqueuse mère d'acide gallique à 0.5% (P/V). La teneur en polyphénols totaux des différents extraits d'échantillon, exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique/100g d'échantillon frais, est déterminée par extrapolation.

### **II.3.3. Protocole de dosage des polyphénols totaux**

#### **II.3.3.1. Dosage des polyphénols totaux dans le jus de datte, la pulpe d'olive et le jus d'orange.**

Le dosage des polyphénols totaux des échantillons de jus de datte, d'orange, ainsi que dans la pulpe d'olive a été réalisé selon le diagramme indiqué à la figure 7.

#### **II.3.3.2. Dosage des polyphénols totaux dans la peau, la pulpe et le pépin de raisin**

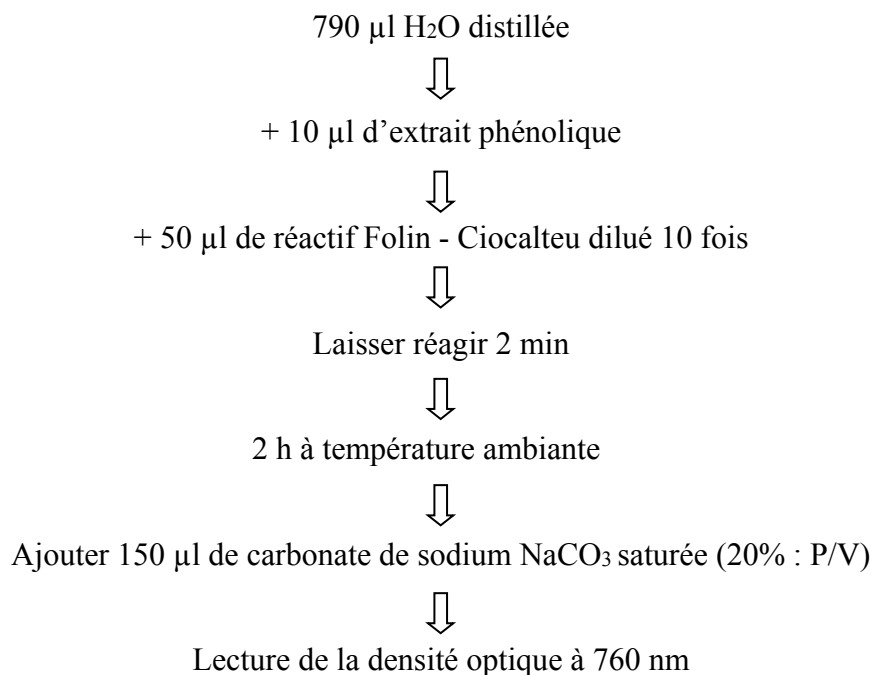
Ce dosage est également réalisé selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** et il a concerné trois types d'échantillons raisin : la peau, la pulpe et le pépin. La composition des milieux réactionnels est reportée au tableau 3. Les mélanges réactionnels ont été incubés 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après quoi, 78 mL d'eau distillée Milli-Q est ajoutée. L'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV-Visible Thermo Multiskan Spectrum (Espagne) et les résultats sont exprimés en mg GAE/100 g de poids frais de l'échantillon.

## **II.4. Dosage des flavonoïdes totaux dans les jus de dattes et d'orange industriel**

### **II.4.1. Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux des différents échantillons (jus de dattes et jus d'orange industriel espagnol Don Simon) est effectué selon la méthode colorimétrique décrite

par **Kim et al., (2003)**.



**Figure 7:** Protocole de dosage des polyphénols totaux dans les échantillons de jus de datte, de la pulpe d'olive et de jus d'orange (**Singleton et Rossi, 1965**).

**Tableau 3:** Composition des milieux réactionnels de la microplaque pour le dosage des polyphénols totaux de raisin

Echantillon	H <sub>2</sub> O distillée Milli-Q (mL)	Volume Echantillon (mL)	Réactif Folin-Ciocalteu (mL)	Volume carbonate de sodium (20%: P/V) (mL)
Blanc	180	0	12	30
Peau	170	10	12	30
Pulpe	160	20	12	30
Pépins	170	10	12	30

La droite étalon est préparée à partir d'une solution mère de quercétine à 5% (P/V) qui a servi à préparer des solutions filles de différentes concentrations (5, 10, 20, 30, 40 et 50  $\mu$ g/mL).

La présence de chlorure d'aluminium dans le milieu réactionnel permet la formation de liaisons avec les doublets libres de l'oxygène des groupements OH des flavonoïdes ; ce qui génère un complexe de couleur jaune dont l'absorbance maximale est enregistré à 430 nm (Worsky et Stalino, 1998).

#### II.4.2. Procédure de dosage

Un volume d'échantillon (extrait de flavonoïdes totaux) de 1mL est additionné à 4 mL d'eau distillée et 0.3 mL de nitrite de sodium 5% (PV) et laisser agir pendant 5 min. On y ajoute 0.3 mL de chlorure d'aluminium à 10 % (P/V) ; et 6 min après, on complète avec 2 mL de NaOH 1M. Le mélange réactionnel est dilué avec 2.4 mL d'eau bidistillée avant d'être agité vigoureusement.

L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (JENWAY « 7305 Spaectrophotometer ». La teneur en flavonoïdes totaux des échantillons est exprimée en mg équivalents quercetine (mg QE) par 100 mL de jus d'échantillon étudié.

#### II.5. Dosage des anthocyanes des dattes

##### II.5.1. Principe de la méthode

Les anthocyanes totales sont déterminées selon la méthode différentielle de pH décrite par Al-Farsi et al. (2005). Les absorbances sont lues à 510 et 700 nm ; et le résultat est exprimé selon l'équation :

$$Ab = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5}$$

$$\text{Anthocyanes totales (mg/ 100g)} = Ab/e.L \times MW \times D \times V/G \times 100$$

Avec : Ab : absorbance à 510 nm ( $A_{510 \text{ nm}}$ ) et à 710 nm ( $A_{700 \text{ nm}}$ ), e : coefficient d'extinction molaire, MW : poids moléculaire des anthocyanes (449.2), D : facteur de dilution, V : volume final (mL), G : poids de l'échantillon (mg), L : largeur de la cuve (1cm) (Al-Farsi et al., 2005).

##### II.5.2. Procédure

Dans une fiole de 25mL, 1mL d'extrait phénolique brut est introduit et le volume est ajusté à 25mL à l'aide d'une solution de KCl à 1.49% (P/V) tamponnée à pH = 1. Dans une autre fiole de 25 mL, 1mL d'extrait phénolique brut est introduit et le volume est ajusté

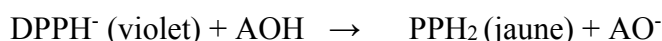
à 25mL à l'aide d'une solution tampon d'acétate de sodium à 1.46% (P/V) tamponnée à pH = 4,5. Les absorbances sont lues à 510 nm et 700 nm pour chaque solution et les résultats sont exprimés en mg d'anthocyanes par 100g de poids frais (Al-Farsi et al., 2005).

## II.6. Détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques

### II.6.1. Méthode de piégeage du radical DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

La mesure du pouvoir antioxydant a été réalisée selon la méthode de piégeage du radical 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) publiée pour la première fois par Blois (1958) et modifiée par Brand-Williams et al. (1995).

Le radical DPPH<sup>•</sup> absorbe à 515nm et sous l'action d'un antioxydant "AOH" qui le réduit en DPPH<sub>2</sub>, cette absorbance diminue jusqu'à atteindre un plateau. Cette cinétique varie avec la nature de l'antioxydant utilisé.



L'absorbance du mélange permet de déterminer le pourcentage de DPPH<sup>•</sup> résiduel à l'équilibre. La solution de DPPH est préparée par dissolution de 23.65g de DPPH dans 1litre de méthanol pour obtenir une solution de DPPH à 60 μM.

L'extrait de plante (0.1 mL) auquel est ajouté 0.1mL d'antioxydant de référence (Trolox : L'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique) est mis en contact avec 0.975mL de solution DPPH 60 μM. Après 60 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la lecture de l'absorbance est faite à 517nm. La lecture est accompagnée d'un blanc constitué de méthanol et de 0.975mL de solution de DPPH.

L'acide ascorbique est utilisée comme composé étalon et le résultat est exprimé en mg d'équivalent de vitamine C (acide ascorbique) (mg VCE) par g d'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition est calculé suivant la relation suivante:

$$(\%) \text{ d'inhibition du DPPH} = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100 \quad \text{avec:}$$

A<sub>0</sub>: L'absorbance du témoin (l'absorbance du DPPH sans l'échantillon)

A<sub>1</sub>: L'absorbance de l'échantillon extrait végétal à analyser.

## II.6.2. Méthode Oxygen Radical Antioxidant Capacity-Fluorescein (ORAC-FL)

Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation de la fluoresceine (Sigma-Aldrich, Germany) comme marqueur fluorescent stable. La fluoresceine est un composé thermostable, résistant à la photo décoloration après exposition à la lumière.

Le 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) - dihydrochloride (AAPH) (Sigma Aldrich, Germany) est utilisé comme générateur des radicaux peroxydes (R-OO). Il est dilué à  $1.28 \times 10^{-2} \text{M}$  dans du tampon phosphate et doit être gardé dans un bain glacé pour être utilisé au maximum dans les 8h qui suivent sa préparation. La solution stock de fluoresceine (1mM) a été préparée dans du tampon phosphate (75mM, pH 7.4) ; elle peut être conservée plusieurs mois à l'obscurité et à 4°C. Le Trolox (Sigma Aldrich, Germany) est un analogue hydrosoluble de l' $\alpha$ -tocophérol et il est utilisé comme antioxydant standard dans la détermination de l'activité antioxydante d'échantillons (Ou et al., 2001).

La fluorescence est déterminée ( $\lambda$  excitation à 490 nm et  $\lambda$  émission à 515 nm) toutes les 5 min pendant 60 min jusqu'à une diminution approximative à 0 ou à une valeur inférieure à 5% de la valeur initiale. Les résultats de l'activité antioxydante des échantillons sont calculés suivant l'équation donnée par Cao et Prior (1999) :

$$\text{ORAC } \mu\text{Moles} = 20 \text{ K} (S_E - S_B) / (S_T - S_B)$$

Avec:

**20**: Concentration de Trolox ( $\mu\text{Moles}$ ); **K**: Facteur de dilution de l'échantillon ; **S**: Surface inférieure de la courbe de diminution de fluorescéine de l'échantillon (**E**), de Trolox (**T**) et du blanc (**B**). Les résultats sont exprimés en équivalent de Trolox ( $\mu\text{Moles}$  de Trolox équivalent par 100 grammes d'échantillon frais).

## II.7. Analyse des extraits phénoliques par chromatographie (HPLC)

### II.7.1. HPLC de l'extrait phénolique de jus de datte

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été utilisée afin d'identifier les principaux composés phénoliques présents dans les fruits étudiés (jus de datte, pulpe, enveloppe et pépins de raisin et le jus d'orange commercial). Les composés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec les pics des solutions standards.

L'appareil utilisé est un HEWLETT PACKARD-Series 1100 (Waldbronn, Allemagne). Les échantillons de l'extrait phénolique de jus de dattes ont subi une centrifugation à 1400 trs/min/10min. Après filtration, le surnageant est mis dans les vials à HPLC (le surnageant est filtré à travers des filtres de 0.45µm : Millipore, Tokyo, Japon).

Longueur d'onde : 270 nm ; le volume des solutions standards à injecter est 10 µl

La solution Blanc est le méthanol (100 %)

Solutions éluantes : H<sub>2</sub>O milli-Q (TFA 0.1% ; acétonitrile (TFA 0.05%)

Volume de l'échantillon à injecter : 30 µl

Type de la colonne : Inertsil ODS-5 C-18 (Waters, Milford, MA, USA).

Les solutions standards pour l'analyse des dattes (acide vanillique, acide P-coumarique, acide férulique, acide gallique et l'acide 4-hydroxybenzoïque) sont préparées par dilution dans le méthanol (même solution qui a servi de blanc) à raison de 100 µg/mL (Majio et al., 2008). L'analyse complète d'un échantillon a duré 56 mn.

## **II.7.2. Analyse chromatographique de jus d'orange industriel et de raisin**

Les échantillons ont été analysés par UHPLC-MS / MS (séries UHPLC-1290 et 6460QQ-MS / MS, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne). La teneur en flavanones individuelles des échantillons de jus d'orange industriel a été déterminée en utilisant des étalons externes (naringenin-7-O-rutinoside, hesperetin-7-O-rutinoside, naringenin-7-O-glucoside, hesperetin-7-O-glucoside, isosakuranetin-7-O-rutinoside, naringenin, homoeriodictyol, hesperetin et l'isosakuranetin).

Brièvement, un volume (10 mL) de chaque échantillon a été centrifugé à 4500xg pendant 10 min pour séparer le surnageant et le culot. Une aliquote du surnageant (1 mL) a été filtrée à travers un filtre PVDF Millex de 0,45 µm (Millipore, Tokyo, Japon) et directement injecté (10 µL) dans l'équipement. Le culot a ensuite été extrait avec du DMSO (500 µL) et a été filtré à travers un filtre PVDF Millex de 0,45 µm et injecté directement (10 µL) dans l'appareil.

La séparation des analyses a été réalisée sur une colonne C18 (150 mm x 2.1mm, 1.7µm, Waters, Milford, MA, USA) en utilisant une phase mobile constituée de deux solvants A et B :

Solvant A = mélange eau / acide formique 99.1/0.1 : V/V).

Solvant B = mélange acétonitrile / acide formique (99.1/0.1: V/V)

## **II.8. Procédure et conditions de fermentation du jus de dattes et du jus d'orange industriel espagnol « Don Simon »**

L'objectif principal de cette partie de l'étude est de caractériser le profil des composés bioactifs et voir si la fermentation alcoolique peut influencer le contenu phénolique et l'activité antioxydante, tout en étudiant leur évolution au cours de la progression de la fermentation.

### **II.8.1. Fermentation du jus de dattes**

Le jus de dattes Deglet-Nour algérienne a été fermenté par la souche *Saccharomyces cerevisiae*VDH2 d'une collection espagnole de souches (CECT: Colección Española de Cultivos Tipo).

Au début, 25 mL de ce milieu ont étéensemencés par la souche et incubés à 30°C pendant 48h sous agitation régulière. Ce moût a servi à l'ensemencement du milieu principal de fermentation (250 mL).

Les paramètres mesurés au cours des différentes étapes de fermentation de jus de dattes sont : les polyphénols et les flavonoides totaux. Les concentrations ont été déterminées par extrapolation sur des droites étalons établies pour chaque composé analysé.

### **II.8.2. Fermentation de jus d'orange industriel**

L'espèce utilisée dans cette fermentation alcoolique est la levure *Pichia kluyveri* issue d'une collection de souches d'origine espagnole à Valence (CECT : Colección Española de Cultivos Tipo). Cette souche a été préalablement testée sur le plan de ses performances de croissance en présence de diverses sources carbonées et en particulier sur milieu à base de jus d'orange. Le paramètre « niveau de remplissage du fermenteur » équivalent à approximativement 82 % a aussi préalablement été déterminé comme étant optimal pour le bon déroulement de cette fermentation qui a été effectuée en anaérobiose sans agitation et à 20°C pendant 15 jours.

Les paramètres mesurés au cours des différentes étapes de la fermentation de jus d'orange sont la concentration en polyphénols totaux, les flavonoides et les flavanones totaux ainsi que l'activité antioxydante. Les concentrations ont été déterminées par extrapolation sur des droites étalons établies pour chaque composé analysé.

## **II.9. Analyse statistique des résultats**

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse de la variance est effectuée avec le test ANOVA en utilisant le logiciel R Core Team 2018, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.

La comparaison des moyennes est effectuée à un seuil de 5%. La différence est considérée comme significative si  $P < 0.05$ .

# **CHAPITRE III.**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre III. Résultats & Discussion

### III.1. Teneurs en polyphénols totaux des différentes sources végétales

L'extraction des composés phénoliques est souvent effectuée en utilisant divers solvants comme l'eau, les solvants organiques ou encore le mélange des deux. L'utilisation d'un solvant unique peut être inefficace pour extraire toutes les classes des polyphénols (**Shi et al., 2003**). Le choix du solvant dépend à la fois de la nature de la plante et des éléments à extraire.

Dans une étude sur une plante médicinale d'Asie du Sud-Est, *Limnophila aromatica*, **Diem Do et al., (2014)** avaient testé plusieurs concentrations de différents solvants (eau, éthanol, méthanol et acétone) d'extraction des composés phénoliques et avaient constaté que l'extrait obtenu avec de l'éthanol pur présentait l'activité antioxydante totale la plus élevée corrélée avec la plus forte teneur en polyphénols et en flavonoïdes dosés dans cet extrait.

Dans cette même optique d'étude de l'efficacité des solvants d'extraction, **Iloki Assanga et al. (2015)** ont montré que parmi quatre solvants testés, l'acétone a donné le meilleur rendement d'extraction des polyphénols de *Bucida buceras* et *Phoradendron californicum* dont l'activité antioxydante, mesurée par le test DPPH, s'est révélée la plus forte.

Les concentrations les plus élevées de composés phénoliques totaux et des activités antioxydantes ont été trouvées dans des mouts de raisins macérés pendant 15 jours (**Kokabey et al., 2016**). En général, le rendement d'extraction des polyphénols est positivement corrélé avec la durée de macération.

#### III.1.1. Teneurs en polyphénols totaux de la pulpe de dattes

Les concentrations en polyphénols totaux de tous les échantillons étudiés ont été déduites à partir d'une régression linéaire ( $y = ax + b$ ) d'une droite étalon de l'acide férulique (annexe 1). Deux solvants (l'eau distillée et le mélange acétone-eau : 70V/30V) ont été utilisés pour extraire les polyphénols totaux à partir de trois variétés de dattes (Deglet-Nour, Ghars et Ajwa). Le rendement d'extraction des polyphénols (en mg d'équivalent acide férulique:AFE/100 g de poids frais) à l'eau distillée chaude (60°C) a donné des

concentrations de  $97.16 \pm 1.25$  pour la variété Deglet-Nour, de  $73.81 \pm 0.81$  pour la variété Ghars et de  $64.77 \pm 0.42$  pour la variété Ajwa (tableau 4).

Tableau 4: Polyphénols totaux (mg FAE/100g) de pulpe de datte fraîche de trois variétés de dattes: Deglet-Nour; Ghars et Ajwa extraits à l'eau distillée et au mélange acétone-eau (70/30:V/V).

Variétés de dattes	Polyphénols totaux extraits à l'eau distillée chaude (60°C) (mg FAE/100g de poids frais de pulpe de datte)	Polyphénols totaux extraits au mélange Acétone/eau (70/30:V/V) (mg FAE/100g de poids frais de pulpe de datte)
Deglet- Nour	$97.2 \pm 1.25$	$246 \pm 2,0816$
Ghars	$73.8 \pm 0,81$	$86.6 \pm 1,06$
Ajwa	$64.8 \pm 0,42$	$81.1 \pm 0,88$

Dans une étude comparative de rendements d'extraction en polyphénols de dattes sèches et fraîches avec 7 solvants différents, **Al- Farsi et al. (2005)** ont constaté que le mélange acétone-eau (70/30 : V/V) était le plus efficace et permettait l'obtention de la plus forte activité antioxydante de cet extrait.

Dans la présente expérimentation, ce même mélange de solvants (acétone/eau : 70/30 : V/V) a également donné le meilleur rendement d'extraction des polyphénols de la pulpe de datte Deglet Nour. Cette observation est en accord avec celle de **Al-Turki et al. (2010)** qui ont obtenu des concentrations de 507 mg d'équivalent acide gallique: GAE/100g de poids frais. Par ailleurs, **Karasawa et Otani (2012)** ont rapporté des teneurs en polyphénols totaux de 30.07 mg FAE /100 g de poids frais de pulpe de datte. **Borchani et al. (2011)** ont rapporté que la teneur en polyphénols totaux de la pulpe d'une variété de datte tunisienne (freeze-drying) extraits avec l'acétone/eau (70V/30V) était de l'ordre de 329 mg FAE /100g poids frais.

**Al-Farsi et al. (2005)** avaient rapporté que les dattes fraîches constituent une bonne source d'antioxydants en les comparant avec les variétés sèches. Ces mêmes auteurs ont rapporté des valeurs de polyphénols totaux situées entre 134 et 280 mg FAE/100g poids frais.

La majorité des auteurs ont confirmé qu'il y a une diminution de la teneur en polyphénols totaux de dattes selon le stade de maturation. Selon **Allaith (2008)**, cette teneur était de 196.8 et 116.7 mg FAE/100g de pulpe de datte fraîche. Cet auteur a rapporté que les concentrations les plus élevées en acides férulique et p-coumarique sont une caractéristique spécifique de la datte.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Al-Farsi et al. (2005)** ; **Brad (2008)** ; **Behija Safi et al. (2009)** ; **Borchani et al. (2011)** ; **Benmeddour et al. (2013)** et **Kchaou et al. (2013)** qui ont quantifié les polyphénols totaux dans la datte le raisin, l'oignon et la pomme. Par ailleurs, le contenu phénolique total dans les dattes fraîches est six fois plus élevé que dans les dattes sèches (**Yasin et al. 2015**).

### **III.1.2. Teneurs en polyphénols totaux de raisin**

Pour chaque variété analysée, les polyphénols totaux ont été dosés pour les trois parties du fruit : peau, pulpe et pépins. Les teneurs en polyphénols totaux de peau, de pulpe et de pépin de différentes variétés de raisins rouges : (GN) (Lloar et Porrera) ; (CS) (Mediona, Nerola) et *Merlot* (MT) (Trempe, Mediona, Penedes) et blancs : *Chardon* (CH) (T et JL) sont mesurées suivant une droite étalon (Annexe 2) et sont reportées sur les figures 8, 9 et 10.

Les figures 8, 9 et 10 montrent que quelque soit la partie de raisin considérée (peau, pulpe ou pépin), les teneurs en polyphénols totaux dans le raisin rouge étaient significativement plus élevées ( $p < 0.05$ ) que celles du raisin blanc. La peau de raisin rouge C S renferme la teneur la plus élevée en polyphénols totaux ( $1588.24 \pm 65.84$  mg GAE/100g du poids frais).

Les variétés de raisins blancs sont beaucoup moins riches en polyphénols totaux ( $154.61 \pm 11.97$  pour la variété Chardon). Le même constat peut être fait pour les polyphénols totaux de la pulpe et de pépin du raisin rouge qui sont présents en plus grande quantité par rapport à ceux du raisin blanc.

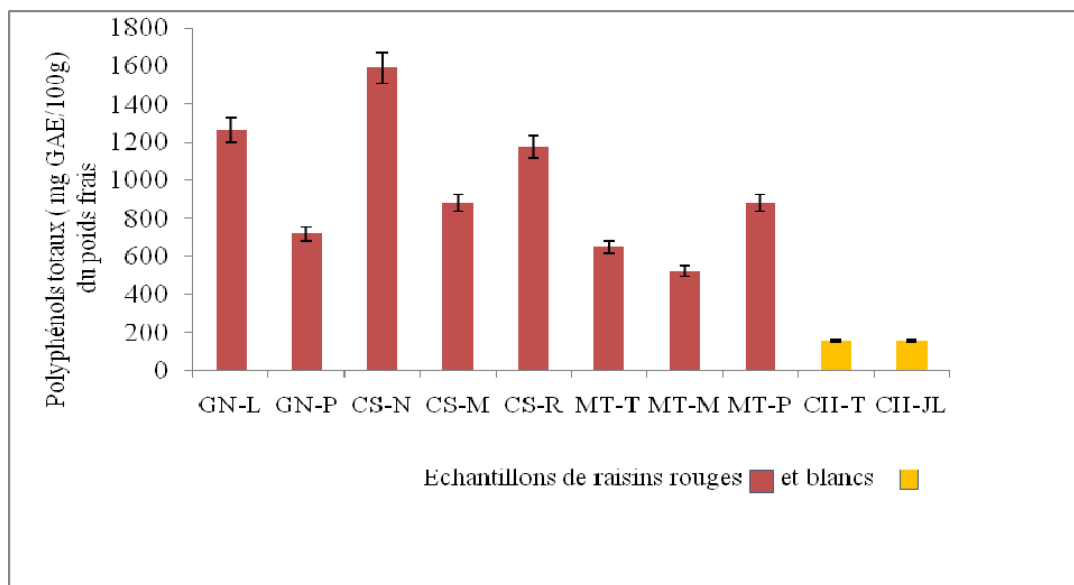


Figure 8 : Polyphénols totaux de peau de raisins rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais des raisins rouges et blancs.

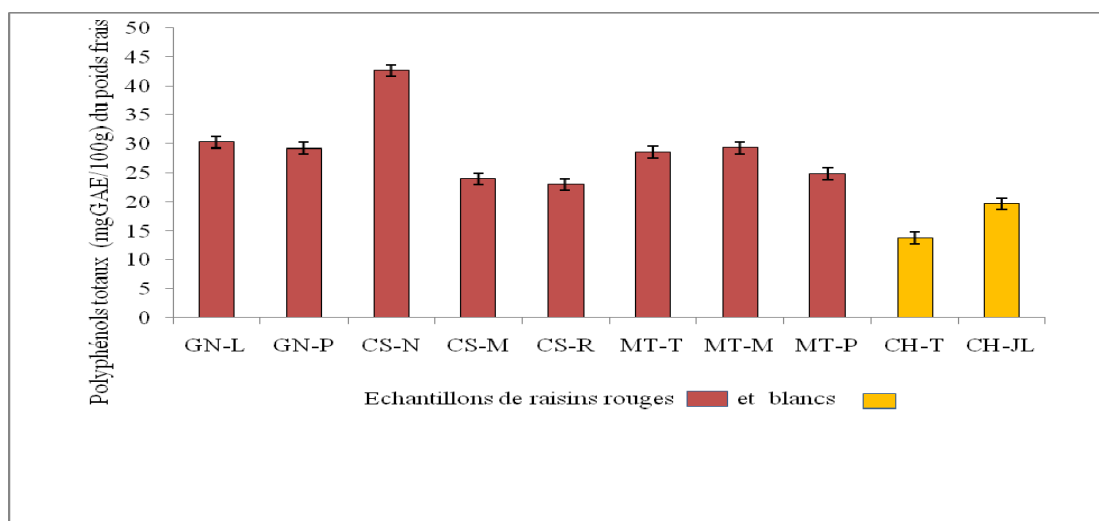


Figure 9 : Polyphénols totaux de pulpe de raisins rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais de pulpe

Nos résultats sont analogues à ceux de Shi et al. (2003) qui avaient rapporté que quelque soit la variété de raisin, l'extrait phénolique total dans ce fruit est représenté par seulement 10% ou moins dans la pulpe, 60 à 70 % dans le pépin et 28 à 35% dans la peau.

Ces mêmes auteurs ont rapporté que ce contenu phénolique dépend de différents facteurs tels que les conditions climatiques, le site de vie de la plante et les stades de maturation du fruit.

Les teneurs en composés phénoliques totaux de raisin mesurées dans la présente étude sont beaucoup plus élevées que celles rapportées par **Katalinic et al. (2010)** pour le raisin rouge ( $875 \pm 3.62$  mg GAE/100g de poids frais) et blanc ( $185.1 \pm 10.89$  mg GAE/100g de poids frais).

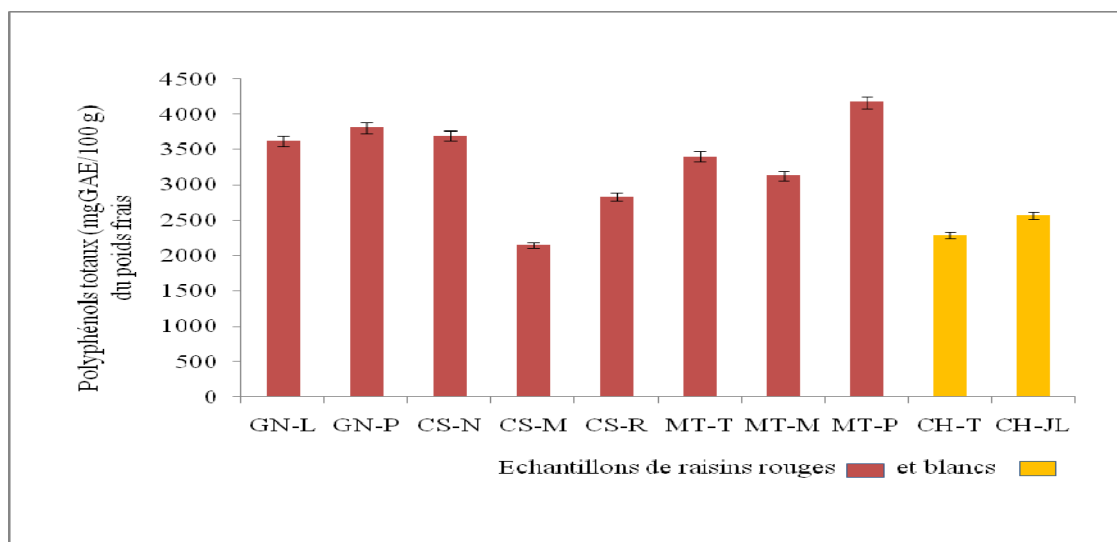


Figure 10 : Polyphénols totaux de pépin de raisin rouge et blanc mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimés en mg GAE/100 g du poids frais de pépins.

Les teneurs en composés phénoliques totaux de raisin rouge mesurés dans ce travail et exprimées en GAE/100g du poids frais) pour la peau ( $1588.24 \pm 65.84$ ) et pour la pulpe ( $42.67 \pm 3.1$ ) sont plus élevées que celles publiées par **Singha et Das (2015)** pour le raisin rouge de variété *Red globe* (peau:  $140.67 \pm 9.26$  et pulpe:  $38.67 \pm 2.6$  mg GAE/100g du poids frais).

**Nile et al. (2013)** ont rapporté la variation inter-variétale du contenu phénolique total de la peau de raisin rouge : plus de 400mg/100g chez la variété Flouxa, plus de 300mg/100g chez les deux variétés Campbell Early et Tamnara et plus de 250mg/100g chez deux autres variétés Globe et Seedless et moins de 60mg/100g chez les variétés Italia et Delaware.

**Nile et al. (2013)** ont défini des fourchettes de valeurs valables pour la pulpe ou la peau de différentes variétés de raisin qui s'étalent de 47.6 à 310 mg d'équivalent acide

gallique / 100 g de poids frais pour les polyphénols et de 46.6 à 73.33 mg d'équivalent catéchines/100g de poids frais pour les flavonoïdes.

**Jiang et Zhang (2012)** ont comparé les composés phénoliques et les propriétés antioxydantes des vins de *Cabernet sauvignon* et de *Merlot* de quatre régions viticoles en Chine ; ils ont conclu que leur teneur en composés phénoliques et leur pouvoir antioxydant dépendaient de la région viticole. Selon ces mêmes auteurs, les teneurs en polyphénols totaux varient de 1129.8 à 2710.4 mg GAE / L dans le vin Cabernet sauvignon et de 860.2 à 1 656.5 mg GAE / L dans le vin Merlot.

Par ailleurs, **Nile et al. (2013)** trouvent que la forte teneur en composés phénoliques du vin rouge est due à l'incorporation de la peau dans le jus de raisin en fermentation pendant la production. Les composés phénoliques représentent le troisième constituant le plus abondant dans les raisins après les glucides et les acides.

Une autre étude, celle de **Doshi et al. (2015)**, a rapporté des teneurs élevées en polyphénols totaux (95.8mg/mL), en flavonoïdes (30.5mg/mL) et en flavan-3-ols (21.8 mg/mL) des extraits de pépins ; ainsi qu'en anthocyanes totaux (4.9 mg/mL) d'extraits de peau de la variété de raisin rouge « Pusa Navarang ».

Selon **Jinlu Li et al. (2016)**, la variabilité de la teneur en anthocyanes est plus faible sous le climat méditerranéen où la température est plus élevée et les précipitations rares. Les facteurs environnementaux comme la lumière du soleil, la température et l'humidité de l'air auxquels la peau des baies est directement exposée varient plus fréquemment. Des impacts climatiques supplémentaires sur les composés phénoliques peuvent influencer la relation positive entre l'exposition au soleil et l'augmentation de l'accumulation de flavonols. Ces auteurs ont conclu aussi que la teneur en composés phénoliques augmente avec la densité de raisins sur la grappe.

### **III.1.3. Polyphénols totaux de la pulpe et du noyau de l'olivier**

La concentration en polyphénols totaux est déterminée grâce à une régression de l'équation de la droite  $y = 0,0772 x + 0,0052$  avec  $R^2 = 0,9824$  et est exprimée en mg d'équivalent acide gallique (GAE)/ 100 g du poids frais (Annexe 3).

Dans cette étude, deux solvants ont été utilisés pour extraire les polyphénols à partir des olives, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les teneurs les plus élevées en composés phénoliques des échantillons d'olive ont été extraits à l'acétate d'éthyle et sont indiquées sur la figure 11.

Il apparaît que la variété d'olive sigoise renferme nettement plus de polyphénols que la variété chemlal dans la pulpe ( $103.77 \pm 5,042$  vs  $49.79 \pm 3.04$  mg GAE/100g de poids frais) et dans le noyau ( $111.12 \pm 0.91$  vs  $79.37 \pm 1.57$  mg GAE/100g de poids frais).

La Concentration en composés phénoliques totaux (mg GAE/100g poids frais) et en flavonoïdes (mg QE/ 100 g poids frais d'extrait) contenus dans l'extrait de feuilles de *Olea europaea* L. et de Callus Culture cv. corababra est, respectivement, de 31.7 et de 5.5 **(Rodríguez-Hernandez et al., 2018)**.

Ces différences dans les résultats peuvent être dues à la variabilité dans les composés phénoliques des différentes variétés d'olive où certaines molécules peuvent exister en concentration élevée dans une variété et non dans une autre **(Talhaoui et al., 2015)**.

Une autre étude réalisée par **Dekdouk et al. (2015)** sur deux variétés d'olive (Sigoise et Coratina) a rapporté des concentrations respectives en polyphénols totaux de  $147.13 \pm 6.94$  et  $290 \pm 13.21$  mg GAE/100g du poids frais.

Nos résultats sur les teneurs en polyphénols totaux des variétés d'olive sont situés dans l'intervalle des résultats rapportés par **Burri et al. (2017)** (89 à 153 mg GAE/100g du poids frais) et par **Kouka et al. (2017)** (30-351 mg GAE/ 100g poids frais).

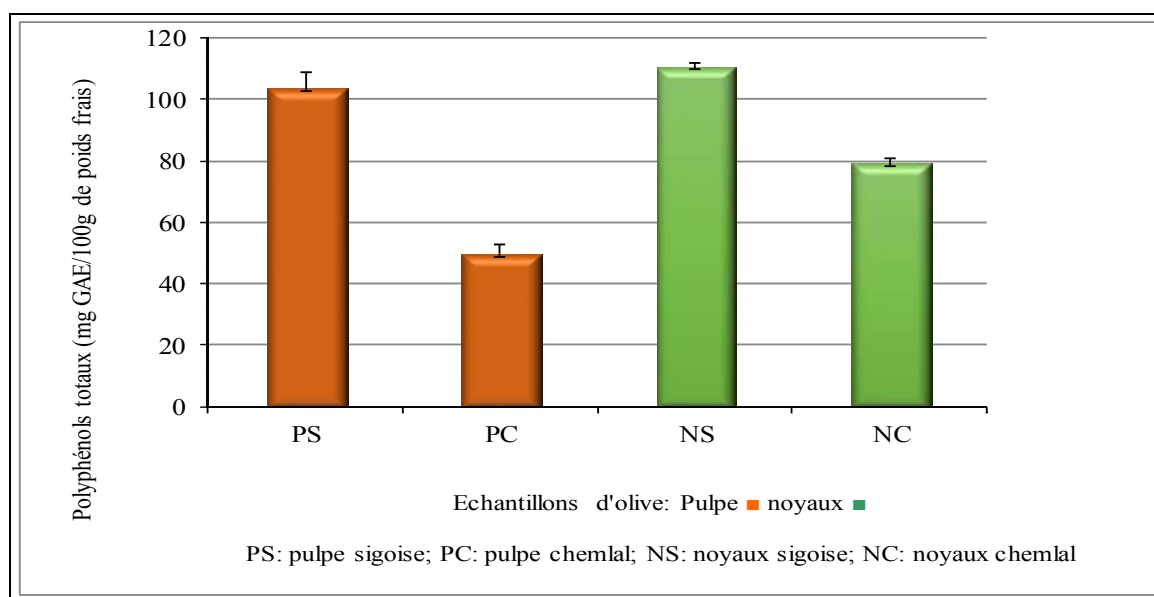


Figure 11: Polyphénols totaux extraits à l'acétate d'éthyle (mg GAE/100 g de poids frais) de pulpe et de noyau des deux variétés d'olivier : Sigoise et Chemlal.

L'effet bénéfique de l'olivier a été étudié par **Gorzynik-Debicka et al. (2018)** qui ont montré que l'extrait phénolique des feuilles de l'olivier est capable d'abaisser la tension artérielle chez les animaux et d'augmenter le flux sanguin dans les artères coronaires. Ces auteurs ont mené en parallèle des essais sur des volontaires humains auxquels ils ont administré 500 mg de polyphénols de feuilles d'olivier à raison de deux fois /jour et ont constaté une efficacité dans l'abaissement de la tension artérielle plus élevée que celle de médicaments classiques utilisés à cet effet.

Dans le même contexte, **Saibandith et al. (2017)** ont rapporté que lorsque les polyphénols d'olivier sont consommés à des doses appropriées, ils induisent une réduction marquée de la pression artérielle chez les sujets hypertendus. Ils induisent également une amélioration de la glycémie dans le prédiabète et une amélioration des marqueurs de la peroxydation lipidique.

#### III.1.4. Teneurs en polyphénols totaux du jus d'orange traditionnel (orange pressée) et industriel.

Les teneurs des extraits aqueux en polyphénols totaux des jus d'orange artisanal (orange pressée) et industriel obtenues dans ce travail sont, respectivement, de l'ordre de  $56.633 \pm 3.008$  et  $44.966 \pm 2.99$  mg GAE/100 mL. Le jus d'orange traditionnel renferme 2 fois plus de

polyphénols totaux que celui analysé par **Zamantha et al. (2010)** ( $28.55 \pm 9$  mg GAE/100 ml).

Le contenu phénolique total extrait par le mélange éthanol-eau de jus d'orange traditionnel et industriel est, respectivement, de l'ordre de  $89.8 \pm 3.61$  et à  $76.933 \pm 1.77$  mg GAE/100 mL de jus. Les résultats du contenu phénolique d'extraits aqueux (H<sub>2</sub>O), du méthanol-eau (MTOH) (80 :20) et éthanol-eau (ETOH) (80 :20) sont représentés sur la figure 12.

Le rendement d'extraction des polyphénols totaux de jus d'orange traditionnel et industriel par le solvant méthanol-eau (80:20) a été évalué respectivement à  $68.520 \pm 0.90$  et à  $63.633 \pm 0.68$  mg GAE/ 100 mL de jus. En revanche, **Hegazy et Ibrahim (2012)** avaient considéré que l'éthanol pur était un solvant d'extraction des polyphénols totaux de jus d'orange aussi efficace que le méthanol pur.

Dans cette étude, les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux ont été obtenues par le mélange des solvants éthanol:eau pour les deux extraits d'orange (traditionnel et industriel) (fig. 12 et 13). Le contenu phénolique total de l'extrait éthanol-eau de jus d'orange industriel est de  $79.3 \pm 0.50$  mg GAE / 100 mL. Ce résultat est comparable avec les résultats de **Tounsi et al. (2011)** qui ont rapporté des valeurs de 78.467 mg GAE /100 mL de jus de la variété d'orange *Citrus aurantium* (L.) extrait par le mélange éthanol/eau.

**Yamile et al. (2017)** ont rapporté que la variété d'orange a une influence significative ( $P < 0,005$ ) sur le contenu phénolique total qui variait de  $52.1 \pm 6$  (Campbell Valencia) à  $80 \pm 11$  mg d'acide gallique / 100 mL (Lane Late Navel). Cette influence significative ( $P < 0,005$ ) a

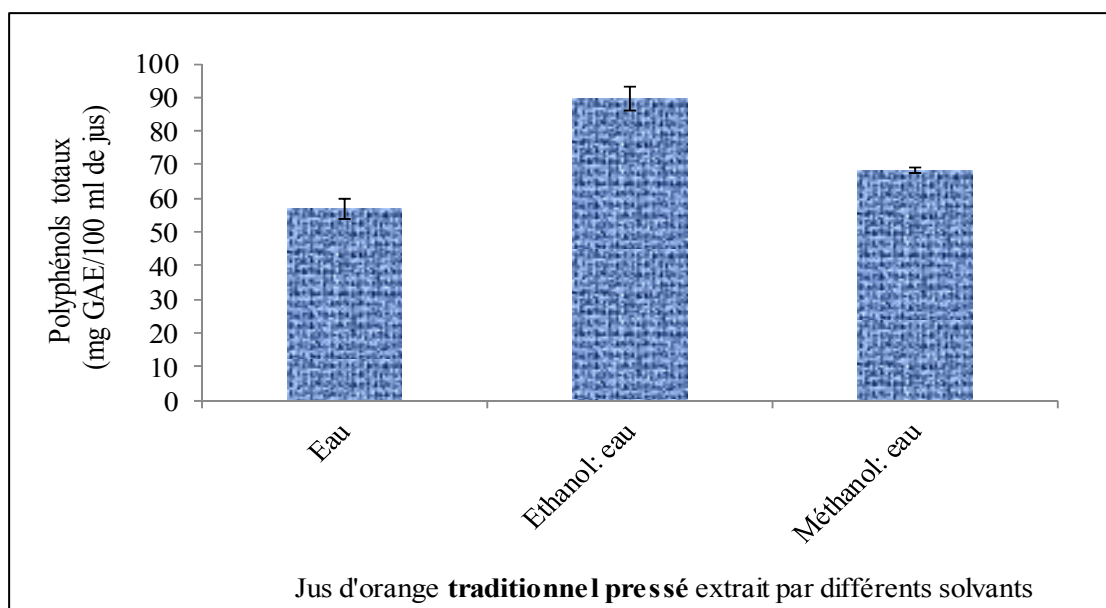


Figure 12: Contenu phénolique total (mg GAE/100mL) d'extraits aqueux (H<sub>2</sub>O), éthanol-eau (ETOH) (80/ 20 : V/V) et méthanol-eau (MTOH) (80/ 20 : V/V) du jus d'orange traditionnel (orange pressée).

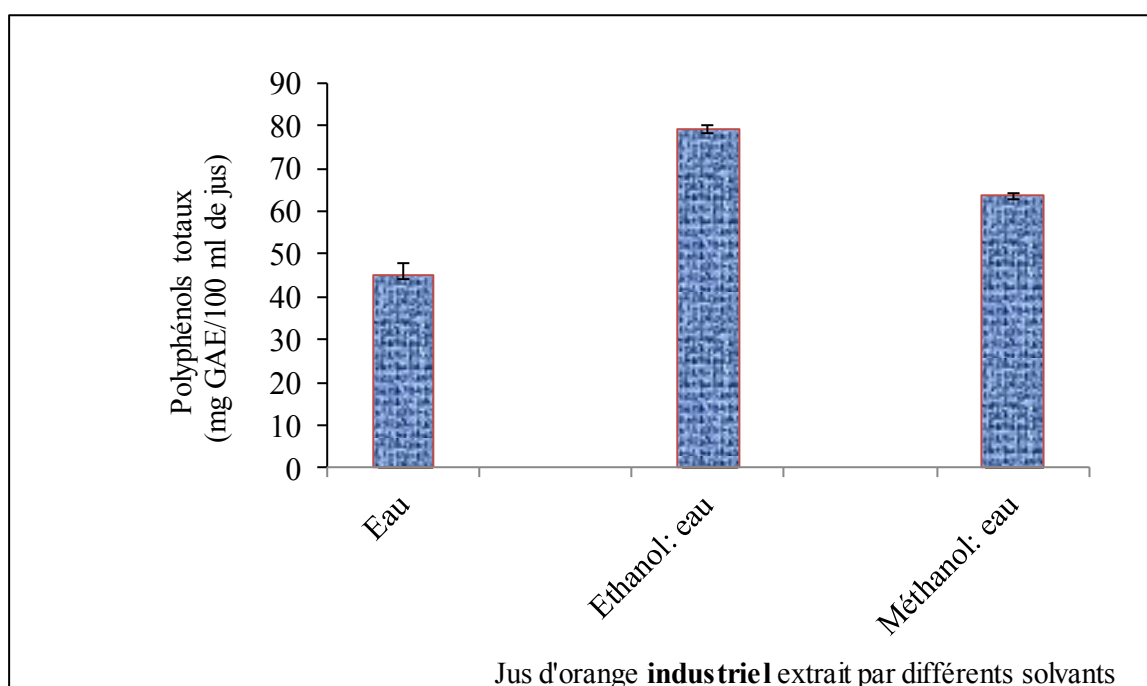


Figure 13: Contenu phénolique total (mg GAE/100mL) d'extraits aqueux (H<sub>2</sub>O), méthanol-eau (MTOH) (80 :20) et éthanol-eau (ETOH) (80 :20) de jus d'orange industriel.

été enregistré aussi lorsqu'ils ont étudié l'activité antioxydante par la méthode ABTS de jus de ces deux variétés d'orange.

Il est prudent de lire ces valeurs avec un regard critique tourné vers la reproductibilité des manipulations et au manque de lisibilité dans le mode d'expression des résultats qui sont parfois indéchiffrables dans certaines publications.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de jus d'orange industriel (79.3 mg/100mL) est supérieure à celle rapportée par **Canterino et al. (2012)** (13.5mg /100mL) pour le jus d'orange. Le contenu phénolique total des jus naturels fraîchement pressés est compris entre 36.1 et 114.7 mg /100mL (**Rapisarda et al., 1999**).

L'optimisation d'une méthode d'extraction des polyphénols de la pulpe d'orange douce (*Citrus sinensis* L.) a été étudiée aussi par **Iglesias-Carres et al. (2019)**, qui ont rapporté que les teneurs en polyphénols les plus élevées (20 mL/g) ont été obtenues par des extractions à chaud (55°C) utilisant des mélanges de solvants méthanol-eau (90V/10V) ou éthanol-eau (90V/10V).

Le jus d'orange industriel se distingue par sa haute densité nutritionnelle et sa faible teneur énergétique par rapport aux autres jus et boissons non enrichis (**Rampersaud, 2007**). Le jus d'orange industriel contient plus de 60 composés phytochimiques biologiquement actifs, en l'occurrence des composés phénoliques, des pigments caroténoïdes et de la mélatonine (**Tounsi et al., 2011**).

Les principales familles de composés phénoliques présentes dans le jus d'orange sont les flavanones, les flavones et les acides hydroxycinnamiques (**Gil-Izquierdo et al., 2001 ; Abad-Garcia et al., 2012**). Les acides benzoïques ont également été identifiés dans le jus d'orange (**Swatsitang et al., 2000**).

Une étude menée par **Tounsi et al. (2011)** sur le jus industriel a montré une différence variétale de l'orange dans le contenu phénolique du jus extrait de deux variétés d'orange distinctes qui a été estimé à 25.5 et à 78.4 mg/100mL chez *Citrus Sinensis* et *Citrus aurantium*, respectivement. Selon ces auteurs, le contenu phénolique total du jus d'orange peut varier en raison des différences inter-espèces et variétales d'orangers, ainsi que celles dues à la maturité des oranges et aux procédés technologiques utilisés pour obtenir le jus.

**Klimczak et al. (2007)** ont rapporté des teneurs en polyphénols totaux de deux jus d'orange (deux marques différentes) industriels de 68.4 et 63.5 mg/100 mL; alors que le niveau de ces teneurs dans les jus traditionnels fraîchement pressés fluctuent entre 36.1 et 114.7 mg/100mL (**Rapisarda et al., 1999 ; Seeram et al., 2008**).

### III.2. Teneurs en anthocyanes de la pulpe de datte

Les résultats de dosage des anthocyanes dans les extraits phénoliques des trois variétés de dattes (exprimés en mg cyanidine 3-glucoside équivalent /100g poids frais) indiquent des valeurs de l'ordre de  $0.91 \pm 0.14$  pour Deglet-Nour,  $0.84 \pm 0.04$  pour Ajwa et  $0.56 \pm 0.09$  pour Ghars. La comparaison des moyennes en anthocyanes extraites à l'acétone de la pulpe de trois variétés de dattes fraîches ont montré des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les variétés Ajwa et Ghars surtout. Ces résultats sont analogues à ceux rapportés par **Al-Farsi et al. (2005)** (0.24 à 1.52 mg cyanidine équivalent /100g de poids frais de pulpe de dattes).

Ces auteurs précisent que c'est la variété de datte « Khasab » qui est la plus riche en anthocyanes (1.52 mg équivalent cyanidine/100g de poids frais de pulpe), suivie de la variété « Fard » (0.92 mg équivalent cyanidine/100g de poids frais de pulpe) et de la variété Khalas (0.24 mg équivalent cyanidine /100 g de poids frais de pulpe).

Selon ces mêmes auteurs, ces différences de concentrations en anthocyanes sont directement liées à la couleur de chaque variété de dattes étudiée. Les dattes de variété « Khasab » et « Fard » sont de couleur rouge et la variété « Khalas » de couleur jaune due à la présence d'une forte teneur en caroténoïdes.

Les teneurs en anthocyanes mesurées pour les trois variétés de dattes dans le présent travail ( $0.91 \pm 0.145$ ,  $0.84 \pm 0.040$  et  $0.56 \pm 0.089$  mg équivalent cyanidine /100 g du poids frais) sont comparables à celles rapportées par **Samad et al. (2016)** pour la variété de datte « mabroom » ( $0,54 \pm 0,15$  mg équivalent cyanidine / 100 g poids frais).

En revanche, ces auteurs rapportent des teneurs en anthocyanes ( $3.18 \pm 1.40$  mg équivalent cyanidine/100 g poids frais) chez la variété de datte « mariami » 3.5 à plus de 5.6

fois plus élevées que celles trouvées dans ce travail. Ces auteurs ont rapporté aussi que l'évolution quantitative des extraits d'anthocyanes et de polyphénols de la pulpe de dattes au cours de 5 semaines de stockage à 20 et 4°C a montré une nette augmentation aux deux températures d'entreposage. Il en a été de même en ce qui concerne l'activité antioxydante des extraits. Selon **Samad et al. (2016)**, l'augmentation de la teneur en anthocyanes au cours du stockage de l'extrait pourrait être associée à la diminution du pH de l'extrait.

Certains composés anthocyaniques tels que la cyanidine-3-glucoside et la pétanine existent principalement sous une forme cationique désignée « flavylium » à des pH compris entre 1 et 3 où au moins 90% de la couleur restait stable pendant 60 jours. Cette stabilité pourrait également être due à la présence de proanthocyanines de couleur stable résultant de la réaction des anthocyanes avec d'autres composés tels que l'acide cinnamique, qui prévaut dans les fruits du palmier dattier (**Wu et al., 2018**).

En dehors de ces hypothèses, l'augmentation considérable des anthocyanes dans l'extrait pourrait également être due à une auto-association, une co-pigmentation et une acylation. En d'autres termes, à plus basse température, les réactions chimiques entre les anthocyanes et les acides cinnamiques sont généralement plus lentes (**Guimarães et al., 2018**).

Néanmoins, hypothétiquement, le degré d'association et d'empilement des anthocyanes peut entraîner des différences significatives entre les augmentations de la teneur en anthocyanes (**Guimarães et al., 2018**).

### **III.3. Résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des différents fruits**

#### **III.3.1. Activité antioxydante d'extraits phénoliques de pulpe de dattes**

Les résultats de l'activité antioxydante d'extraits phénoliques de pulpe des trois variétés de dattes mesurée par la méthode de l'ORAC-FL indiquent que c'est l'extrait de pulpe de la variété Deglet-Nour qui exerce le pouvoir antioxydant le plus élevé ( $5379.66 \pm 191.70$   $\mu$ Moles trolox / 100 g de poids frais) par rapport aux extraits des variétés Ajwa ( $4041 \pm 160.72$ ) et Ghars ( $2709 \pm 71.29$ ).

Selon les travaux de **Takaedi et al. (2014)**, l'activité antioxydante (exprimée en  $\mu\text{Moles Trolox} / 100\text{g}$  poids frais) des variétés *Deglet-Nour* et *Khouet Kenta* mesurée par la méthode ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) était de l'ordre de 1148.11 et de 866.82, respectivement. **Benmeddour et al. (2013)** ont rapporté que l'extrait phénolique de pulpe de la variété *Deglet-Nour* inhibait 60% du DPPH en comparaison avec le taux d'inhibition de 52.02 % obtenu avec la variété *Hemeira*.

L'activité antioxydante (exprimée en mg d'équivalent acide ascorbique/100g de poids frais) de la variété *Deglet-Nour* évaluée par la méthode DPPH s'est révélée égale à 230 selon **Mrabet et al. (2012)** et à 108.98 d'après **Kchaou et al. (2013)**. Par ailleurs, il a été rapporté que la capacité antioxydante totale (exprimée en  $\mu\text{Moles équivalent Trolox (TE)}/100\text{ mL}$ ) du jus d'orange (192) et du thé vert (497) évaluée par la méthode DPPH est beaucoup plus faible que celle mesurée par l'ORAC-FL pour ces mêmes boissons (690 et 537, respectivement). La capacité antioxydante totale d'un aliment peut refléter les effets cumulés de tous les antioxydants plutôt que celle d'un seul antioxydant (**Tabart et al., 2009; 2010**).

Le pouvoir antioxydant d'extraits de pulpe de datte a été déterminé par plusieurs méthodes et exprimée de différentes manières.

- Expression en % de DPPH inhibé : datte *Deglet-Nour* : **Awad et al. (2011)** : 40 à 50, **Hasan et al. (2010)** : 87.66 à 94.69, **Kchaou et al. (2013)** :  $108.98 \pm 5.3$ , **Benmeddour et al. (2013)** :  $60 \pm 1.4$ , **Mohamed et al. (2014)** : 24.5 à 58.5. Datte sèche : **Shahdadi et al. (2015)** : 45
- Expression en  $\mu\text{Moles trolox}/100\text{g}$  de poids frais de datte *Deglet-Nour* :
  - Selon le test DPPH : datte *Deglet-Nour*: **Behija Safi et al. (2009)**: 15.3
  - selon le test ABTS: datte *Deglet-Nour* : **Allaith et al. (2012)**:  $121.76 \pm 0.31$
- Expression en  $\mu\text{Moles FeSO}_4/100\text{g}$  de poids frais selon le test FRAP: datte *Deglet Nour* : **Allaith et al. (2012)**:  $3.48 \pm 0.05$  ; **Baliga et al. (2011)** : 3.66 à 5.49.
- Expression en  $\mu\text{g}$  d'équivalent acide ascorbique/100g poids frais : datte saoudienne variétés « sukari » et khalas : **Al Asmari et al. (2017)** : 105.99 et 90.81.

Toutes ces valeurs de l'activité antioxydante de dattes fraîches ou sèches rapportées par ces auteurs restent toujours inférieures à celles mesurées par la méthode de l'ORAC-FL dans la présente étude ( $5379.66 \pm 191.70$ ,  $4041 \pm 160.72$  et  $2709 \pm 71.29$   $\mu\text{Moles}$

Trolox/100g de poids frais pour les trois variétés de dattes : Deglet-Nour, Ghars et Ajwa, respectivement).

### **III.3.2. Activité antioxydante des extraits phénoliques de raisin**

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques aqueux de peau, de pulpe et de pépins de raisin sont indiqués sur les figures 14, 15 et 16 et sont donnés en  $\mu$  Moles /mL. Selon **Burin et al. (2014)**, l'activité antioxydante des variétés *Cabernet Sauvignon* et *Chardonay* est corrélée au contenu en composé phénolique majeur qui est le trans-resveratrol. Sur la figure 14, les valeurs les plus élevées de l'activité antioxydante de la peau de raisin mesurée par le test DPPH ont été enregistrées pour la variété GP ( $0.299 \pm 0.000 \mu$  Moles /mL).

Dans la présente expérience, une faible activité antioxydante ( $0.176 \pm 0.001 \mu$  Moles /mL) a été enregistrée avec l'extrait phénolique de peau de raisin blanc de variété blanche Chardon CL ; ce résultat est analogue à celui ( $0.180 \pm 0,002 \mu$  Moles /mL) rapporté par **Wen et al. (2016)** pour cette même variété de raisin blanc.

Les valeurs de DPPH augmentent selon la densité de raisins et que cette variabilité dans la capacité antioxydante est principalement due au génotype de la variété de raisin qui peut avoir un impact profond sur la composition phénolique et les propriétés antioxydantes des extraits de raisins (**Sridhar et Charles, 2019**).

Les valeurs de DPPH augmentent selon la densité de raisins et que cette variabilité dans la capacité antioxydante est principalement due au génotype de la variété de raisin qui peut avoir un impact profond sur la composition phénolique et les propriétés antioxydantes des extraits de raisins (**Sridhar et Charles, 2019**).

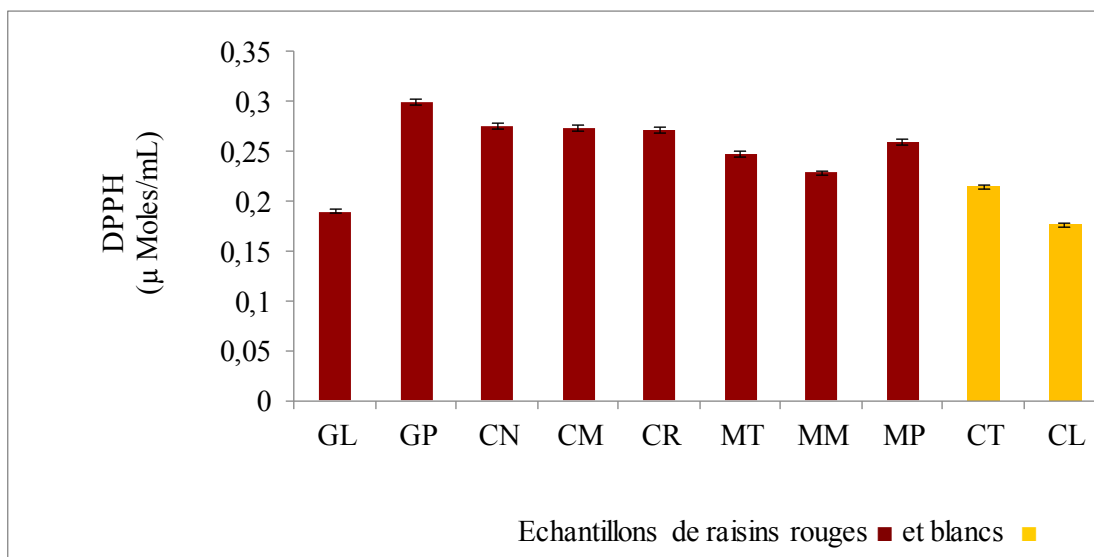


Figure 14 : Activité antioxydante d’extraits de **peau** de différentes variétés de raisin rouge et blanc mesurée par le test de DPPH. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l’écart type

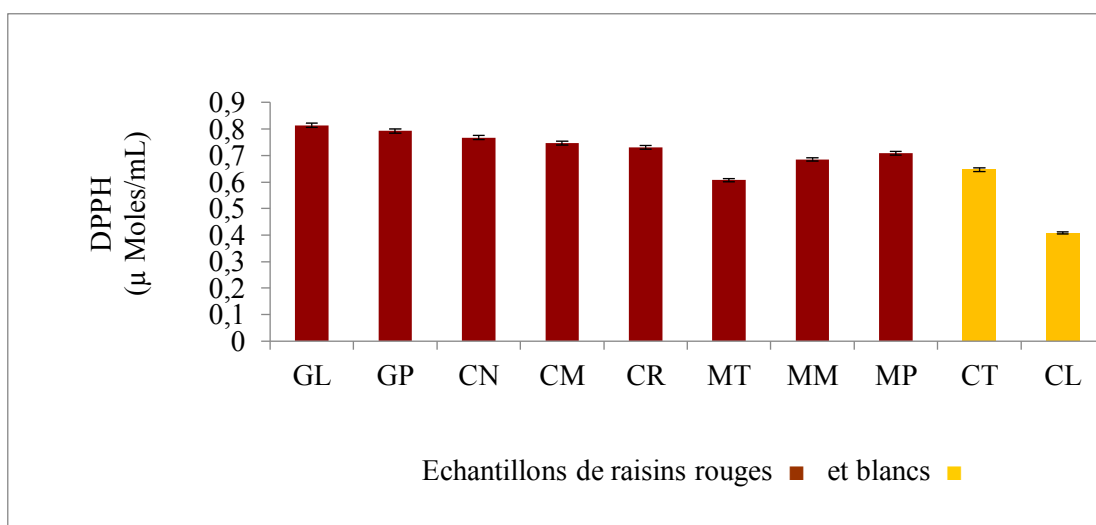


Figure 15: Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH de la **pulpe** des variétés de raisins rouges et blancs. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l’écart type

Liu et al. (2016) ont mesuré le pourcentage d’inhibition de DPPH par les extraits phénoliques aqueux de peau de 4 variétés de raisins rouge et ont trouvé qu’il varie de 44 à 58% ; ce qui est bien supérieur à celui rapporté chez la variété Ruby Seedless (12.5 μ Moles

/mL), mais inférieur à celui trouvé chez la variété Hongiseul (60.2%). L'activité antioxydante des extraits phénoliques de peau de raisin rouge mesurée par le test de DPPH a été estimée à 0.44  $\mu$  Moles /mL (**Das et Singha, 2014**).

Les résultats de l'activité antioxydante (DPPH) des extraits phénoliques de la pulpe des variétés de raisins étudiées sont illustrés par la figure 15. La plus forte activité ( $0.81 \pm 0.006 \mu$  Moles /mL) a été enregistrée pour la variété de raisin rouge Garnatxa (GL) ; alors que la plus faible activité antioxydante ( $0.41 \pm 0.000 \mu$  Moles /mL) l'a été pour la pulpe de la variété blanche Chardon(CH-GL).

Les valeurs de DPPH augmentent selon la densité de raisins et que cette variabilité dans la capacité antioxydante est principalement due au génotype de la variété de raisin qui peut avoir un impact profond sur la composition phénolique et les propriétés antioxydantes des extraits de raisins (**Sridhar et Charles, 2019**).

**Liu et al. (2016)** ont mesuré le pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits phénoliques aqueux de peau de 4 variétés de raisins rouge et ont trouvé qu'il varie de 44 à 58% ; ce qui est bien supérieur à celui rapporté chez la variété Ruby Seedless (12.5%), mais inférieur à celui trouvé chez la variété Hongiseul (60.2%).

**Singha et al. (2015)** ont rapporté que, généralement, les extraits phénoliques de la pulpe de raisin manifestent une plus grande activité antioxydante par rapport à ceux de la peau de raisin ; et à titre d'exemple la variété de raisin Hongiseul assure 84.5% d'inhibition du radical DPPH.

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de pépins de toutes les variétés étudiées mesurée par le test de DPPH sont reportés sur la figure 16 qui montre que la plus forte activité ( $0.14 \pm 0.00$  en  $\mu$  Moles /mL) a été enregistrée pour la variété Cabern sauvignon (CN) ; alors que la plus faible  $0.10 \pm 0.00$  l'a été chez la variété Chardonnay (CL). Cette caractéristique de l'extrait phénolique de pépins de la variété Chardon

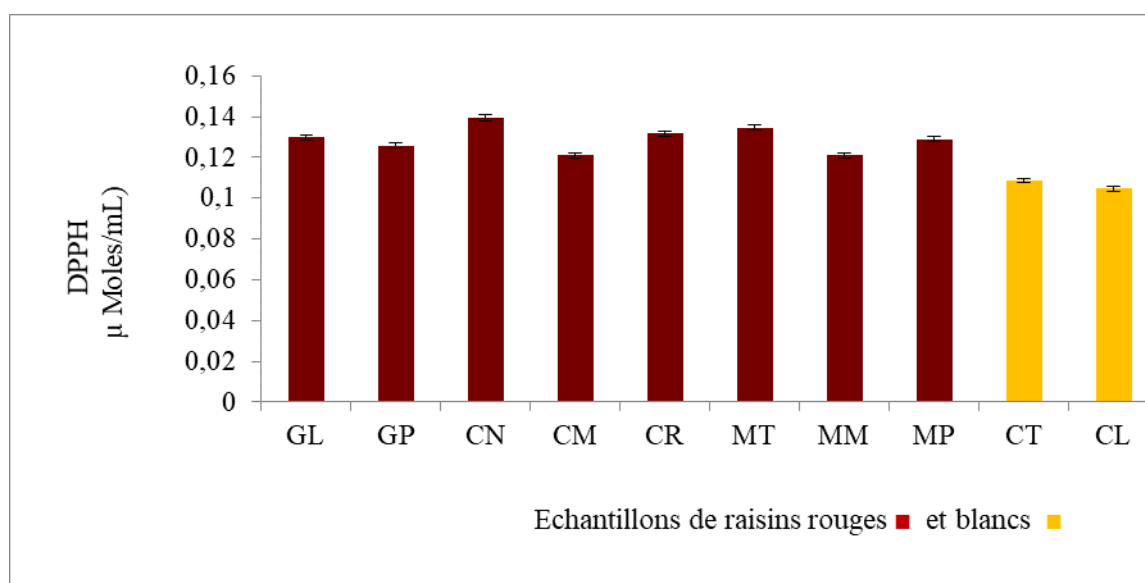


Figure 16: Activité antioxydante mesurée par le test de DPPH des **pépins** des variétés de raisins rouges et blancs. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'écart type

comme ayant un faible pouvoir antioxydant a aussi été mise en relief par **Wen et al. (2016)** qui ont étudié le profil phénolique et la caractérisation des huiles de pépins de différentes variétés de raisins Chinois.

Ainsi, ils ont rapporté que les extraits phénoliques de pépins de raisins rouges chinois de la variété *Vitis amurensis* avaient la plus grande capacité de réduction du DPPH ; tandis que la variété blanche de Chardon affichait la plus faible capacité.

Les extraits phénoliques de pépins de raisin possèdent une activité antioxydante supérieure à celle d'autres agents antioxydants tels que la vitamine C, vitamine E et le  $\beta$ -carotène (**She et al., 2003**). Les phénols de pépins de raisin ont le pouvoir d'inhiber l'oxydation du mauvais cholestérol (celui des LDL) et l'agrégation plaquettaire (**She et al., 2003**).

L'huile de pépins de Chardon (variétés blanches) sont les plus faiblement pourvus en stérols, vitamines E et en composés phénoliques ; ce qui les classe parmi les plus faibles antioxydants (**Nile et al., 2013**).

Ces auteurs avaient constaté que le marc de raisins de *Vitis amurensis*, *Vitis davidii* et *Cabernet sauvignon* constituait une bonne source d'huile de pépins de raisin de haute qualité avec une valeur nutritionnelle supérieure, telles que des teneurs relativement plus élevées en vitamine E et en composés phénoliques totaux.

La présence des composés phytochimiques et d'autres composés fortement bioactifs tels que les composés polyphénoliques dans la peau et la pulpe de raisin constitue une source potentielle en nutraceutiques pouvant servir comme compléments alimentaires (**Nile et al., 2013**).

### **III.3.3. Activité antioxydante des extraits phénoliques de jus d'orange**

Dans la présente expérience, l'activité antioxydante des extraits phénoliques du jus d'orange industriel déterminée par la méthode de l'ORAC-FL se situe entre 6040.09 et 9360.34  $\mu$ Moles Trolox/100mL de jus d'orange; ce qui est comparable à ce qui a été rapporté (6820  $\mu$  Moles Trolox/100mL de jus d'orange) par **Wang et al. (2008)**.

Parmi trois espèces du genre *Citrus* (*C. sinensis*, *C. anrantifolia* et *C. limonum*), **Raouf et al. (2014)** ont utilisé le test de DPPH pour évaluer le pourcentage de piégeage du DPPH à 84.81% avec *C. sinensis* et à 80.05% avec *C. anrantifolia*, utilisées toutes les deux à une concentration de 10% (P/V) (i.e 100  $\mu$ g / mL). En revanche, la troisième espèce (*C. limonum*) a présenté une activité antiradicalaire limitée.

**Tounsi et al. (2011)** ont rapporté des valeurs très élevées (96.10%) d'inhibition de DPPH pour un jus de *Citrus aurantium* qui est une variété d'orange amère. **Ferlazzo et al. (2015)** ont montré que les flavonoïdes inhibent les effets prooxydants de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les cellules épithéliales du poumon. Ces auteurs ont confirmé le rôle des flavonoides de l'orange dans le traitement des troubles liés au stress oxydatif; ce qui a ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour se protéger contre les lésions oxydatives dans les maladies pulmonaires, et évaluer l'efficacité de ces extraits in vivo.

### **III.4. Résultats de l'analyse des composés phénoliques par HPLC**

Les composés phénoliques présents dans les différents fruits étudiés ont été identifiés par une analyse HPLC où on procède à la comparaison des temps de rétention et des spectres de masse des différents composés à ceux des étalons de référence.

### **III.4.1. HPLC des extraits phénoliques aqueux de pulpe de dattes**

Le fractionnement des composés phénoliques de dattes a montré, dans un ordre quantitatif décroissant, la prédominance des acides férulique (AF), coumarique (AC), gallique (AG), hydroxybenzoïque (AHB) et vanillique (tableau 5). Plusieurs recherches ont rapporté que les dattes sont riches en acides phénoliques (**Saleh et al., 2011; Benmeddour et al., 2013; El Souli et al., 2014**).

Dans une étude sur des variétés de dattes saoudiennes, **Hamad et al. (2015)** ont rapporté que les principaux acides phénoliques présents étaient l'acide gallique, l'acide p-coumarique et les dérivés d'acide férulique.

Dans le présent travail, la fraction phénolique majeure contenue dans la variété de dattes Deglet-Nour est représentée essentiellement par les acides phénoliques (figure en annexe 5). Ce résultat est comparable à celui rapporté pour d'autres variétés de dattes par **Borochoy- Neori et al. (2015)** qui ont détecté cinq constituants d'acides phénoliques dans les variétés Hallawi et Amari, et le composant principal de la fraction phénolique était l'acide férulique et une trace d'acide coumarique pour les deux variétés.

La présence de l'acide férulique comme composé majeur a également été rapportée par **Al-Farsi et al. (2005)** pour des variétés de dattes d'Oman. Les variétés Deglet-Nour et Ghazi contenaient de fortes concentrations en acide coumarique (**Benmeddour et al., 2013**), ce qui est conforme avec les résultats de la présente étude où l'acide coumarique est le deuxième composé phénolique qui vient après l'acide férulique (tableau 5).

Dans une étude d'**Al-Alawi et al. (2017)**, la variété Amari contient principalement des dérivés de l'acide caféique, tandis que l'acide salicylique est le plus abondant pour la variété Hallawi.

**Tableau 5:** Les surfaces des pics de composés phénoliques d'extraits aqueux de la datte Deglet-Nour fractionnés par HPLC.

Composés phénoliques majeurs identifiés dans les extraits de pulpe de dattes Deglet-Nour	Surface de pics (S) $S = H \cdot \delta$	Absorbance en milliunités d'absorption (mAU)
Acide férulique	9123.37	20.120
Acide coumarique	6560.90	18.689
Acide gallique	3892.8	4.766
Acide 4-hydroxybenzoic	3010.39	12.614
Acide vanillique	1504.41	13.509

**Mrabet et al. (2016)** ont réalisé le fractionnement des composés phénoliques majeurs des dattes par HPLC et ils ont rapporté que les acides protocatéchique, vanillique, gallique, syringique et p-coumarique ont été détectés dans trois variétés différentes de ces dattes tunisiennes.

### **III.4.2. HPLC des extraits phénoliques de peau, de pulpe et de pépins de raisins**

Les droites étalons ayant servi à la quantification par extrapolation des différents polyphénols des extraits sont insérées en annexe 6.

#### **III.4.2.1. HPLC des extraits phénoliques de pépins de raisins**

Dans cette étude, trois monomères de type flavan-3-ol, (+) - catéchine, (-) - épicatechine et (-) - épicatechine gallate, ont été détectés dans les pépins de raisins blancs récoltés à deux stades végétatifs différents : stades d'avant et d'après la maturation. Les procyanidines (B1, B2 et B3) ont également été détectés dans les échantillons de pépins étudiés.

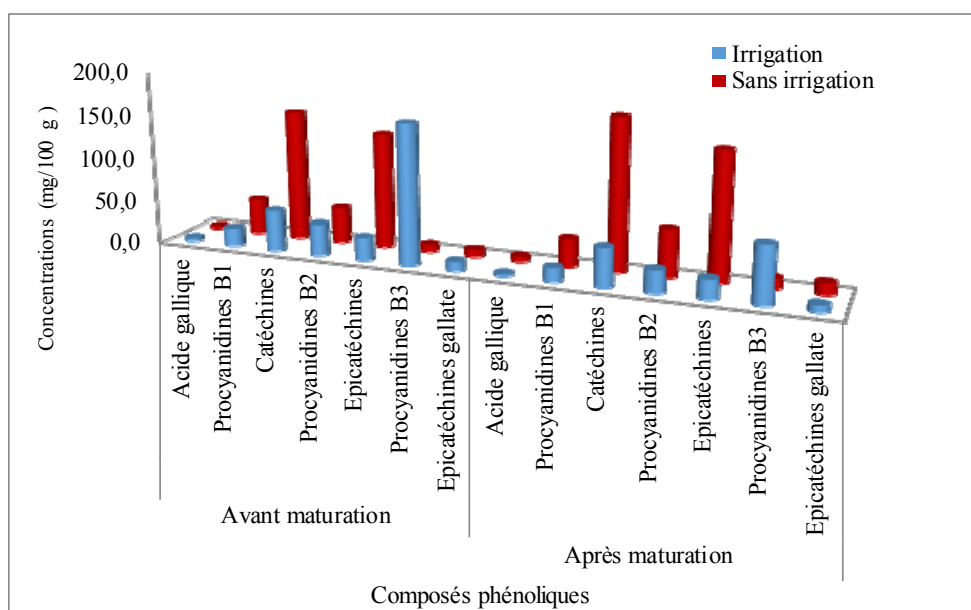
Quelque soit le stade végétatif, l'extrait phénolique de raisin blanc se caractérise par la prédominance des procyanidines B3 suivies des catéchines, des procyanidines B2 et des épicatechines (fig. 17). Néanmoins, il faut noter qu'avant le stade maturation, les pépins de raisin blanc sont plus riches en ces polyphénols. La figure 17 fait ressortir également l'effet positif de l'irrigation sur la distribution quantitative de certains polyphénols.

**Andjelkovic et al. (2013)** ont souligné l'effet du stade de maturation sur le profil phénolique d'extrait de pépin et de l'activité antioxydante de la variété de raisin Vranac. Ces auteurs ont rapporté le profil phénolique des pépins (flavan-3-ols comme la (+) - catéchine, (-) - épicatechine et procyanidines) et de la peau (quercétine, malvidine-3-glucoside, anthocyanes et les malvidine-3-0).

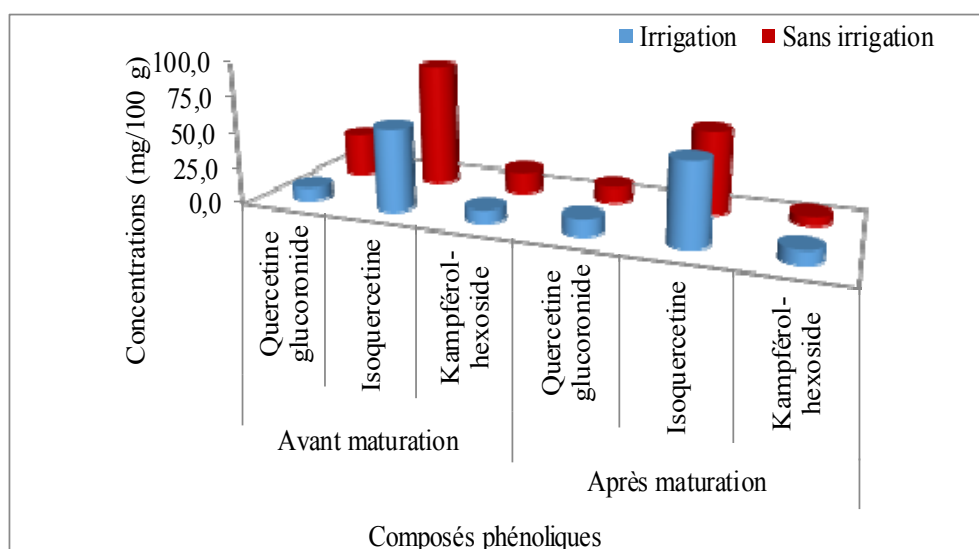
#### **III.4.2.2. HPLC des extraits phénoliques de la peau de raisins**

Les principaux composés phénoliques de la peau de raisins identifiés par HPLC sont représentés sur la figure 18. Les résultats reportés sur cette figure ont montré que le profil phénolique qualitatif et quantitatif des extraits de peau de raisin blanc d'avant et d'après le stade maturation du fruit ne présente pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) et se caractérise par la prédominance de l'isocatechine. L'effet irrigation sur ce profil est moins marqué que dans le cas des extraits de pépins (fig. 18).

Selon **Sandhu et Gu (2010)**, la peau de raisin de la variété « Muscadine Grapes » contenait des tanins hydrolysables, des flavonoïdes, notamment des anthocyanes 3,5-diglucosides, de la quercétine, de la myricétine et des glycosides de kaempférol.



**Figure 17:** Représentation graphique des composés phénoliques de pépins de raisins (venant de vignobles irrigué et non irrigué) extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC. Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.



**Figure 18:** Représentation graphique des composés phénoliques de la peau de raisins extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC. Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.

**Obreque-Slier et al. (2013)** ont rapporté qu'il y avait prédominance des composés flavanols pour la peau de la variété blanche Cabernet s. Ce résultat d'identification pour la peau de raisin blanc est similaire à celui représenté sur la figure 19 de la présente étude ou

les catéchines (flavanols) représentent la plus grande part parmi tous les composés phénoliques identifiés avant et après maturation.

**Andjelkovic et al. (2010)** ont signalé la présence d'acide gallique dans les pépins et les acides caféique, ellagique et férulique dans la peau, mais une absence d'acide coutarique et acide p-coumarique de ces parties du raisin.

Dans le présent travail, les acides phénoliques (comme les acides syringique et férulique) et le tyrosol (4- 2-hydroxyéthylphénol) sont absents dans les extraits phénoliques de peau de raisins ; en revanche, les catéchines y sont représentées et en plus grande quantité au stade d'avant maturation. Les échantillons issus de vignoble irrigué présentent le même profil phénolique mais sont plus riches en catéchines (fig. 19).

Le quercétine-3-glucoside est le plus abondant flavonol dans les peaux des variétés Cabern S, Merlot et Garnatxa n. Les peaux de raisin sont des sources riches en acides hydroxycinnamiques, flavanols et glycosides de flavonols. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Kamerrer et al. (2004)**. La peau de raisin des variétés rouges est la partie de la baie qui contient les deux principales classes de polyphénols (anthocyanes et flavanols) (**Guerrero et al., 2009**). Il a été démontré par **Shi et al. (2016)** que la malvidine et ses dérivés sont des anthocyanes présents dans la peau de raisins en plus des acides phénoliques et des flavanols.

#### **III.4.2.3. HPLC des extraits phénoliques de la pulpe de raisins**

Les résultats reportés sur la figure 20 laissent apparaître la présence et la prédominance des acides hydroxynamiques aux dépens des acides benzoïques qui sont très peu représentés dans les extraits phénoliques de pulpe de raisins blancs.

L'acide hydroxynamique majeur présent dans ces échantillons est l'acide coutarique suivi de l'acide fertarique et ceci indépendamment du stade végétatif.

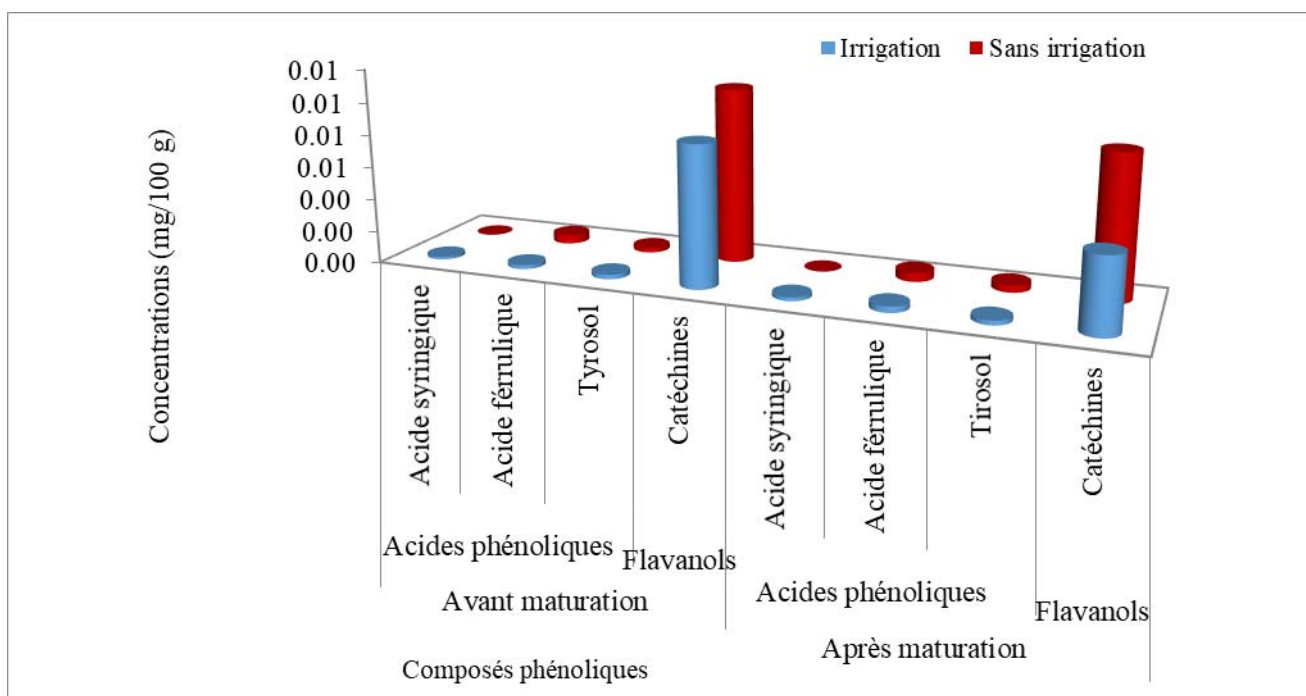


Figure 19 : Représentation graphique des acides phénoliques et des flavanols de la peau de raisins extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC . Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.

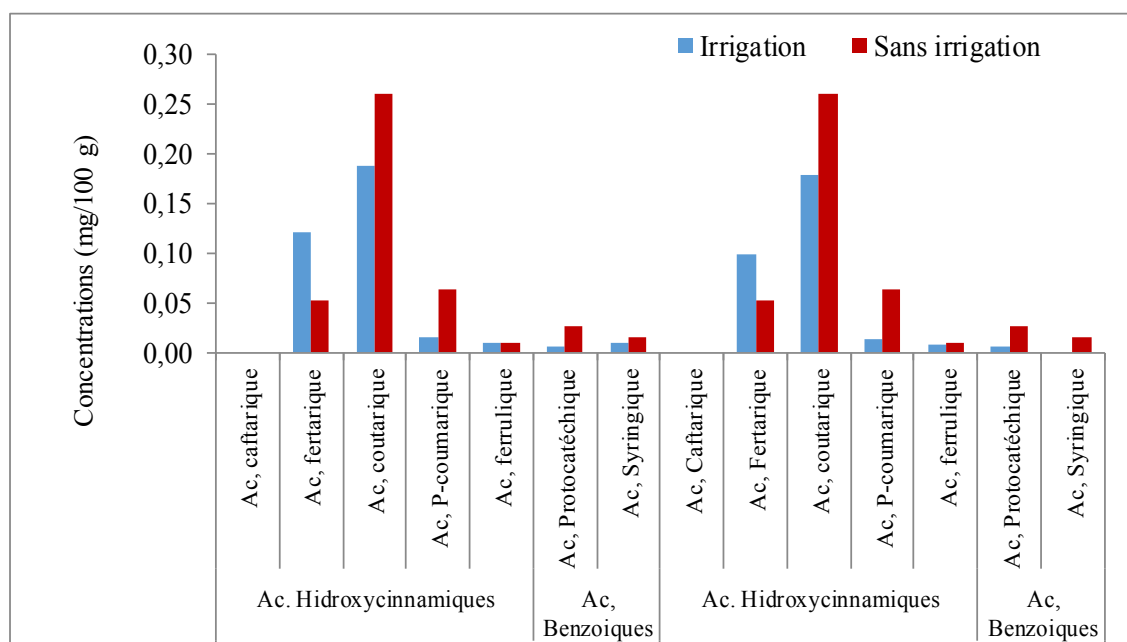


Figure 20 : Représentation graphique des acides phénoliques (hydroxycinnamiques et benzoïques) de la pulpe de raisins extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC . Les concentrations sont données en mg/100g de poids frais.

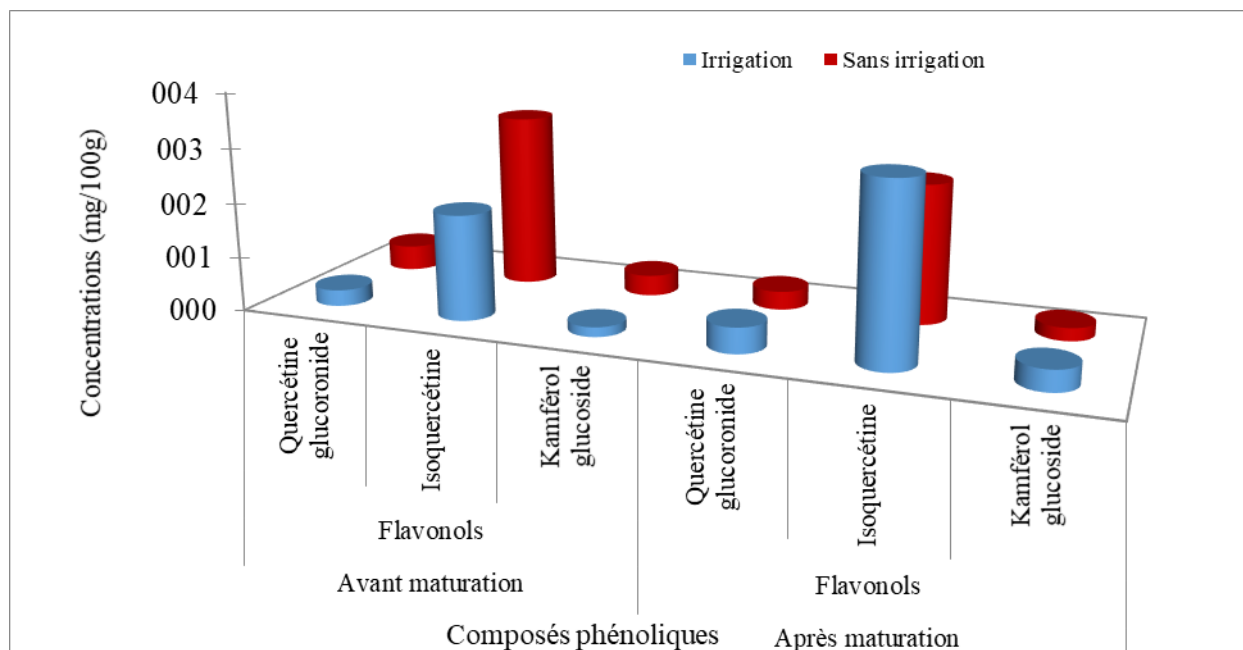
L'acide coutarique, peu présent dans la pulpe de raisin de vignoble non irrigué, se trouve en plus grande quantité dans les échantillons de plants irrigués. Là aussi l'effet « irrigation » est visible (fig. 20).

Le profil des flavonols d'extraits de pulpe de raisin blanc révélé par HPLC se caractérise par la prédominance de l'isoquercétine et la présence à un degré moindre du quercétine glucoside et du kampferol glucoside (fig. 21). Il est à noter que la maturation du raisin induit une légère augmentation de ces flavonols. Il en est de même pour l'irrigation des vignobles, elle provoque également une augmentation des flavonols (fig. 21).

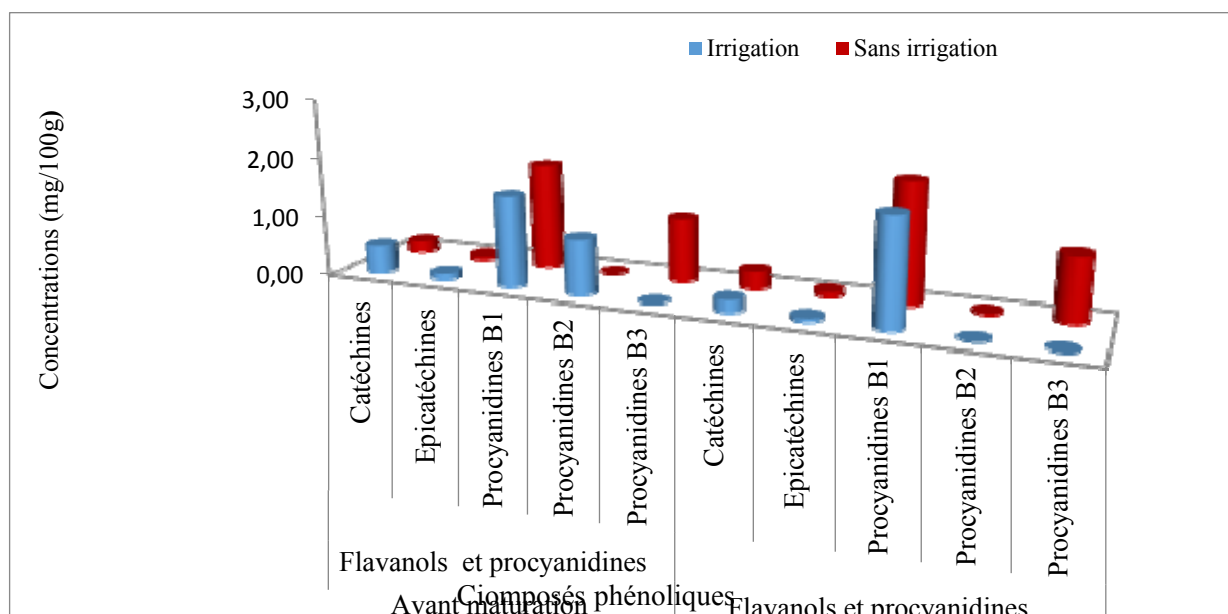
Les flavanols et les anthocyanidines d'extraits de pulpe de raisin blanc sont essentiellement représentés par les procyanidines B2 et B1 suivies des catéchines dont la concentration n'est pas influencée par le stade de maturation du fruit. L'effet « irrigation » des vignobles sur ce profil des flavanols et des anthocyanidines n'est pas accentué (fig. 22).

**Wein et al. (2017)** ont étudié le profil phénolique de cinq variétés de raisins cultivées aux États-Unis et qui ont été transférées dans des emplacements nouvellement adaptés en Chine. Ces auteurs ont rapporté que la synthèse et l'accumulation de polyphénols dans les raisins sont influencées par de nombreux facteurs, tels que le génotype, l'origine géographique et les conditions environnementales. Le génotype joue un rôle central dans la définition de la teneur en polyphénols du raisin.

Ces différenciations doivent être considérées comme un facteur important conduisant à une augmentation de la photosynthèse et par la suite une augmentation du contenu en flavan-3-ol (flavanols) dans les pépins (**Cadot, 2015**). Des recherches supplémentaires sont nécessaires et plusieurs facteurs doivent être pris en compte simultanément afin de comprendre le rôle de chaque facteur indépendant et / ou mutuels de la biosynthèse des acides phénoliques dans les raisins, en particulier lorsque le réchauffement climatique s'intensifie, ce qui affecte de nombreuses régions viticoles dans le monde (**Ollat et Touzard, 2015**).



**Figure 21:** Représentation graphique des flavonols de la pulpe de raisins blancs extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC. Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.



**Figure 22:** Représentation graphique des flavanols et des procyanidines de la pulpe de raisin blanc extraits à l'éthanol/eau (80/20 : v/v) et analysés par HPLC. Les concentrations sont données en mg/100g du poids frais.

Les résultats obtenus dans la présente expérience ont montré que les quantités de composés phénoliques diffèrent d'une variété à une autre, et ce même pour des échantillons d'une même variété de raisin, mais à différentes dates d'échantillonnage (l'état de maturation). Les différences sont nettes entre les chromatogrammes des différentes parties étudiées (peau, pulpe ou pépins).

Plusieurs auteurs (**Grace-Nirmala et al., 2018 ; Tabeshpour et al., 2018 ; Soleymani et al., 2019 ; Liu et al., 2016 et Ben Youssef et al., 2019**), ont rapporté que l'étude rigoureuse des composés phénoliques, de leur présence, de leur quantité ainsi que de leurs propriétés antioxydantes aiderait à mieux comprendre les relations qui existent entre la composition phénolique et la qualité de certains produits consommés comme le raisin.

**Tabeshpour et al. (2018)** ont étudié les effets protecteurs possibles du raisin et de l'un de ses composants biologiquement actifs, le resveratrol (RSV), sur la toxicité de différents organes induite par les toxines naturelles.

**Ben Youssef et al. (2019)** ont travaillé sur l'espèce de raisin rouge *Vitis vinifera* et ont évalué l'effet neuroprotecteur de l'extrait de pépin (Grape Seed Extract ou GSE) et celui de la peau (Grape Skin Extract ou GSSE) dans un modèle de maladie de Parkinson. Ils ont montré que le GSSE agit à plusieurs niveaux pour protéger les neurones dopaminergiques de la dégénérescence.

Dans une autre étude de **Grace Nirmala et al. (2018)** sur la même espèce viticole, les polyphénols de peau et de pépin peuvent cibler de manière sélective les cellules cancéreuses pour les détruire.

Selon **Soleymani et al. (2019)**, le resveratrol et l'extrait de pépins de raisin GSE ont des effets bénéfiques sur les affections cutanées telles que l'acné vulgaire, le vieillissement cutané, ainsi que sur les rougeurs des plaies et du visage. Ces auteurs ont recommandé de mener davantage d'études cliniques avec des approches de nano-formulation afin d'obtenir des résultats concluants concernant l'efficacité de ces extraits dans la gestion des maladies de la peau.

### **III.4.3. HPLC des extraits phénoliques du jus d'orange industriel**

Dans cette étude, plusieurs composés ont été détectés et quantifiés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC /MS) du jus d'orange industriel. Les chromatogrammes sont donnés en annexe 7.

Dans la présente étude, l'analyse chromatographique a montré que les flavanones constituent le groupe principal des flavonoïdes et les principaux polyphénols du jus d'orange industriel.

Le profil en flavanones de ce jus d'orange se caractérise par la prédominance du naringenin-7-O-rutinoside qui représente à lui seul plus de 52% du total des composés détectés, suivi de l'hesperetin-7-O-rutinoside (plus de 39%). Ces deux flavanones sont les constituants majeurs (plus de 91%) des flavonoïdes du jus d'orange industriel. L'isosakuranetin-7-O-rutinoside reste faiblement représenté (avec 6.85%) dans les flavonoïdes de ce jus d'orange.

**Anagnostopoulou et Kefalas (2012)** ont déterminé la teneur en flavonoïdes de cinq espèces d'agrumes (mandarine, sanguine, orange amère, citron et pamplemousse) cultivées en Grèce et issues de variétés d'agrumes analysées pour la première fois. Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans le jus de ces agrumes en fonction des temps de rétention HPLC des données spectrales étaient les flavanones, flavones O-glycosylées, flavones C-glycosylées, les flavones OC- glycosylées telles que la saponarine et d'autres dérivés phénoliques.

### **III.5. Evolution des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux en fonction de la durée de fermentation du jus de dattes et du jus d'orange.**

#### **III.5.1. Evolution des polyphénols totaux au cours de la fermentation des jus de dattes et d'orange.**

##### **III.5.1.1. Polyphénols totaux au cours de la fermentation du jus de dattes.**

L'évolution des polyphénols totaux au cours de la fermentation alcoolique du jus de dattes s'est caractérisée par une augmentation progressive durant toute la durée de fermentation (fig. 23). Il a été enregistré une augmentation de deux fois la valeur initiale qui

représente plus de 40 % des polyphénols totaux ( $32.82 \pm 1.39$  au démarrage de la fermentation pour atteindre  $71.26 \pm 1.66$  et  $69.50 \pm 1.36$  mg GAE/100mL de jus de dattes.

Cette tendance à l'augmentation de la concentration en polyphénols au cours de la fermentation a aussi été observée par **Alessandro et al. (2008)** lorsqu'ils avaient mis des pommes à fermenter quoique cette augmentation était très faible (5%) et ne concernait que deux composés, l'acide caféique et les catéchines.

**Dulf et al. (2015)** ont étudié l'effet de la fermentation à l'état solide de baies de Sureau (*Sambucus ebulus* et *Sambucus nigra*) par *Aspergillus niger* sur leur contenu phénolique et leur activité antioxydante. Ces auteurs ont observé une augmentation du contenu phénolique de 11.11 et de 18.82% au cours de la fermentation des baies de *S. ebulus* et de *S. nigra*, respectivement ; et à laquelle est couplée une élévation du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des fermentas. L'analyse chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) a indiqué que le cyanidine 3-sambubioside-5-glucoside est le composé phénolique principal dans les deux résidus de fruits de *Sambucus* fermentés.

Par ailleurs, **Juan et Chou (2010)**, ont montré que la fermentation à l'état solide de soja noir avec *Bacillus subtilis* BCRC 14715 augmentait la teneur totale en phénols et en flavonoïdes, ainsi que l'activité antioxydante de l'extrait du fermenta.

Cette augmentation des composés phénoliques au cours de la fermentation de jus de dattes peut être due à l'augmentation en composés phénoliques majeures de la datte (l'acide ferrulique, caféique et coumarique). Ceci a été rapporté aussi par **Minnaar et al. (2017)** dans leur étude de l'effet des fermentations séquentielles par les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* sur les acides phénoliques du jus de pomme Kei-pomme (*Dovyalis caffra* L.) fermenté. Ils ont observé que la fermentation des pommes par la souche *Saccharomyces cerevisiae* a augmenté la concentration des acides caféique, chlorogénique, protocatéchique et sinapique ; tandis que *S. pombe* a produit un jus fermenté très riche en acides férulique et p-coumarique et une faible teneur en acide l-malique.

**Silvia et al. (2018)** ont obtenu un contenu phénolique et une activité antioxydante plus élevés avec du marc de raisin fermenté. **Dulf et al. (2016)** ont rapporté que la fermentation du

jus de prunes par *Aspergillus niger* et *Rhizopus oligosporus* augmentait la quantité de polyphénols totaux de plus de 30 et 21% respectivement dans le cas du jus de prunes et de 78 et 30% respectivement dans le cas des grignons d'abricots. La même tendance à l'augmentation a été observée pour les flavonoïdes totaux.

L'augmentation du contenu phénolique total par fermentation a été rapportée aussi par **Peerajan et al. (2016)** lorsqu'ils ont réalisé une fermentation (15 jours) du jus de fruit de *Phyllanthus emblica* au moyen de la bactérie *Lactobacillus paracasei* HII01. Ils ont enregistré une augmentation de la teneur en polyphénols de  $10.32 \pm 0.28$  mg d'équivalent acide gallique/mL après 15 jours de fermentation, puis cette teneur diminue lentement si la fermentation est prolongée au-delà du 15<sup>ème</sup> jour. Ces auteurs ont expliqué cette diminution après 15 jours par le fait d'une oxydation enzymatique du contenu polyphénolique par la polyphénol oxydase.

**Melini et al. (2019)** ont notamment observé que les teneurs en acide férulique dans l'orge et l'avoine fermentés étaient respectivement supérieures de 81,9% et 49,9% à celles des substrats non fermentés.

Cette observation de l'augmentation des composés phénoliques au cours de la fermentation de divers végétaux ou de leurs dérivés a finalement été faite par de très nombreux autres auteurs : **Wang et al. (2014)** (fermentation de châtaigne, noix et graines de lotus par *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus plantarum*) ; **Chen et al. (2011)** (fermentation solide de soja noir par *Aspergillus awamori*) ; **Xu et al. (2019)** (fermentation du riz glutineux pré-fermenté additionné de thé).

### **III.5.1.2. Polyphénols totaux au cours de la fermentation du jus d'orange industriel**

L'évolution des teneurs en polyphénols totaux du jus d'orange industriel au cours de fermentation par la levure *Pichia kluyveri* est reportée sur la figure 24 où l'on constate qu'elles diminuent de 24.17 % en passant de  $79.30 \pm 0.006$  mg GAE/100 mL au démarrage de la fermentation (t=0 jours) pour atteindre  $60.42 \pm 0.108$  mg GAE/100 mL après 12 jours de fermentation. Après cela, cette valeur reste constante jusqu'à la fin de la fermentation.

La diminution des polyphénols totaux pourrait être due à la précipitation, l'oxydation, l'adsorption de composés phénoliques avec des solides, des protéines ou levures, ou à des réactions de polymérisation (Talcott et al., 2002). Il a également été décrit que les acides phénoliques, en particulier les acides hydroxycinnamiques, peuvent être dégradés par voie enzymatique pendant la fermentation microbienne (Svensson et al., 2012).

Dans une étude de Dang et Nguyen (2018), les quantités de proanthocyanidines, de caféine et de théobromine, ainsi que les capacités antioxydantes des fèves de cacao non

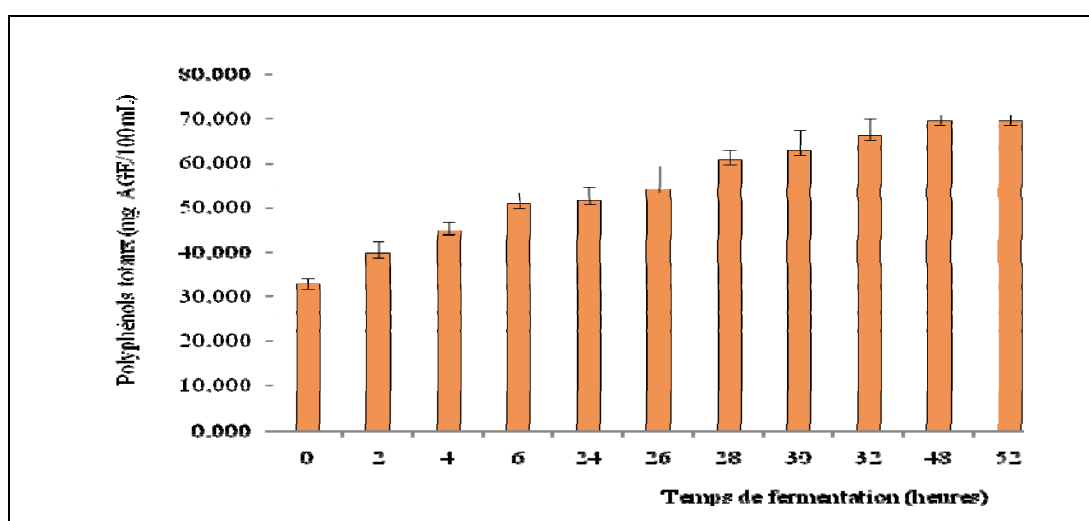


Figure 23 : Evolution du contenu phénolique total au cours de la fermentation alcoolique de jus de dattes par *Saccharomyces cerevisiae* à 30°C et en anaérobiose. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type et sont exprimées en mg GAE/100 mL de jus de dattes

fermentées ont augmenté au cours de la maturation; alors qu'une fermentation prolongée de trois à sept jours, a considérablement réduit les quantités de ces composés présents.

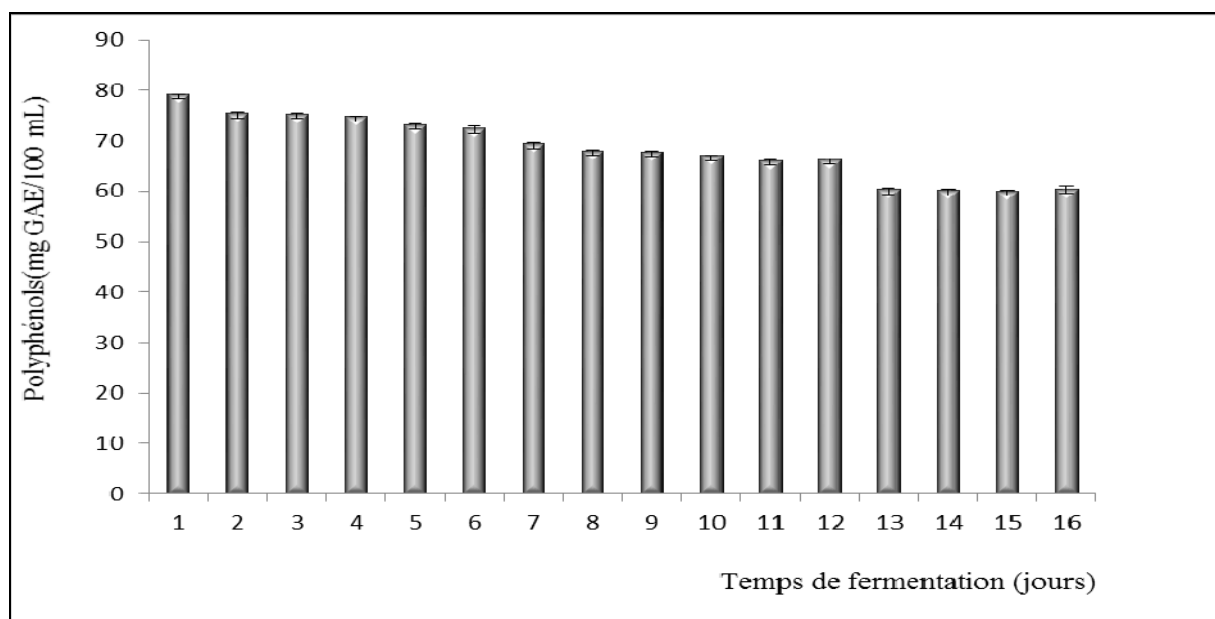


Figure 24: Evolution des polyphénols totaux en mg GAE/100 mL de jus d'orange industriel au cours de fermentation anaérobie à 30°C. Les valeurs sont exprimées en mg GAE/100 mL de jus d'orange.

Par contre, **Zhai et al. (2018)** ont rapporté une diminution des polyphénols conjugués, une augmentation des polyphénols libres et une augmentation du pouvoir antioxydant après la fermentation du maïs par deux espèces (*brasiliensis* et *bisporus*) du genre de champignon *Agaricus*.

**Omboa et Isah (2018)** ont rapporté une diminution des acides phénoliques après la fermentation du sorgho pré-fermenté et ont attribué cela d'une part, à leur métabolisation par les bactéries fermentatives, et d'autre part au changement entre la formation de polyphénols simples par dégradation de polyphénols hautement polymérisés et la dégradation totale des polyphénols simples accompagnée d'une re-formation de composés bi-phénoliques plus complexes.

Par ailleurs, **Kaprasob et al. (2018)** ont observé que la fermentation du jus de pomme par *Lactobacillus plantarum* n'induisait aucun changement dans son contenu phénolique mais, en revanche, provoquait une augmentation des tanins condensés ainsi qu'une diminution des tanins hydrolysables et des facteurs d'astringence.

La réduction de la concentration des composés phénoliques totaux par fermentation a été reportée aussi par **Li et al. (2016)** lorsqu'ils ont réalisé une fermentation de jus de pomme par *Lactobacillus plantarium* ATCC 14917. Au cours du processus de fermentation, le contenu phénolique total (CPT) et le contenu en flavonoïdes totaux (CFT) du jus de pomme ont considérablement diminué. Le CPT dans le jus de pomme fermenté est passé de 115.6 à 89.3 µg/mL. Le CFT dans le jus de pomme fermenté est passé de 119 à 77.7 µg / mL; ce qui correspond à un pourcentage de réduction de 22 et 34.8%, respectivement.

Une autre étude de **Hashemi et al. (2017)** a également révélé que le CPT et le CFT de la pulpe d'olive avaient diminué après sa fermentation avec la souche *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058.

La teneur en composés phénoliques totaux du fruit de *Diospyros lotus* L. a diminué après sa fermentation par la souche B7 de *Lb plantarum* ; tandis que l'activité antioxydante a augmenté (**Zhang et al. 2018**).

Les résultats de ce travail sur la diminution du contenu phénolique total suite à une fermentation viennent s'ajouter à d'autres résultats rapportés par **Melini et al. (2019)** qui ont démontré que la fermentation du jus de grenade par *S. cerevisiae* diminuait la teneur en polyphénols et autres composés bioactifs, à l'exception des flavonoïdes. Ces mêmes auteurs ont étudié la fermentation de la tomate par des bactéries lactiques et ils ont montré que la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes diminuait après 4 semaines de fermentation, tandis que le lycopène et l'activité antioxydante ont augmenté.

### **III.5.2. Evolution des flavonoïdes totaux au cours de la fermentation des jus de dattes et d'orange**

#### **III.5.2.1. Fermentation du milieu jus de dattes et flavonoïdes totaux**

L'évolution des concentrations en flavonoïdes de jus de dattes fermenté est reportée sur la figure 25 où l'on constate une nette augmentation des flavonoïdes totaux qui passent de  $1.9 \pm 0.173$  à  $7.366 \pm 2.203$  mg d'équivalent quercétine/100 mL de jus de dattes entre le temps de démarrage ( $t=0$ ) et la 49<sup>ème</sup> heure de fermentation. Cette valeur est restée stable jusqu'à la fin du processus (52<sup>ème</sup> heure).

**El-Ashi et al. (2014)** ont constaté que la concentration en flavonoïdes totaux augmentait fortement dans le son de riz après 24 h et 48 h de fermentation. Selon **Juan et Chou (2010)**, la libération des polyphénols totaux et des flavonoïdes à partir du blé en fermentation a conduit à l'augmentation de leur teneur.

**Da Silva Fernandes et al. (2017)** ont observé une augmentation par des facteurs de 2 la teneur initiale en aglycones isoflavones et de 9 celle en composés phénoliques totaux dans du lait de soja entreposé 4 jours à 4°C après avoir été fermenté pendant 15h à 25°C par du kéfir.

### **III.5.2.2. Fermentation du jus d'orange industriel et flavonoïdes totaux**

La teneur initiale en flavonoïdes totaux du jus d'orange industriel est passée de  $3.08 \pm 0.01$  à  $9.57 \pm 0.63$  mg/100 mL de jus.

La teneur initiale en flavanones totales du jus d'orange industriel ( $1.50 \pm 0.017$  mg/100 mL) indiquée sur le tableau 7, a également augmenté significativement ( $p < 0.05$ ) au cours des 11 premiers jours de fermentation pour atteindre  $1.82 \pm 0.096$  mg/100 mL et presque la même valeur ( $1.85 \pm 0.13$  est maintenue en fin de fermentation (15<sup>ème</sup> jour).

**Tounsi et al. (2011)** ont rapporté une teneur en flavonoïdes totaux de 3.47 mg/100 mL de jus d'orange non fermenté; ce qui représente une valeur similaire à celle obtenue dans cette expérience ( $3.08 \pm 0.01$  mg/100 mL de jus d'orange) mesurée initialement avant fermentation.

**Yang et al. (2012)** avaient désigné la fermentation comme responsable de la modification de la teneur en composés bioactifs dans certains produits en fonction du type de microorganisme et de la durée de fermentation qui représentent des paramètres importants pouvant affecter la concentration et le profil des composés phénoliques.

**Filannino et al. (2016)** ont rapporté que la fermentation lactique de l'extrait de cactus *Opuntia ficus indica* génère des dérivés de flavonoïdes (kaempférol et isorhamnetin) dotés de propriétés antioxydantes, immunomodulatrices et anti-inflammatoires.

Dans ce travail, les flavanones constituent la grande partie des flavonoïdes contenus dans le jus d'orange, un résultat qui a été rapporté aussi par **Kelebek et al. (2009)**. La fermentation alcoolique pourrait induire l'extraction de flavanones moins solubles et par la suite une augmentation du contenu en flavanones totales (**Toktaş et al., 2018**). Cette augmentation de la teneur en flavanones a été observée aussi suite à d'autres processus industriels tels que l'extraction sous pression ou le pressage (**Gil-Izquierdo et al., 2002**).

La teneur en flavanones totales rapportée par ces mêmes auteurs (**Gil-Izquierdo et al. (2002)**) et qui est exprimée par la somme des concentrations des composés individuels, a également augmenté de manière significative ( $p < 0.05$ ).

Récemment, **Toktaş et al. (2018)** ont rapporté que la fermentation pourrait modifier la teneur en composés bioactifs dans certains produits. De plus, la présence d'éthanol au cours du processus pourrait également contribuer à l'extraction des flavonoïdes de la pulpe du jus.

L'amélioration du contenu total et individuel des flavanones détectés dans le jus d'orange fermenté après le onzième jour de fermentation confère au jus fermenté un avantage supplémentaire par rapport au jus d'orange non fermenté.

### **III.6. Evolution de l'activité antioxydante du jus d'orange industriel**

La capacité antioxydante initiale du jus d'orange industriel (ORAC:  $6044 \pm 4,867 \mu\text{M}$  Trolox/100 mL de jus) est similaire à celle (ORAC:  $6820 \pm 2,67 \mu\text{M}$  Trolox/100 mL de jus) rapportée dans le jus d'orange par Wang et al. (2008). Cette capacité antioxydante atteint une valeur ORAC de  $9355 \mu\text{M}$  Trolox/100 mL de jus après 15 jours de fermentation du jus d'orange industriel elle se stabilise si la fermentation est prolongée (fig. 27 ; tableau 8).

Dès le début de la fermentation, commence l'esquisse de l'augmentation de la capacité antioxydante du jus d'orange fermenté qui passe d'un état initial (J0) de  $6040.10 \pm 4,87$  à  $6492.78 \pm 48.12 \mu\text{M}$  Trolox/100 mL le troisième jour (J3) pour arriver à  $6740.13 \pm 43.65$  le cinquième jour (J5). Ainsi de J1 à J5, soit pendant les 5 premiers jours de fermentation, l'activité antioxydante a augmenté de 11.52% (fig. 27A, tableau 8).

L'effet de la fermentation sur le pouvoir antioxydant du jus d'orange industriel se poursuit d'une manière significative ( $p < 0.05$ ) entre le sixième et le dixième jour où il y a eu 13.25% d'augmentation (fig. 27B, tableau 8). Au-delà du dixième jour de fermentation, l'augmentation du pouvoir antioxydant du jus d'orange devient moins remarquable et les valeurs ont tendance à se stabiliser relativement. C'est ainsi qu'au quinzième jour de fermentation, le pouvoir antioxydant culmine à  $9360.34 \pm 6.73 \mu\text{M Trolox}/100 \text{ mL}$  de jus (fig. 27C et tableau 8).

Paradoxalement, la fermentation du jus d'orange industriel a eu pour effet la diminution de la teneur en polyphénols qui est passée de sa valeur initiale  $79.30 \pm 0.006 \text{ mg}/100\text{mL}$  de jus au démarrage du processus (jour J0) à sa valeur d'après 15 jours de fermentation (J15)  $59.88 \pm 0.11 \text{ mg}/100\text{mL}$  de jus (tableau 8).

Pendant ce temps, la teneur en flavonoïdes subit, d'une manière paradoxale également, une nette augmentation en passant de  $3.08 \pm 0.01$  (JO) à  $9.57 \pm 0.63 \text{ mg}/100 \text{ mL}$  de jus en fin de fermentation ; elle se retrouve multipliée par un facteur égal à plus de 3 (tableau 8) à ( $6094.94 \pm 31,6202 \mu\text{M Trolox}/100 \text{ mL}$  à  $t = 2$  jours de fermentation).

L'augmentation de la capacité antioxydante du jus d'orange fermenté pourrait être due à une augmentation de la teneur en flavanones. L'activité antioxydante a présenté une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) après la fermentation du jus.

Le jus d'orange industriel fermenté a une capacité antioxydante nettement supérieure à celles des autres jus de fruits comme ceux de pomme, d'ananas, de tomate, d'abricot et les jus tropicaux (**Pellegrini et al., 2003 ; Mullen et al., 2007**) ; ainsi que d'autres boissons comme le thé noir et vert (**Pellegrini et al., 2003; Seeram et al., 2008**).

Les valeurs avec des lettres différentes (a-f) dans la même colonne sont significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Selon la littérature, les résultats de l'activité antioxydante mesurée par le test TEAC sont controversés. En effet, **Klopotek et al. (2005)** ont obtenu une diminution significative des valeurs de TEAC après la fermentation du jus de fraise ; alors qu'en revanche, **Yang et al. (2012)** ont observé une augmentation des valeurs de TEAC au cours de la fermentation de l'oignon (*Allium cepa*) dont le contenu en quercétine et son activité antioxydante et neuroprotectrice ont augmenté.

Il a été suggéré que la consommation de jus d'orange soit encouragée chez les patients atteints d'hépatite C chronique sous traitement antiviral. Cette suggestion est basée sur une étude réalisée par **Gonçalves et al. (2017)** sur les effets positifs de jus d'orange sur des taux plus bas de lipides sériques, sur le stress oxydatif et sur la préservation de l'état nutritionnel.

Ces effets sont le résultat d'interactions entre la vitamine C et les flavonoïdes, dont les concentrations peuvent être influencées par les techniques de traitement du fruit pour l'extraction du jus. L'extrait à l'acétone et l'extrait au méthanol de soja noir fermenté présentaient respectivement les meilleurs effets de piégeage des radicaux libres (DPPH) et de capacité de chélation du  $Fe^{2+}$ .

L'eau et le méthanol extraient efficacement les principes chélateurs du  $Fe^{2+}$  du soja noir non fermenté et du soja fermenté, respectivement (**Juan et Chou, 2010**).

L'effet de la fermentation sur la teneur en composés phénoliques du soja et des haricots a été rapporté par **Landete et al. (2015)**. Les haricots mungo (*Vigna radiata*) connus sous le nom de "soja vert" présentaient une composition phénolique différente de celle du soja jaune (*Glycine max*). Les isoflavones prédominaient dans le soja jaune, alors qu'elles étaient totalement absentes dans les graines vertes où prédominaient les flavanones.

Afin de renforcer leurs bénéfiques santé, deux types d'haricots (jaunes et verts) ont été soumis à la fermentation par *Lactobacillus plantarum* CECT 748 T qui a entraîné une augmentation de leur bioactivité puisqu'une conversion des isoflavones glycosylées en aglycones bioactives et une augmentation de la vitexine bioactive ont été observées chez les

haricots jaunes et verts, respectivement. Les bénéfices santé des deux haricots ont été augmentés par la fermentation lactique.

**Xing et al. (2016)** ont observé une augmentation de l'activité antioxydante et de la teneur en composés phénoliques totaux de la sauge rouge (*Salvia miltiorrhiza*) après sa fermentation par le champignon *Geomyces luteus*.

**Hur et al. (2014)** ont montré que la fermentation des plantes et des fruits induisait la dégradation structurelle des parois cellulaires des plantes, entraînant la libération ou la synthèse de divers composés antioxydants.

Après une fermentation de mangue par six microorganismes probiotiques différents (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae* D254, *S. cerevisiae* DV10, et *S. cerevisiae* R2), **Jin et al. (2018)** constatent que seul *L. plantarum* permet l'obtention de plus d'acides organiques et de valeurs FRAP plus fortes.

Lors d'une étude réalisée par **Sravan Kumar et al. (2015)**, la fermentation de fruits d'épinards de Malabar (*Basella rubra*) par *Saccharomyces cerevisiae* a induit une nette augmentation de leur pouvoir antioxydant. L'augmentation des valeurs ORAC et DPPH pourrait être due à l'augmentation des pigments extractibles.

L'augmentation de l'activité antioxydante sous l'effet de la fermentation a été rapportée aussi par plusieurs autres auteurs (**Moore et al., 2007 ; Yang et al., 2012 et Zou et al., 2017**). D'autres auteurs ont obtenu des résultats similaires après la fermentation spontanée de 170 jus d'orange (**Kelebek et al., 2009**) et de moûts de raisin (**Sun et al., 2011**).

Par ailleurs, **Li et al. (2018)** ont rapporté que la fermentation de jus de pomme par la souche *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 ou encore par des bactéries lactiques augmentait l'activité antioxydante de 23 et de 28% selon les tests DPPH et ABTS, respectivement.

Selon **Xu et al. (2019)**, l'augmentation de la capacité antioxydante durant la fermentation peut être due à une production des métabolites à forte activité antioxydante durant le processus de fermentation.

**Melini et al. (2019)** dans leurs travaux effectués sur les aliments fermentés en vue de promouvoir la santé, ils ont rapporté que la fermentation augmentait l'activité antioxydante des laits, des céréales, des fruits et légumes, de la viande et du poisson. Des peptides antihypertenseurs sont détectés dans le lait fermenté et les céréales. La modification de la teneur en vitamines a été observée principalement dans le lait et les fruits fermentés.

L'organisme humain n'est pas en mesure de synthétiser ces composés bioactifs, ils doivent être apportés par l'alimentation. Les résultats montrent que le jus d'orange fermenté est une source importante pour un supplément exogène des dits composés bioactifs, en supposant un avantage supplémentaire par rapport au même jus d'orange mais non fermenté.

Il est reconnu que la consommation de fruits et légumes, qui contiennent divers composés antioxydants comme les polyphénols, les caroténoïdes et l'acide ascorbique, intensifie et améliore le système de défense Antioxydant.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons déterminé le profil phénolique et l'activité antioxydante de quelques fruits d'origine algérienne (dattes, orange et olive); et d'origine espagnole (raisins et jus d'orange).

Parmi les différents solvants d'extraction des polyphénols de dattes, le mélange acétone-eau (70/30/ V/V) s'est révélé plus efficace que l'eau à 60°C. L'éthanol-eau et le méthanol-eau (80/20) étaient des solvants aussi efficaces que l'eau pour extraire les polyphénols totaux et les flavonoides totaux à partir des autres végétaux étudiés.

Des différences ont été notées dans les teneurs en polyphénols totaux et en anthocyanines chez les trois variétés de dattes : Deglet-Nour, Ghars et Ajwa. La détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de dattes par la méthode de l'ORAC-FL a donné des résultats beaucoup plus importants que ceux rapportés par la littérature pour le même fruit.

La variété algérienne Deglet-Nour renferme des concentrations plus élevées en polyphénols et anthocyanes couplées à une forte activité antioxydante par rapport aux variétés Ajwa et Ghars. L'existence d'une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la concentration en polyphénols totaux reste encore controversée de nos jours.

Les raisins renferment dans leur peau et pulpe une quantité beaucoup plus importante en polyphénols (tannins, flavonols, acides phénoliques et resvératrol). Les résultats ont révélé que les variétés de raisins blancs (Chardon: Tresp et Jean Leon) contiennent des concentrations en composés phénoliques totaux inférieures à celles des variétés rouges. Par ailleurs, les deux variétés blanche et rouge ont manifesté une forte activité antioxydante.

L'olivier, de part son fruit l'olive et ses feuilles, représente une bonne source en composés phénoliques. La valorisation du noyau d'olive a aussi suscité l'intérêt de cette étude qui a porté sur deux variétés algériennes : chemlal et sigoise. Il apparaît que la variété d'olive Sigoise renferme nettement plus de polyphénols que la variété chemlal dans la pulpe (103.77

vs 49.79 mg GAE/100g de poids frais) et dans le noyau (111.12 vs 79.37 mg GAE/100g de poids frais).

L'activité antioxydante des raisins augmentait selon la densité de la variété. Les valeurs de DPPH les plus élevées ont été enregistrées pour la variété GP (rouge) et que la plus faible valeur a été représentée par la variété blanche Chardonnay (CL).

L'analyse par HPLC a révélé une grande variabilité de la teneur en composés phénoliques chez les différents végétaux étudiés. Pour les dattes, les acides férulique, coumarique, gallique, hydroxybenzoïque et vanillique étaient les plus dominants.

Par ailleurs, les flavanones ont été détectés comme principaux composés flavonoïdes dans le jus d'orange industriel étudié.

L'analyse qualitative des extraits phénoliques de peau, de pulpe et de pépins de raisins a montré la présence des catéchines et d'épicatéchines ; alors que l'acide gallique et les procyanidines B1, B2 et B3 ont été détecté uniquement dans la pulpe et les pépins.

La pulpe de raisin se particularise par sa richesse en acides de saveur (protocatéchique, siringique, caftarique, coumarique et coumarique) en plus d'autres composés tels que (tirosole, quercétine, kamférol glucoside et l'isoquercétine).

La fermentation de jus de dattes a induit une augmentation de la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes. Paradoxalement, la fermentation de jus d'orange a provoqué une diminution remarquable de sa teneur en polyphénols totaux. Selon **Dang et Nguyen (2018)** et **Li et al (2016)**, cette diminution pourrait être due à la tendance de certains composés phénoliques à se fixer à des protéines ou même à subir des réactions de polymérisation.

Si la fermentation du jus de dattes génère une augmentation de la teneur en flavonoïdes totaux tout comme c'était le cas pour les polyphénols totaux ; celle du jus d'orange a un effet contraire à celui observé pour les polyphénols totaux, c'est-à-dire qu'elle induit une augmentation de cette teneur en flavonoïdes totaux marquée par une hausse de la teneur en flavanones. La fermentation apparaît comme une transformation positive quant au contenu phénolique des jus de dattes et d'orange.

L'examen de la principale activité biologique des extraits phénoliques des différents végétaux, en l'occurrence l'activité antioxydante, en liaison avec la fermentation a mis en évidence le lien entre cette activité et la richesse des fruits en polyphénols qui se trouve améliorée par le processus fermentaire.

L'augmentation des valeurs de l'ORAC pourraient être dues à l'augmentation des flavanones totales.

Dans cette étude, nous avons conclu que la fermentation du jus d'orange pourrait être achevée au bout de 9 à 11 jours. Dans cet intervalle de temps, le jus d'orange fermenté présentait les valeurs maximales d'ORAC et une augmentation significative des flavanones totales. Ainsi, la boisson potentielle produite par la fermentation alcoolique du jus d'orange aurait une teneur en antioxydant et une capacité antiradicalaire plus élevées que le jus d'orange non fermenté.

Le jus d'orange fermenté pourrait être un nouvel aliment fonctionnel, et sa consommation pourrait procurer un effet potentiellement positif sur la santé. Néanmoins, d'autres aspects liés aux caractères organoleptiques du jus d'orange fermenté, et en particulier sa teneur en alcool, devraient être déterminés avant de tirer des conclusions définitives.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

1. **Abad-Garcia B., Garmon-Lobato S., Berrueta L.A., Gallo B., and Vicente F. (2012).** Online characterization of 58 phenolic compounds in citrus fruit juices from Spanish cultivars by highperformance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 99, 213-224
2. **Abraham A., Kattoor A.J., Saldeen T., and Mehta J.L. (2018).** Vitamin E and its anticancer effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 May 10:1-23. doi: 10.1080/10408398.2018.1474169.
3. **Al-Alawi R.A., Al-Mashiqri J.H., Al-Nadabi J.S.M., Al-Shihi B.I., and Baqi Y. (2017).** Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.): Natural Products and Therapeutic Options. *Frontiers in plant Science journal.* May 2017 | Volume 8 | Article 845.
4. **Al-Asmari F.N., Nimal M., Chaliha M., Mereddy R., Shelat K., and Sultanbawa Y. (2017).** Physico-chemical characteristics and fungal profile of four Saudi fresh date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Journal of Food Chemistry.* **221**, 644 – 649.
5. **Al-Farsi M., Alasalvar C., Morris A., Baron M., and Shahidi F. (2005).** Comparison of antioxidant activity, anthocyanes, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun- Dried date (*Phoenix dactylifera* L). Varieties grown in Oman. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**, 7592-7599.
6. **Allaith A.A. (2008).** Antioxioidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science and Technology.* 2008, **43**, 103 – 1040.
7. **Allaith A.A., Ahmed S.H., and Jafer F. (2012).** Effect of different thermal treatments and freezing on the antioxidant constituents and activity of two Bahraini date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Food Science and Technology* **47**, 783-792.
8. **Al-Turki S., Mohamed A.S., and Stushnoff C. (2010).** Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits as affected by cultivar and location. *Journal of Food Agriculture and Environment* **8(1)**, 253 – 260.
9. **Anagnostopoulou M.A and Kefalas P. (2012).** Bioflavonoid profile of citrus juices from Greece. *Biomed Chromatogr.* 2012 Oct;26(10):1252-68. doi: 10.1002/bmc.2687.
10. **Andjelkovic M., Van Camp J., Trawka A and Verhé R. (2010).** Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. Volume112, Issue2 No. 208-217. doi.org/10.1002/ejlt.200900021
11. **Andjelkovic M., Radovanovi B., Radovanovi A and Andjelkovic A.M. (2013).** Changes in Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grapes cv Vranac During Ripening. *S. Afr. J. Enol Vitic.* VoL 34, No. 2,2013.
12. **Anonyme. (2015).** Rapport du ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et des forêts. Les politiques agricoles à travers le monde. Quelques exemples traités.
13. **Awad M.A., Al-Qurashi A.D and Mohamed S.A. (2011).** Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. *Sciences Horticulturae* **129**, 688 – 693.

-B-

14. **Badwaik L.S ; Borah PK and Dekka SC. (2014).** Antimicrobial and enzymatic antibrowning film used as coating for bamboo shoot quality improvement. *Carbohydr Polym.* **15**;103:213-20. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.027.
15. **Baliga M.S., Baliga B.R.V., Kandathil S.M., Bhat H.P.B., and Vayalil K. (2011).** A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Research International.* **44**, 1812-1822.
16. **Behija Safi E., El Arem A., Issaoui M., Hammami M., and Achour L. (2009).** Phenolic content and antioxidant activity of four date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit varieties grown in Tunisia. *International Journal of Food Sciences and Technology* **44**, 2314 -2319.
17. **Benmeddour Z., Mehinagic E., Le Meurlay D., and Louaileche H. (2013).** Phenolic composition and antioxidant activity of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods* **5**, 346 – 354.
18. **Ben Youssef N., Zarrouk W., Carrasco-Pancorbo A., Ouni Y., and Segura-Carretero. (2019).** Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 199-204. Volume **90**, Issue2.
19. **Blois M.S. (1958).** Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature*, **181** :1199-1200)
20. **Borchani C., Besbes S., Masmoud M.I., Blecker C., Paquot H.M., and Attia M. (2011).** Effect of drying methods on physico-chemical and antioxidant properties of date fiber concentrates. *Food Chemistry* **12**, 1194- 1201.
21. **Borochoy-Neori H., Greenberg A., Judeinstein S., Volkova N., , Rosenblat M., and Aviram M. (2015).** Antioxidant and Antiatherogenic Properties of Phenolic Acid and Flavonol Fractions of Fruits of ‘Amari’ and ‘Hallawi’ Date (*Phoenix dactylifera* L.) Varieties. *J Agric Food Chem.* **1**;63(12):3189-95. doi: 10.1021/jf506094.
22. **Brad. (2008).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Journal of Food Chemistry* **87**, 559 – 566.
23. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LTW- Food Sci. Technol.* **28**: 29-36).
24. **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales : 1288.
25. **Burin M.V., Ferreira-Lima N.E., Panceri C.P., and Bordignon-Luiz M.T. (2014).** Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal* **114** (2014) 155–163
26. **Burri S C M, Ekholm A, Håkansson A, Tornberg E and Rumpunen K. (2017).** Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *J Funct Foods.* 2017 Nov; **38**(Pt A):119–127. doi: 10.1016/j.jff.2017.09.003

- C -

27. Cadot Y. (2015). Maturité phénolique des raisins et profils des vins. Rapport des recherches sur les vignes. INRA, UE1117 Vigne Vin, F-49070 Beaucouzé, France.
28. Cai Y., Luob Q., Sunc M., and Corkea H. (2003). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer . *Life Sciences* 74 (2004) 2157–2184
29. Canterino S., Donno M.D., Mellano M.G., Beccaro G., and Bounous G. (2012). Nutritional and sensory survey of *Citrus sinensis* L cultivars grown at the most northern limit of the mediterranean latitude. *Journal of food quality* ISSN 1747-4557. 35 (2012) 108-118.
30. Cao G.H and Prior R.L. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Oxidants and antioxidants. *Method. Enzymol.* 299: 50-62
31. Cheftel J.C et Cheftel H. (1992). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol.3. p: 355.
32. Chen Y.F., Lee S.L., and Chou C.C. (2011). Fermentation with *Aspergillus awamori* enhanced contents of amino nitrogen and totalphenolics as well as the low-density lipoprotein oxidation inhibitory activity of black soybeans. *J Agric Food Chem.* 59 (8):3974-9. doi: 10.1021/jf2001684.
33. Cortes-Castell E., Veciana-Galindo C., Torro-Montell L., Antonio Palazon-Bru A., Sirvent-Segura E., Gil-Guillen V., and Rizo-Baeza M. (2016). Protection by polyphenol extract from olive stones against apoptosis produced by oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Protección de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas frente a la apoptosis producida por estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano.* 118 - 122. *Nutr Hosp.* 2016; 33(1):118-122 ISSN 0212-1611

- D -

34. Daayf F., El Bellaj M., El Hassni M., J'Aiti F., et El Hadrami I. (2003). Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f.sp. albedinis culture medium. *Environ. Experiment. Botany*, 49. pp 41- 47.
35. Dang Y.K.T and Nguyen H.V.H. (2018). Effects of Maturity at Harvest and Fermentation Conditions on Bioactive Compounds of Cocoa Beans. *Plant Foods Hum Nutr.* doi: 10.1007/s11130-018-0700-3.
36. Das S.K et Singha I. (2014). Free Radical Scavenging Properties of Skin and Pulp Extracts of Different Grape Cultivars In Vitro and Attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Liver Tissue Ex Vivo. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jul;30(3):305-12. doi: 10.1007/s12291-014-0442-4.
37. Da Silva Fernandes M., Sanches Lima F., Rodrigues D., Handa C., Guelfi M., Garcia S., and Ida E.I. (2017). Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. *Food Chem.* 2017 Aug 15;229:373-380. doi: 10.1016/j.foodchem.
38. Dekdouk N., Malafronte N., Russo D., Faraone I., De Tommasi N., Ameddah S., Severino L., and Milella L.(2015). Phenolic Compounds from *Olea europaea* L. Possess Antioxidant Activity and Inhibit Carbohydrate Metabolizing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2015, Article ID 684925, 9 pages.
39. Diem Do Q., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Edi Soetaredjo F., Ismadji S., and Ju Y.H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica* . *journal of food and drug analysis* 22 ( 2 0 1 4 ). P : 2 9 6 - 3 0 2.

40. **Doshi P., Adsule P., Banerjee K., and Oulkar D. (2015).** Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L.) byproducts. *J Food Sci Technol* (January 2015) 52(1):181–190
41. **Dulf F.V., Vodnar D.C., Dulf E.H., and Toşa M.I. (2015).** Total phenolic contents, antioxidant activities, and lipid fractions from berry pomaces obtained by solid-state fermentation of two *Sambucus* species with *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem.* 8;63(13):3489-500. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00520.
42. **Dulf F V., Vodnar D.C., et Socaciu C. (2016).** Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chem.* 2016 Oct 15;209:27-36.

- E-

43. **El-Achi N., Bakkour Y., El-Nakat H and El-Omar F. (2014).** HPLC analysis for identification and quantification of phenolic acids and flavonoids in *Juniperus excels.* *Journal of Natural Product.* Vol. 7(2014): 162-167
44. **El Souli A., Sebai H., Rtibi K., Chehimi L., Sakly M; and Amri M. (2014).** Effects of dates pulp extract and palm sap (*Phoenix dactylifera* L.) on gastrointestinal transit activity in healthy rats. *J. Med. Food* 17, 782–786. doi: 10.1089/jmf.2013.0112
45. **Evans E., Sugawara N., Haber J.E., and Alani E. (2000).** The *Saccharomyces cerevisiae* Msh Mismatch Repair Protein localizes to Recombination Intermediates *In Vivo.* *Molecular cell.* Volume 5, issue 5, may 01, 2000.

- F-

46. **FAO. (2012).** Mettre les systèmes alimentaires au service d'une meilleure nutrition. Deuxième Conférence internationale sur la nutrition (CIN2). Rapport du Secrétariat mixte FAO/OMS de la Conférence.
47. **Ferlazzo N., Visalli G., Smeriglio A., Cirimi S., Enrico Lombardo G., Pi Campiglia P., Di Pietro A., and Navarra M. (2015).** Flavonoid Fraction of Orange and Bergamot Juices Protect Human Lung Epithelial Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2015, Article ID 957031, 14 pages.
48. **Filannino P., Ivana Cavoski P., Thlien N., Vincentini O., De Angelis M., Silano M., Gobbetti M., and Di Cagno R. (2016).** Lactic Acid Fermentation of Cactus *Cladodes (Opuntia ficus-indica* L.) Generates Flavonoid Derivatives with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *PLOS ONE journal.* | DOI:10.1371/journal.pone.0152575 March 29, 2016.1-22.

- G -

49. **Gil-Izquierdo A., Gil M.I., Ferreres F., and Tom Barber F.A. (2001).** In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1035-1041.

50. **Gonçalves D., Lima C., Ferreira P., Costa P., Costa., Walter Figueiredo A., and Cesara T. (2017).** Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. *Food & nutrition research*, 2017 VOL. 61, 1296675 <http://dx.doi.org/10.1080/16546628.2017.1296675>
51. **Goni I and Serrano J. (2005).** The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. *Journal of Science and Agriculture*. Volume85, Issue11 .30 August 2005. Pages 1877-1881
52. **Gorzynik-Debicka M., Przychodzen P., Cappello F., Kuban-Jankowska A., Marino Gammazza A., Knap N., Wozniak M., and Gorska-Ponikowska M. (2018).** Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 547; doi:10.3390/ijms19030686
53. **Grace Nirmala J., Evangeline Celsia S., Swaminathan A ., Narendhirakannan R.T and Chatterjee S.(2018).** Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. *Cytotechnology* (2018) 70:537–554 <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0125-0>
54. **Guerrero R.F., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gil-Izquierdo A., García-Barroso C., and Cantos-Villar E. (2009).** Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112, 949-955. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.014>)
55. **Guimarães M., Mateus N., De Freitas, V., and Cruz, L. (2018).** Improvement of the Color Stability of Cyanidin-3-glucoside by Fatty Acid Enzymatic Acylation (2018) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (38), pp. 10003-10010.

- H -

56. **Hakala P., Lampi A.M., Ollilainen V., Werner U., Murkovic M., Wähälä K., Karkola S., et Piironen V. (2002).** Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fraction, *J. Agric. Food chem.* 50, 2002, pp 5300-5307.
57. **Hamad I., Abd Elgawad H., Al Jaouni S., Zinta G., Asard, H., Hassan S., Hegab M., Hagagy N., & Selim S. (2015).** Metabolic Analysis of Various Date Palm Fruit (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars from Saudi Arabia to Assess Their Nutritional Quality. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(8), 13620-13641.
58. **Harbon J B. (1993).** Phénolics- In: Man, their chemistry and biological significance. Long man scientific and technical, London: 361-388.
59. **Harris P.J and Trethewey J.A.K. (2010).** The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochem Rev* (2010) 9:19–33
60. **Hasan N.S., Amon ZH., Norhafizah H., Mohd S.A., and Azian A. (2010)** Nutritional composition and in vitro evaluation of the antioxidant properties of various dates extracts (*Phoenix dactylifera* L.) from Libya. *Asian Journal of Clinical Nutrition* 2(4), 208-214.
61. **Hashemi S.M.B and Mahmoodi M. (2017).** Fermentation of Barberry Juice to Produce Probiotic Beverage. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2017, 13, 204–211.
62. **Hegazy A.E. and Ibrahim M.I. (2012).** Antioxidant Activities of Orange Peel Extracts. *World Applied Sciences Journal* 18 (5): 684-688, 2012
63. **Hemada H.M et Klein B.P. (1990).** Effect of naturally ocuring antioxydant on peroxydase activity of vegetable extracts. *Journal of food science*, 55:184-185.
64. **Hertog M. (1996).** Flavonols in wine and tea and prevention of coronary heart disease. Polyphenols 96.18. *International conference on polyphenols*. Bordeaux (France). July 15-18.P: 118-119.
65. **Huang W.Y., Wu H., Li D.J., Song J.F., Xiao Y.D., Liu C.Q., Zhou J.Z., and Sui Z.Q. (2018).** Protective Effects of Blueberry Anthocyanins against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced

Oxidative Injuries in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Agric Food Chem.* 2018 Feb 21; 66(7):1638-1648.

66. Hur S.J., Lee S.Y., Kim Y.C., Choi I., and Kim G.B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* 2014 Oct 1;160:346-56. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.
67. Hy U., Yang K.M and Chiang P.Y. (2018). Roselle Anthocyanins: Antioxidant Properties and Stability to Heat and pH. *Molecules.* 5;23(6). pii: E1357. doi: 10.3390/molecules23061357.

- I -

68. Iglesias-Carres L., Mas-Capdevila A., Bravo F.I., Cinta Bladé C., Arola-Arnal A., and Begoña Muguera F. (2019). Optimization of extraction methods for characterization of phenolic compounds in apricot fruit (*Prunus armeniaca*). *Food Funct.*, 2019, 10, 6492–6502
69. Igor-Passi L.B. (2002). Etude des activités biologiques de *fagara zanthoxyloides* (Rutaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie de la faculté de Médecine de l'université de Bamako. 127 pages. (2002-2003).
70. Iloki-Assanga L., Simon B., Lidianys M., Lewis-Lujan L., Lara-Espinoza C., Armida A., Salido G., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., and Haines D.D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes* (2015) 8:396 . 2-14

- J -

71. Jiang B and Zhang Z.W. (2012). Comparison on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Cabernet Sauvignon and Merlot Wines from Four Wine Grape-Growing Regions in China. *Molecules* 2012, 17, 8804-8821; doi:10.3390/molecules17088804
72. Ji L.L., Fu R., and Mitchell E.W. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Nov;73(5):1854-9
73. Jin X., Chen W., Chen H., Chen W., and Zhong Q. (2018). Comparative Evaluation of the Antioxidant Capacities and Organic Acid and Volatile Contents of Mango Slurries Fermented with Six Different Probiotic Microorganisms. *J Food Sci.* 2018 Nov 6. doi: 10.1111/1750-3841.14373.
74. Jinlu L., Tian Y., Liao M., and Zhang Z. (2016). Influence of Berry Heterogeneity on Phenolics and Antioxidant Activity of Grapes and Wines: A Primary Study of the New Winegrape Cultivar Meili (*Vitis vinifera* L.). *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0151276 March 14, 2016. Pages (1-18).
75. Juan M.Y and Chou C.C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiol.*;27(5):586-91. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.002.

- K -

76. Kammerer D., Claus A., Carle R., and Schieber A.(2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2004 Jul 14;52(14):4360-7.

77. **Kaprasob R., Kerdchoechuen O., Laohakunjit N., Thumthanaruk B., and Shetty K. (2018).** Changes in physico-chemical, astringency, volatile compounds and antioxidant activity of fresh and concentrated cashew apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum*. *J Food Sci Technol.* 2018 Oct;55(10):3979-3990. doi: 10.1007/s13197-018-3323-7.
78. **Karasawa K., Uzuhashi Y., Hirota H.M., and Otani K. (2012).** A matured fruit date palm tree (*Phoenix dactylifera L.*) stimulates the cellular Immune system in mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, 11287 -11293.
79. **Katalinić M., Rusak G., Domaćinović Barović J., Sinko G., Jelić D., Antolović R., and Kovarik Z. (2010).** Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem.* 2010 Jan;45(1):186-92. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.09.041.
80. **Kchaou W; Abbes F; Blecker C; Attia H B and Esbes S. (2013).** Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera L.*). *Journal of Industrial Crops and Products* 45, 262 – 269.
81. **Kim D.O., Seung W.J., and Lee C.Y. (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81, 321–326.
82. **Kelebek H., Selli S., Canbas A., and Cabaroglu T. (2009).** HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. *Kozan*. *Microchem. J.* 2009, 91, 187–192
83. **Klimczak I., Malecka M., Szlachta M., and Gliszczynka-Swiglo A. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J. Food Compos.* 20, 313–322.
84. **Klopotek Y., Otto K and Bohm V. (2005).** Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5640–5646
85. **Kocabey N., Yilmaztekin M.A., and Hayaloglu A. (2016).** Effect of maceration duration on physicochemical characteristics, organic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of red wine from *Vitis vinifera L.* Karaoglan. *J Food Sci Technol.* 2016 Sep; 53(9): 3557–3565.
86. **Kouka P., Priftis A., Stagos D., Angelis A., Stathopoulos P., Xinos N., Skaltsounis AL., Mamoulakis C., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A and Kouretas D. (2017).** Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int J Mol Med.* 2017 Sep;40(3):703-712. doi: 10.3892/ijmm.2017.3078.
- L-
87. **Lafka T.I., Lazou A.E., Sinanoglou V.J., and Lazos E.S. (2013).** Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Foods.* 2013 Jan 4;2(1):18-31. doi: 10.3390/foods2010018.
88. **Landete M.J., Hernández T., Robredo S., Dueñas M., de Las Rivas B., Estrella I., and Muñoz R. (2015).** Effect of soaking and fermentation on content of phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit) and mung beans (*Vigna radiata [L] Wilczek*). *Int J Food Sci Nutr.* 2015 Mar;66 (2):203-9. doi: 10.3109/09637486.2014.986068.
89. **Liu X., Jinlu L., Yuping T., Mingan L., and Zhenwen Z. (2016).** Influence of Berry Heterogeneity on Phenolics and Antioxidant Activity of Grapes and Wines: A Primary Study of the New Winegrape Cultivar Meili (*Vitis vinifera L.*). *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0151276 March 14, 2016

90. **Li Z., Teng J., Lyu Y., Hu X., Zhao Y., and Wang M. (2018).** Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules*. 2018 Dec 24; 24(1). pii: E51. doi: 10.3390/molecules24010051.

- M -

91. **Macheix J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C. (2005).** Les Composés Phénoliques des Végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, 2005. Presses polytechniques et universitaires romandes. pp 1-17.
92. **Machlin L.J and Bendich A (1987).** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, 1(6), 441-445.
93. **Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoudé G.A., and Barrandon Y. (2008).** Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *-Nature*. 13;456(7219):250-4. doi: 10.1038/nature07406.
94. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy ., and Jiménez L. (2008).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American of clinical Nutrition* 79, pp.727-31.
95. **Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges. pp 220.
96. **Matés J.M., Pérez-Gómez C et Núñez de Castro I. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999 Nov;32(8):595-603.
97. **Medina-Reyon A., Barrionuevo-Gonzalez A., Zamora R., Andrea L.C., Estruch R., Martinez M.A., Espino J.D., and Lamuela R. (2009).** Rapid folin- Ciocalteu method using microtiter 96- well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytical Chemica Acta* 634, 54- 60.
98. **Melini F., Melini V., Luziatelli F., Grazia Ficca A., and Ruzzi M. (2019).** Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*. 2019 May; 11(5): 1189. doi: 10.3390/nu11051189
99. **Minnaar P.P., Jolly N.P., Paulsen V., Du Plessis H.W., and Van Der Rijst M. (2017).** *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in sequential fermentations: Effect on phenolic acids of fermented Kei-apple (*Dovyalis caffra* L.) juice. *Int J Food Microbiol.* 18;257:232-237. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.
100. **Mohamed S.A., Awad M.A., and Al-Qurashi A.D. (2014).** Antioxidant activity, antioxidant compounds, antioxidant and hydrolytic enzymes activities of “Barhee” dates at harvest and during storage as affected by pre-harvest spray of some growth regulators. *Journal of Sciences Horticulturae* 167, 91- 99.
101. **Mompon B., Lemaire B., Mengal P., and Surbled M. (1996).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, (Paris): 145-149.
102. **Moore J., Cheng Z., Hao J., Guo G., Liu J.G., Lin C., and Yu L.L. (2007).** Effects of solid state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran. *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55, 10173–10182. 878
103. **Morand C., Dubray C., Milenkovic D., Lioger D., Martin J.F., Scalbert, A., and Mazur A. (2011).** Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 93, 73-80.
104. **Mrabet A ; Rodriguez-Arcos R ; Guillen-Bejarano R ; Chaira N ; Ferchichi A and Jimenez-Araujo A. (2012).** Dietary fiber from Tunisian common date cultivars

(*Phoenix dactylifera* L.): Chemical composition, Functional properties, and Antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **60**, 3658 – 3664.

105. **Mrabet A., Jiménez-Araujo A., Fernández-Bolaos J., Rubio-Senent F., Lama-Mu-oz A., and Sindic M. (2016).** Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments. *Food Chem.* 196, 917–924. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.026
106. **Mullen W., Archeveque M.A., Edwards C.A., Matsumoto H., and Crozier A. (2007).** Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11157-11164.

- N -

107. **Nile S.H., Kim S.H., Young K.E., and Sewon P. (2013).** Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 718065, 5 pages.
108. **Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T., and Nakagawa Y. (2000).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* (2000) **351**, 183–193 (Printed in Great Britain).

- O -

109. **Obreque-Slier E., Peña-Neira A., López-Solís R., Cáceres-Mella A., Toledo-Araya H., López-Rivera A. (2013).** Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT - Food Science and Technology* .54 (2013) 404e413
110. **Okado-Matsumoto A and Fridovich I. (2001).** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):38388-93.
111. **Ollat N et Touzard J.M. (2015).** Adaptation à long terme au changement climatique pour la viticulture et l'œnologie: un programme de recherche sur les vignobles. INRA. Pages : 35-38.
112. **Omboa O.S and Isah L.R. (2018).** Influence of Sourdough Fermentation on Amino Acids Composition, Phenolic Profile, and Antioxidant Properties of Sorghum Biscuits. *Prev Nutr Food Sci.* 2018 Sep; 23(3): 220–227. doi: [10.3746/pnf.2018.23.3.220
113. **Oteros J. (2014).** Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo (Doctoral Thesis). University of Córdoba, Córdoba, Spain.

- P -

114. **Packer L. (1997).** Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. J Sports Sci.* 1997 Jun;15 (3):353-63.
115. **Peerajan S., Chaiyasut C., Sirilun S., Chaiyasut K., Kesika P., and Bhagavathi Sivamaruthi B.U. (2016).** Enrichment of nutritional value of *Phyllanthus emblica* fruit juice using the probiotic b00000000acterium, *Lactobacillus paracasei* HII01 mediated fermentation. *Food Sci. Technol* (Campinas) vol.36 no.1 Campinas Jan./Mar. 2016.http://dx.doi.org/10.1590/1678-

457X.0064

116. **Pekka J.R. (2001)**. Thèse de doctorat, University of helsinki, (2001).pp 2
117. **Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., and Brighenti F. (2003)**. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 2003, 133, 2812–2819.
118. **Perret C. (2001)**. Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produites par brotrytis cinerea. Thèse de doctorat. *Université de Neuchatel*, Suisse. 184 p.
119. Powers S.K and Lennon S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 1999 Nov; 58(4):1025-33.

- R -

120. **Rampersaud G.C. (2007)**. A comparison of nutrient density scores for 100% fruit juices. *J Food Sci.* 2007 May;72(4):S261-6.
121. **Raspirada p., Lo Cascio R., Tomaino A., and Bonina F. (1999)**. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11):4718-23
122. **Rauf A., Uddin G and Ali J. (2014)**. Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of *Citrus sinensis*, *Citrus anrantifolia*, and *Citrus limonum*. *Org Med Chem Lett.* 2014 Jul 7;4:5.
123. **Ribereau-Gayon P. (1968)**. Plant Phenolics, Oliver Boyd, Edinburgh. pp 254.
124. **Rodríguez-Hernandez L., Nájera-Gomez H., Luján-Hidalgo M.C., Ruiz-Lau Na., Lecona-Guzmán C.A., Abud-Archila M., Manuel Ruíz-Valdiviezo V., and Gutiérrez-Miceli Federico A. (2018)**. Fatty Acid Profile, Phenolics and Flavonoids Contents in *Olea europaea* L. Callus Culture cv. *Cornicabra*. *Journal of Oleo Science. J. Oleo Sci.* 67, (5) 525-529 (2018).

- S -

125. **Saibandith B., Jeremy P., Spencer E., Ian R., Rowland E., Daniel M., and Commane H. (2017)**. Olive Polyphenols and the Metabolic Syndrome. 2017 . *Molecules* 2017, 22, 1082; doi:10.3390/molecules22071082
126. **Saleh E.A., Tawfik M.S., and Abu-Tarboush H.M. (2011)**. Phenolic contents and antioxidant activity of various date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits from Saudi Arabia. *Food Nutr. Sci.* 2, 1134–1141. doi: 10.4236/fns.2011.210152
127. **Samad M.A; Hashim S.H; Simarani K and Syafawati Y.J. (2016)**. Antibacterial Properties and Effects of Fruit Chilling and Extract Storage on Antioxidant Activity, Total Phenolic and Anthocyanin Content of Four Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Cultivars. *Journal of Molecules.* 2016, 21, 419.
128. **Sanchez-Moreno C., Plaza L., DE Ancos B., and Cano P. (2003)**. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (5), 430-439.
129. **Sandhu A.K and Gu L. (2010)**. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As determined by HPLC-DAD-ESI-MS(n). *J Agric Food Chem.* 2010 Apr 28;58(8):4681-92. doi: 10.1021/jf904211q

130. Scalbert A. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130, 2073–2085.
131. Seeram N.P., Aviram M., Zhang Y., Henning S.M., Feng L., Dreher M., and Heber D. (2007). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1415-1422
132. Shahdadi F., Mirzaei H.O and Daraei Garnakhany A. (2015). Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as function of ripening stages and drying process. *Journal of Food Sciences and Technology* 52(3), 1814-1819.
133. Shahidi F., Naczk M. (1995). Food phenolic, source chemistry, effects and application. *Technomic publishing*. Ed, LAUCASTER: 331.
134. Shama V.J., Edirisinghe I & Burton-Freeman B.M. (2015). Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. Pages 419-444.
135. She Q.B., Ma W.Y, Wang M., Kaji A., Ho C.T., and Dong Z. (2003). Inhibition of cell transformation by resveratrol and its derivatives: differential effects and mechanisms involved. *Oncogene*. 2003 Apr 10;22(14):2143-50.
136. Shi P.B., Yue T.X., Ai L.L., Cheng Y.F., Meng J.F., Li M.H., and Zhang Z.W. (2016). Phenolic Compound Profiles in Grape Skins of Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah and Marselan Cultivated in the Shacheng Area (China). *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 37, No. 2, 2016. 132-138.
137. Silvia B.S., Pârvu A.E., Pop N., Zamora Marín F., and Pârvu M. (2018). Polyphenolic Compounds, Antioxidant, and Cardioprotective Effects of Pomace Extracts from Fetească Neagră Cultivar. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 8194721, 11 pages
138. Singha I and Das S.K. (2015). Free radical scavenging properties of skin and pulp extracts of different grape cultivars In Vitro and attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in liver tissue Ex Vivo. *Ind J Clin Biochem* (July-Sept 2015) 30(3):305–312.
139. Singleton V.L and Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3), 144-158.
140. Soleymani S., Farzaei M.H., Zargaran A., Niknam S and Rahimi R. (2019). Promising plant-derived secondary metabolites for treatment of acne vulgaris: A mechanistic review. *Arch Dermatol Res*. 2019 Aug 26. doi: 10.1007/s00403-019-01968-
141. Sravan Kumar S., Manoj P., and Giridhar P. (2015). A method for red-violet pigments extraction from fruits of Malabar spinach (*Basella rubra*) with enhanced antioxidant potential under fermentation. *J Food Sci Technol.*;52 (5):3037-43.
142. Sridhar K and Charles A.L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*. V. 275. Pages 41-49.
143. Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R., and Culotta V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38084-9.
144. Sun B., Neves A.C., Fernandes T.A., Fernandes A.L., Mateus N., De Freitas V., Leandro C., and Spranger M.I. (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*. 2011, 59, 6550–6557.
145. Svensson L., Sekwati-Monang B., Lutz D.L; Schieber A and Ganzle

- M.G.(2012).** Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 58, 9214–9220
- 146. Swatsitang P., Robards k., Tukker G., and Jardine D. (2000).** Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. *Analytica Chimica Acta.* 417(2):231-240 · July 2000

- T -

- 147. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., and Dommes J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Journal of Food Chemistry* **113**, 1226 – 1233.
- 148. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., and Dommes J. (2010).** Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages. *Journal of Food Chemistry* **20**, 607 – 614.
- 149. Tabeshpour J., Mehri S., Hosseinzadeh H., and Shaebani Behbahani F. (2018).** Protective effects of *Vitis vinifera* (grapes) and one of its biologically active constituents, resveratrol, against natural and chemical toxicities: A comprehensive review: Protective effect of grape. in *Phytotherapy Research* 32(4) · August 2018
- 150. Takaedi M.R., Jahangiri A., Khodayar M.J., Siahpooi S.A., Yaghooti H., Rezaei S., Salecheh M., and Mansourzadeh Z. (2014).** The effect of date (*Phoenix dactylifera* L.) Extract on paraxonase and Arylesterase activities in Hypercholestrolemic Rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharma. Products* **9 (1)**, 30 -34.
- 151. Talcott S.T and Lee J.H. (2002).** Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3186–3192.
- 152. Talhaoui N., Gómez-Caravaca A.M., León L., De la Rosa R., Fernández-Gutiérrez A., and Segura-Carretero A. (2015).** Pattern of Variation of Fruit Traits and Phenol Content in Olive Fruits from Six Different Cultivars. *J Agric Food Chem.* 9; 63(48):10466-76.
- 153. Toktas B., Bildik F and Özçelika b. (2018).** Effect of fermentation on anthocyanin stability and in vitro bioaccessibility during shalgam(,salgam) beverage production. *Sci Food Agric* 2018; 98: 3066–3075
- 154. Tounsi M.S., Wannas W.A., Ouerghemmi I., Jegham S., Ben Njima Y., Hamdoui G., Zemni H., and Marzouk B. (2011).** Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *J. Sci. Food Agric.* 2011, 9, 142–151.

- W -

- 155. Wang C.Y., Wu S.J and Shyu Y.T. (2014).** Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. *J Biosci Bioeng.* 117(4):449-56. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.10.002.
- 156. Wang J J; Tung T H; Yin W H; Huang C M; Jen H L ; Wei J and Young M. S. (2008).** Effects of moderate alcohol consumption on inflammatory biomarkers. *Acta Cardiol.* 2008, 63, 65–72
- 157. Waterhouse A.L. (2002).** Determination of total phenolics. *Current protocols in Food Analytical Chemistry* (2002) II. 1. 1 II. 1. 8
- 158. Wein Z., Luo J., Huang Y., Guo W., Zhang Y., Guan H., Xu C., and Lu Z. (2017).** Profile of polyphenol Compounds of Five Muscadine Grapes Cultivated in the United States and in Newly Adapted Locations in China. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 631;

doi:10.3390/ijms18030631.

159. **Wen X., Zhu M., Rui H., Zhao J., Chen Z., Li J., Ni Y. (2016).** Characterisation of seed oils from different grape cultivars grown in China. *J Food Sci Technol* (July 2016) 53(7):3129–3136.
160. **Woisky R., and Satalino A. (1998).** Analysis of propols : Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic.Res.* 37, pp. 99-105.

- X -

161. **Xu X., Wenxiu H., Siduo Z., Chuanhai T., Xiudong X., Juanmei Z., and Mingsheng D. (2019).** Increased Phenolic Content and Enhanced Antioxidant Activity in Fermented Glutinous Rice Supplemented with Fu Brick Tea. *Molecules* 2019, 24, 671; doi:10.3390/molecules 24040671
162. **Xing Y., Cai L., Yin T.P., Chen Y., Yu J., Wang Y.R., and Ding Z.T. (2016).** Improving the antioxidant activity and enriching salvianolic acids by the fermentation of *Salvia miltiorrhizae* with *Geomyces luteus*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 17(5):391-8. doi: 10.1631/jzus.B1500264.

- Y -

163. **Yamile A., Govela M., and Bornhorst G.M. (2017).** Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During *In Vitro* Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. *Food and science*.<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13842>
164. **Yang E.J., Kim S.I., Park S.Y., Bang H.Y., Jeong J.H., So J.H., Rhee I.K., Song K.S. (2012).** Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 2042–2048.
165. **Yasin B.R., Hassan A., El-Fawal N., and Mousa S.A . (2015).** Date (*Phoenix dactylifera*) Polyphenolics and Other Bioactive Compounds: A Traditional Islamic Remedy's Potential in Prevention of Cell Damage, Cancer Therapeutics and Beyond *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 30075–30090; doi:10.3390/ijms161226210

- Z -

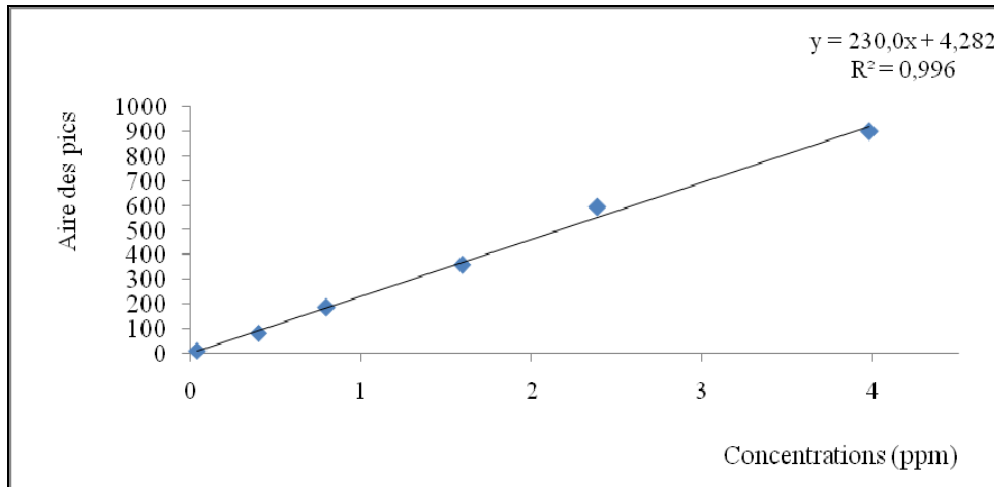
166. **Zamantha escobedo-avellaned A., Serment-moreno V., Valdez Fragoso A., Mujica-Paz H., and Welte-chanes J. (2010).** Phytochemicals and antioxidant activity of comminuted orange (*Citrus sinensis L.*). Department of Biotechnology and Food Engineering, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
167. **Zamora-Ros R., Cayssials V., Jenab M., Rothwell J.A., Fedirko V., Aleksandrova K., Tjønneland A., Kyro C., Overvad K., Boutron-Ruault M.C., Carbonnel F., Mahamat-Saleh Y., Kaaks R., Kühn T., Boeing H., Trichopoulou A., Valanou E., Vasilopoulou E., Masala G., Pala V., Panico S., Tumino R., Ricceri F., Weiderpass E., Lukic M., Sandanger T.M., Lasheras C., Agudo A., Amiano P., Navarro C., Ardanaz E., Sonestedt E., Ohlsson B., Nilsson L.M., Rutegård M., Bueno-de-Mesquita B., Peeters P.H., Khaw K.T., Wareham N.J., Bradbury K., Freisling H., Romieu I., Cross A.J., Vineis P., and Scalbert A. (2018).** Dietary intake of total polyphenol and polyphenol classes and the risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Eur. J. Epidemiol.* 2018 May 15. pp 1-13

- 168. Zhai F.H., Liu H.Y., and Han J.R. (2018).** Protein nutritional value, polyphenols and antioxidant properties of corn fermented with *Agaricus brasiliensis* and *Agaricus*. *World J Microbiol Biotechnol.* Feb 15; 34 (3):36. doi: 10.1007/s11274-017-2399-y.
- 169. Zhang Z.P., Ma J., He Y.Y., Lu J., and Ren D.F. (2018).** Antioxidant and Hypoglycemic Effects of *Diospyros lotus* Fruit Fermented with *Microbacterium flavum* and *Lactobacillus plantarum*. 2018. *J. Biosci. Bioeng.* 2018;125: 682–687. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.005.
- Zou B., Wu J., Yu Y., Xiao G., and Yujuan Xu Y. (2017).** Evolution of the antioxidant capacity and phenolic contents of persimmon during fermentation. *Food Sci Biotechnol* (2017) 26(3):563–571 DOI 10.1007/s10068-017-0099-x

# **Annexes**

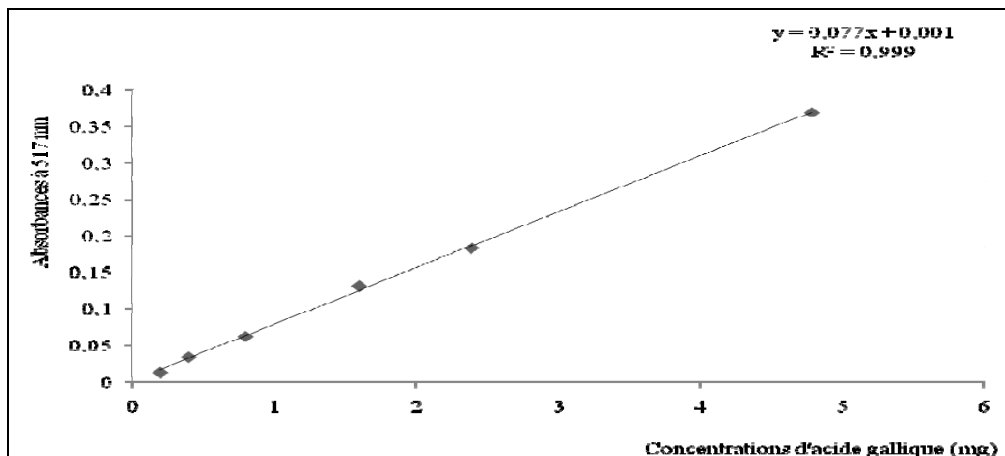
### Annexe : 1

Droite étalon de l'acide ferrulique pour dosage des polyphénols totaux des dattes

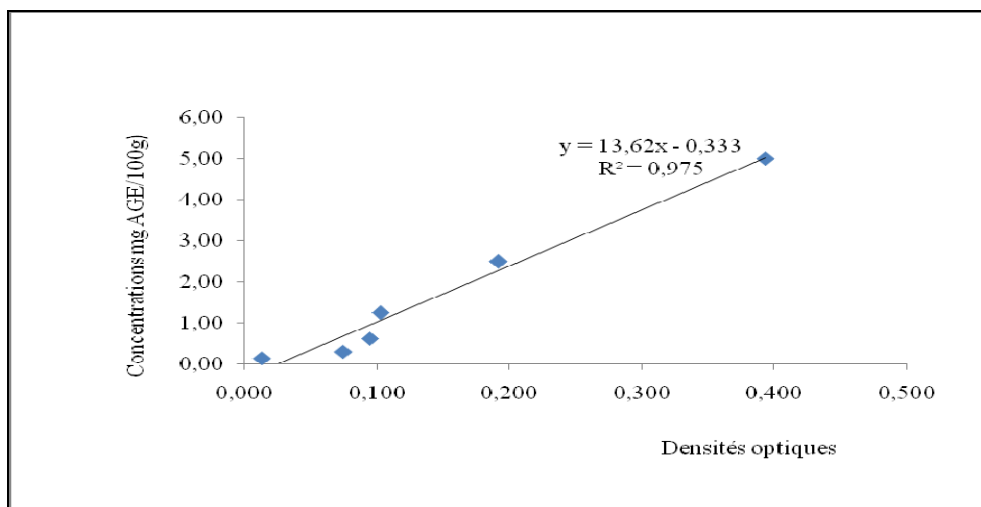


### Annexe : 2

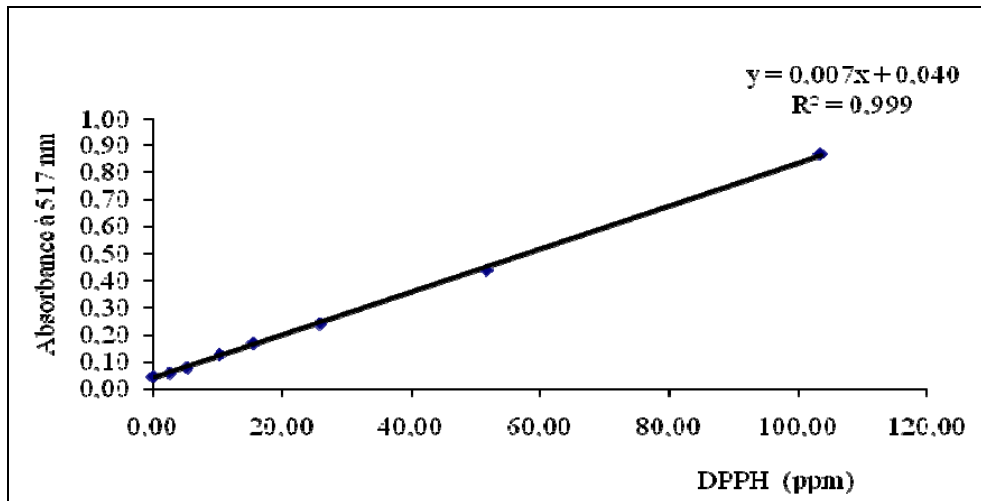
Droite étalon de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux de raisin



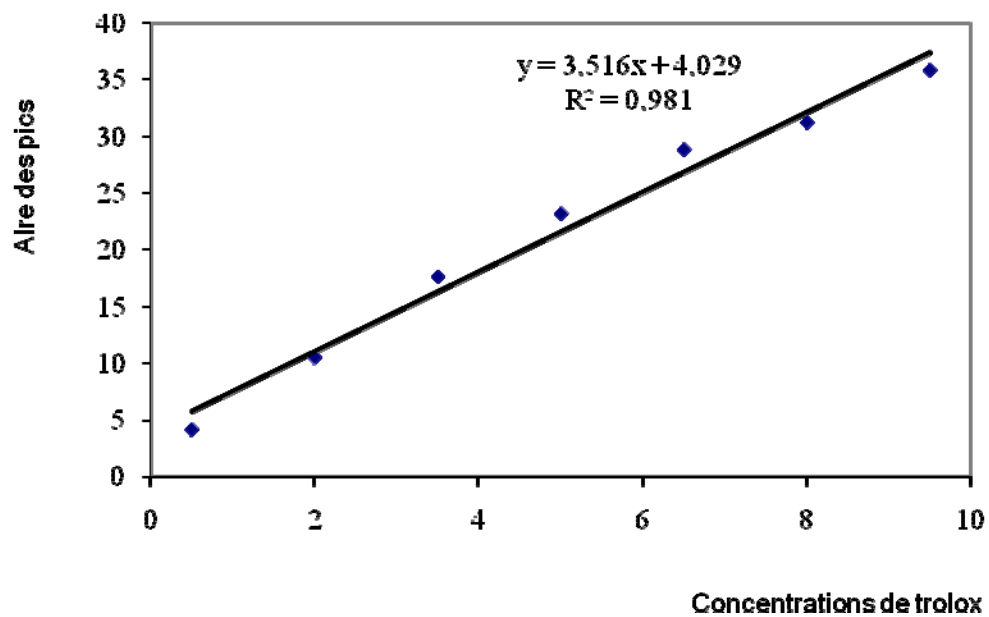
**Annexe : 3** Droite étalon pour dosage des polyphénols de l'olive



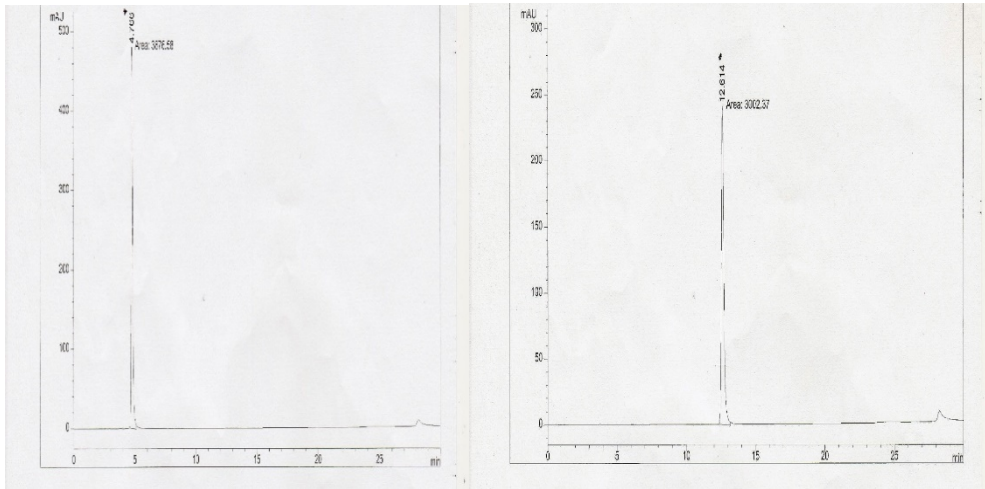
**Annexe 4** : Droite étalon de DPPH de toutes les variétés de raisins étudiées



**Annexe 5** : Droite étalon de Trolox (Méthode ORAC-FL)

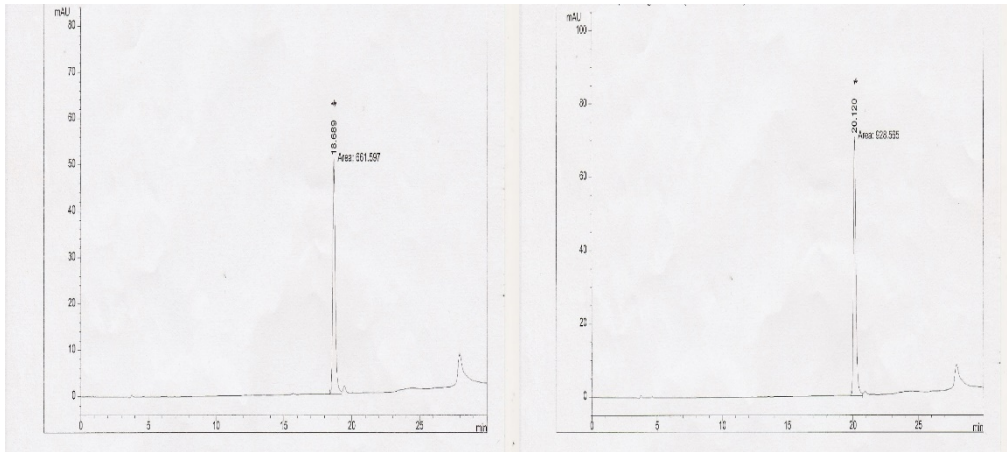


**Annexe 6** : Représentation graphique des solutions étalons (standards) pour analyse HPLC des dattes



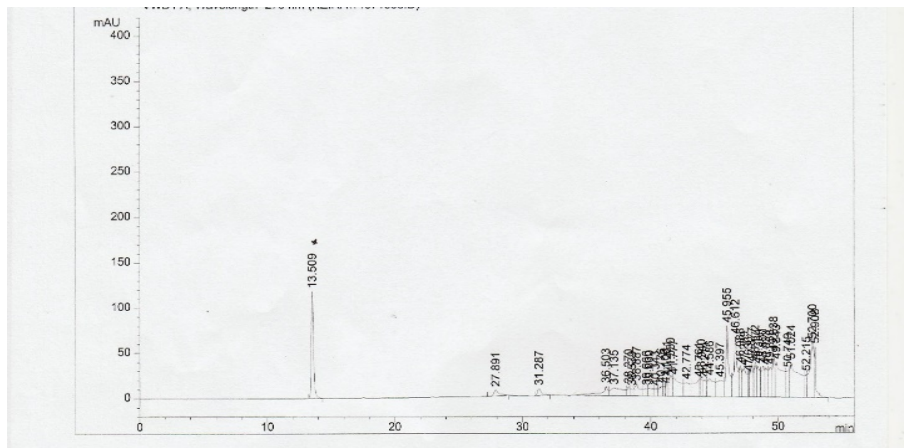
l'acide gallique (AG)

l'acide hydroxybenzoïque (AHB)

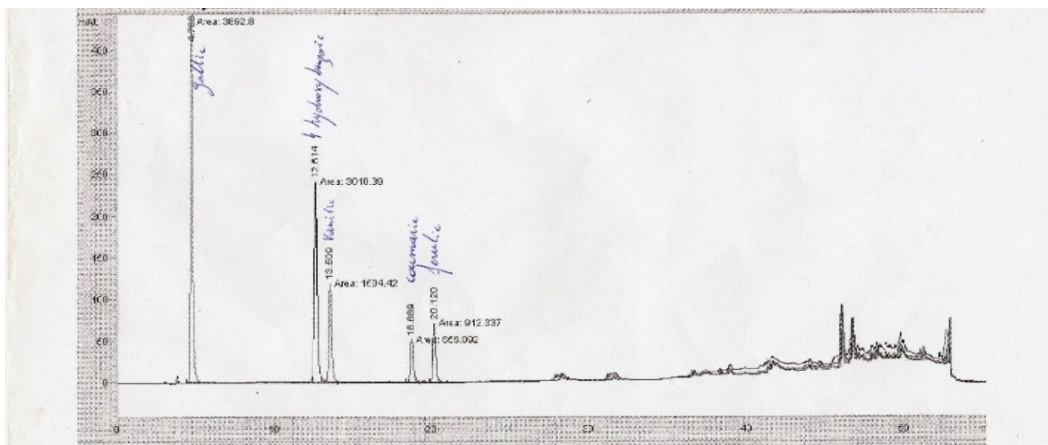


Acide coumarique

Acide ferulique

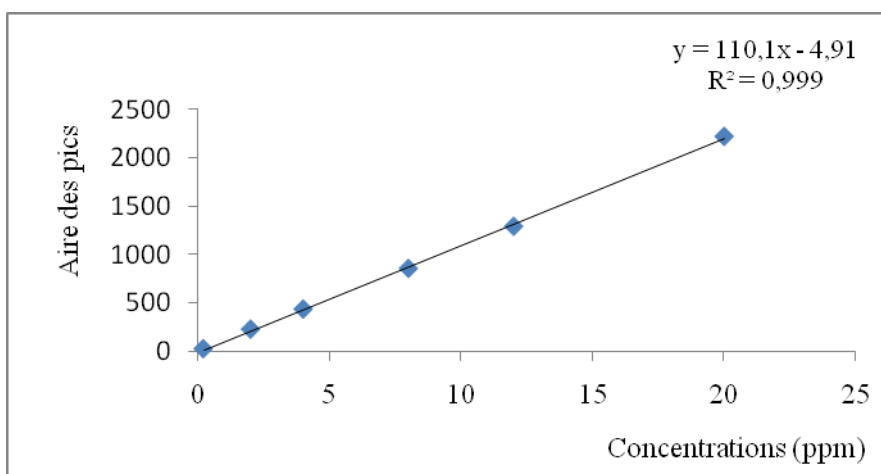


Acide vanilique (pic.1)

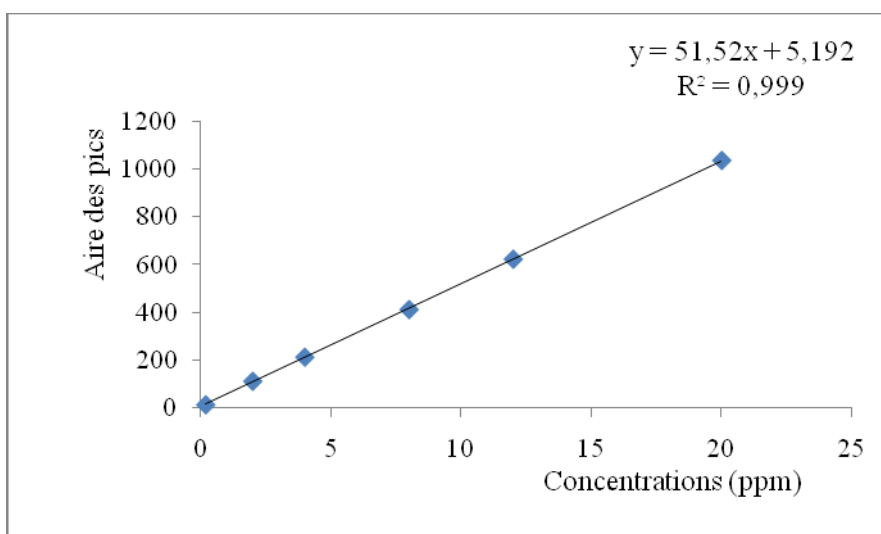


Chromatogrammes HPLC des échantillons de dattes de la variété Deglet-Nour

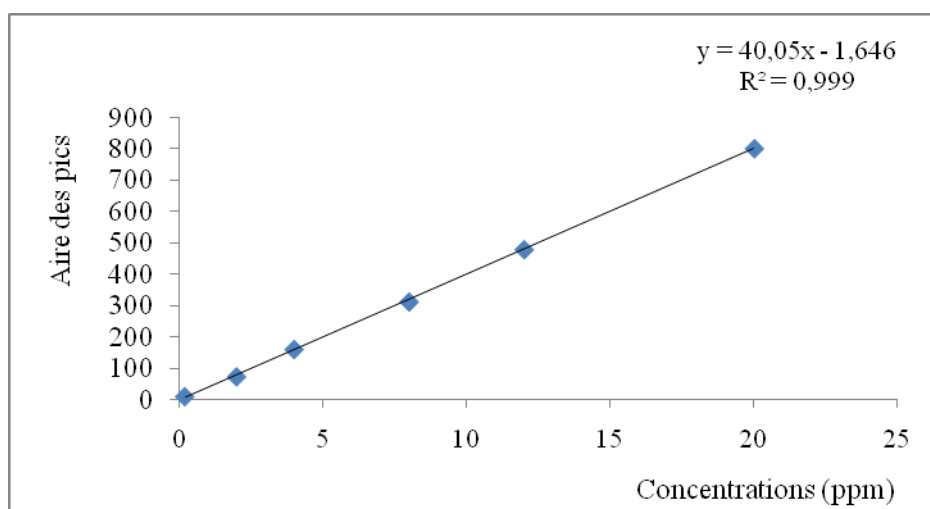
**Annexe 7** : Droites étalons pour l'analyse HPLC des raisins



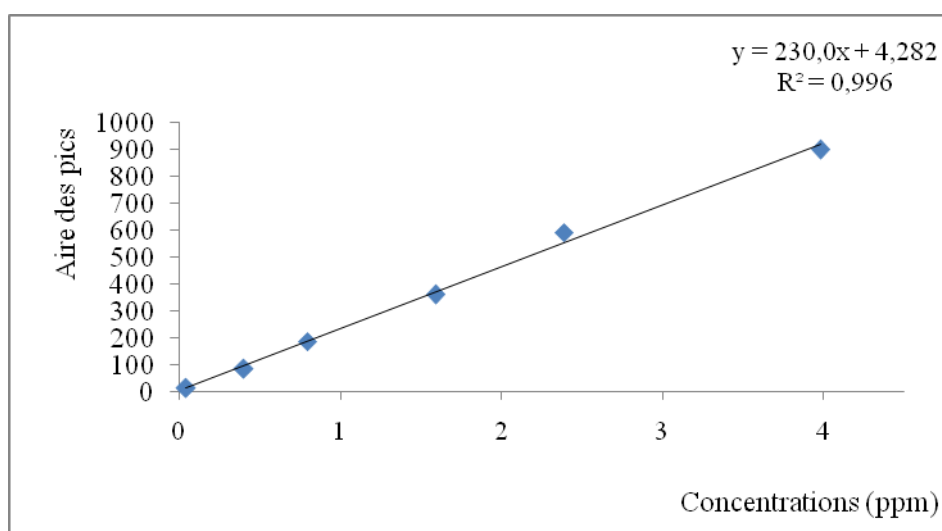
l'acide protocatéchique



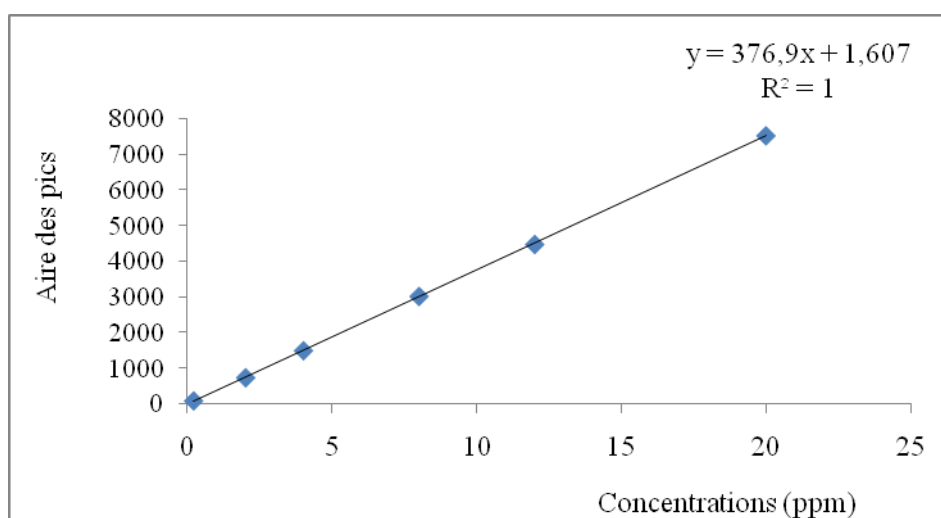
Tyrosol



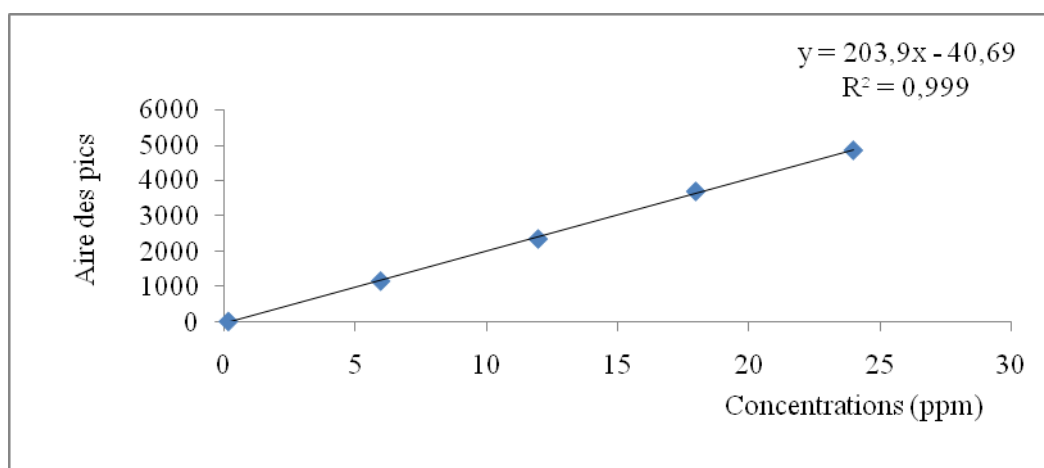
### Catéchines



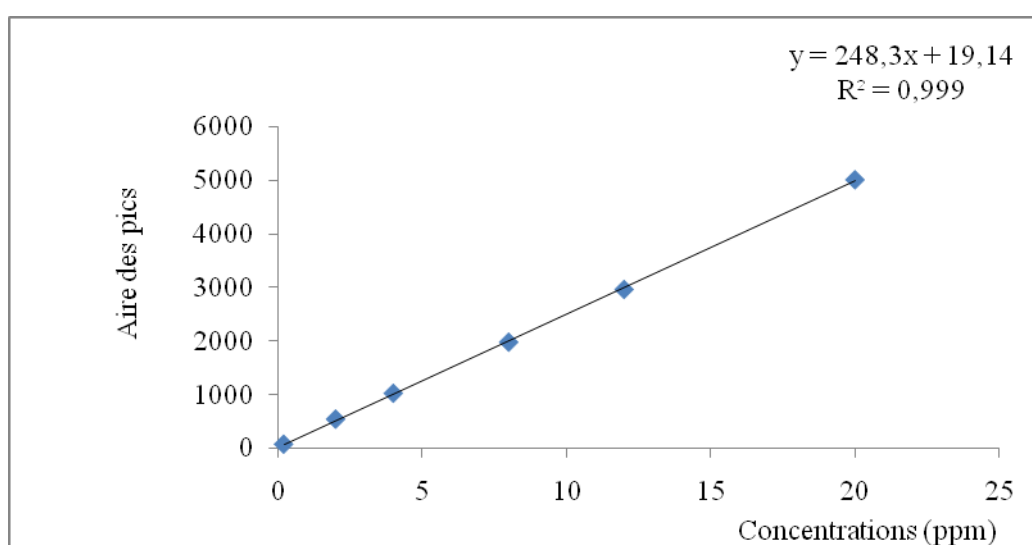
### L'acide gallique



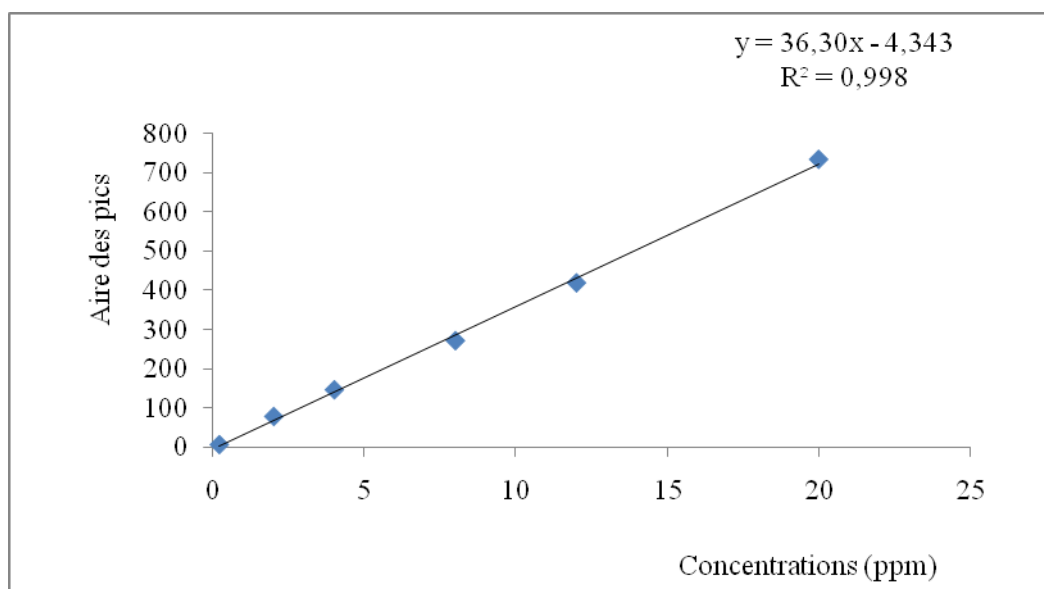
### L'acide caféique



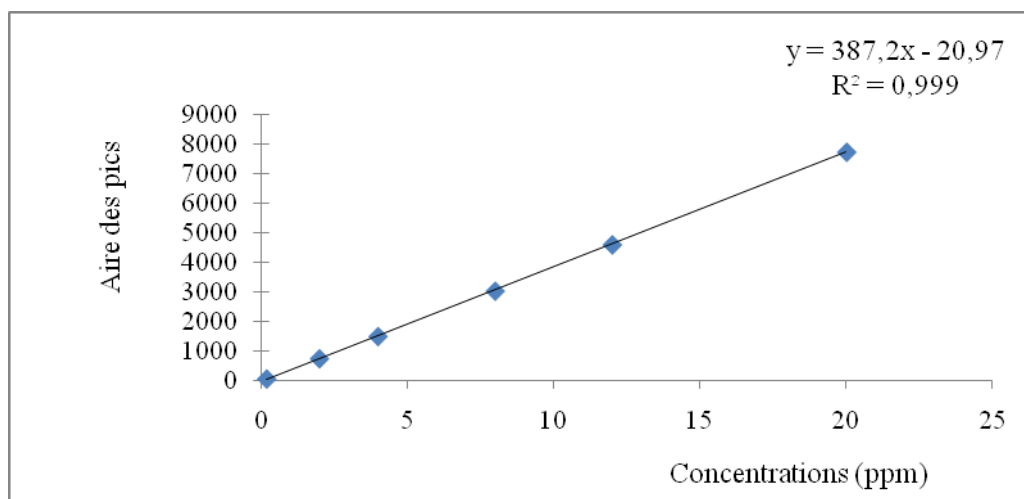
Droite étalon de l'acide caftarique



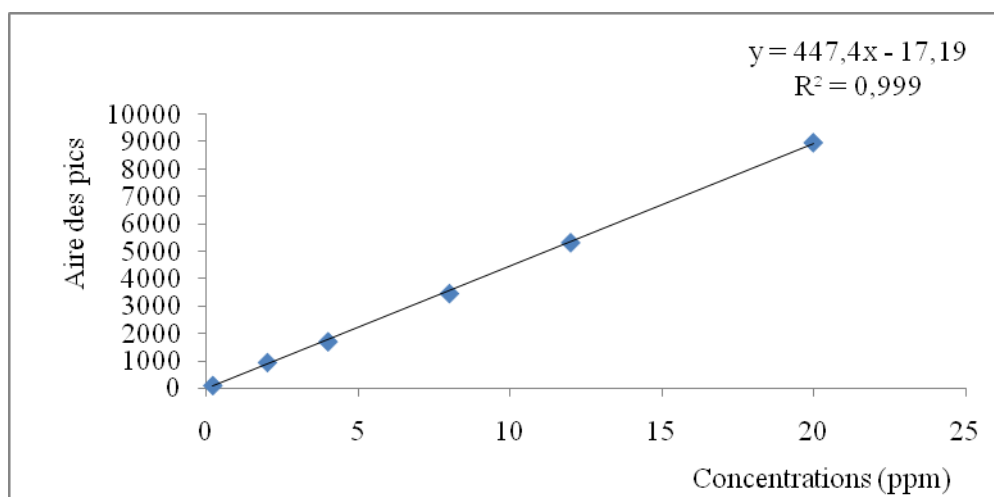
Droite étalon de l'acide syringique



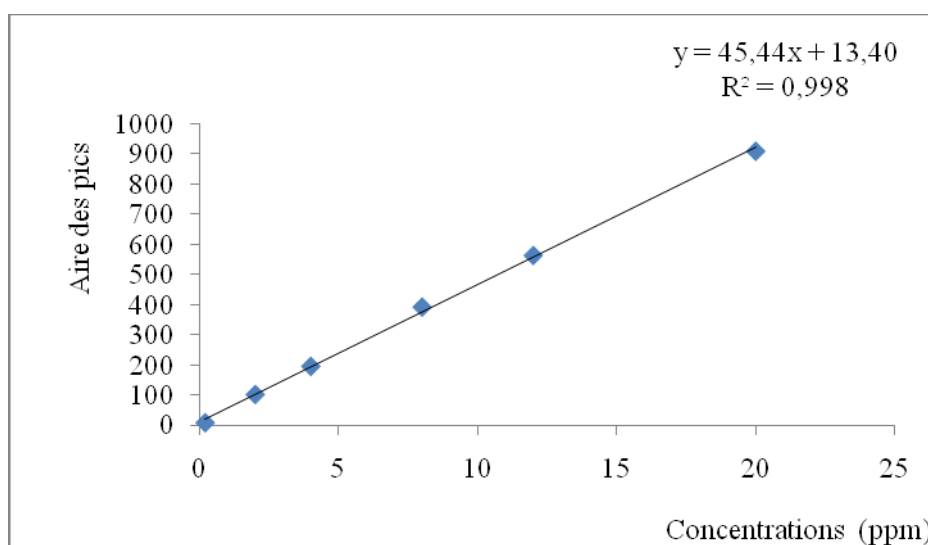
### Droite étalon des procyanidines B2



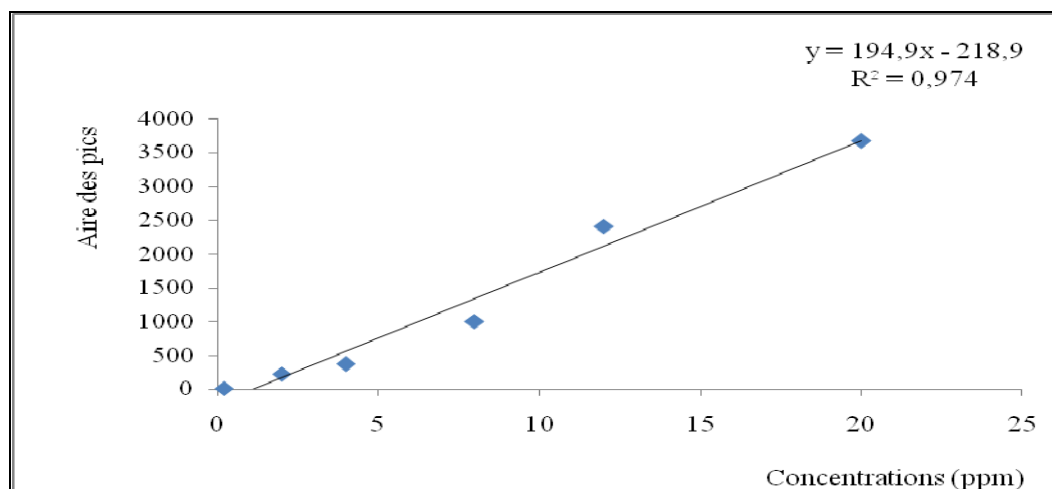
### Droite étalon de l'acide ferrulique



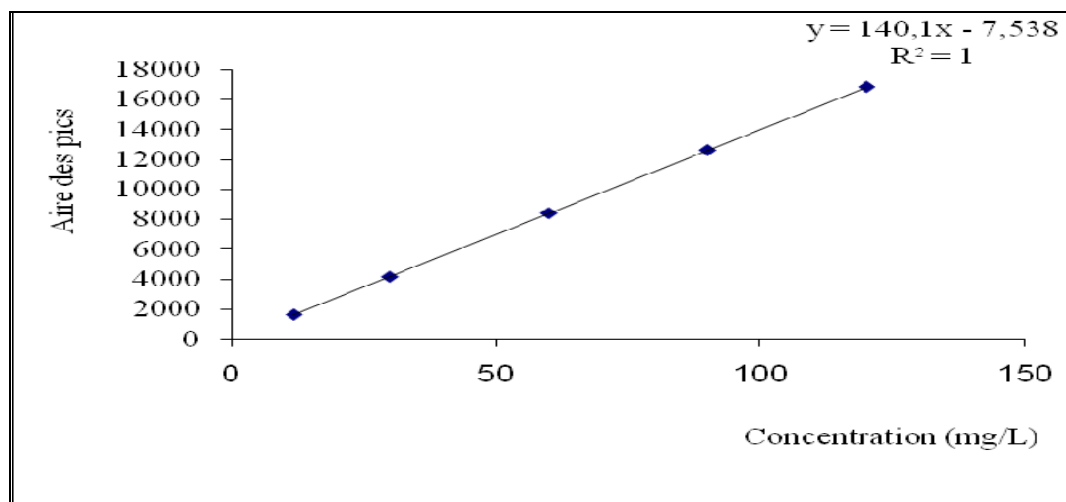
### Droite étalon de l'acide coumarique



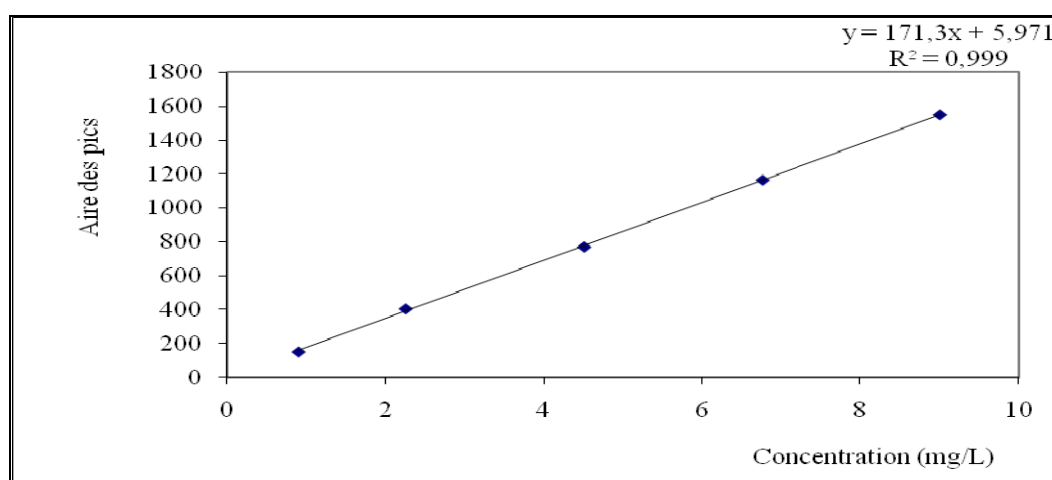
### Droite étalon des épicatechines



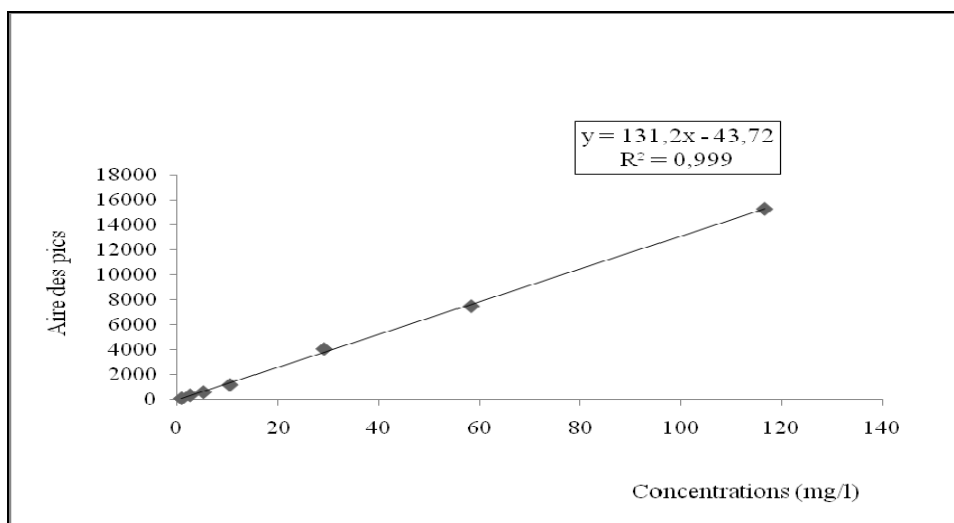
### Droite étalon de la quercétine



### Droite étalon de l'acide Trans-cutarique

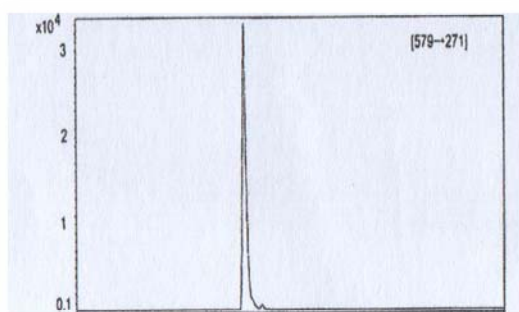


### Droite étalon de l'acide Trans-fertarique

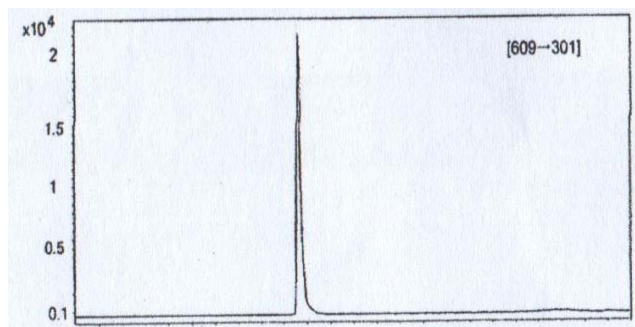


### Droite étalon de l'isoquécétine

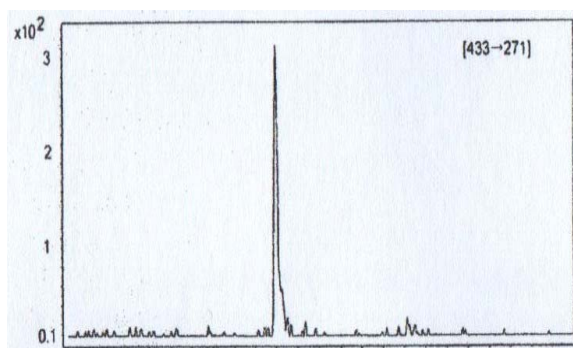
## **Annexe 8** : Chromatogrammes d'HPLC des principaux composés flavonoïdes de jus d'orange



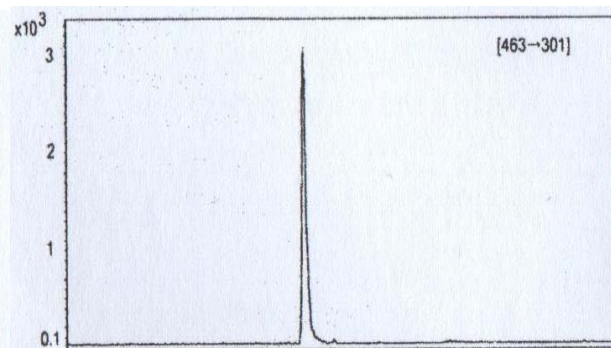
Pic. 1 Naringenin 7-O-rutinoside



Pic. 2 hesperetin-7-O-rutinoside

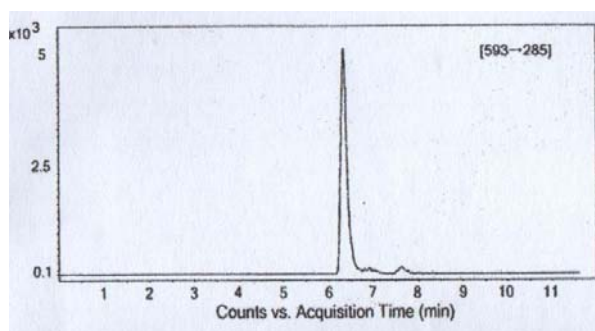


Pic. 3 naringenin-7-O-glucoside

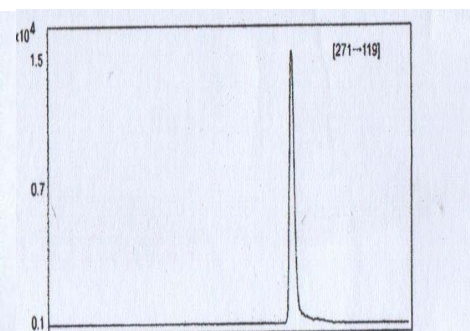


Pic. 4 hesperetin-7-O-glucoside

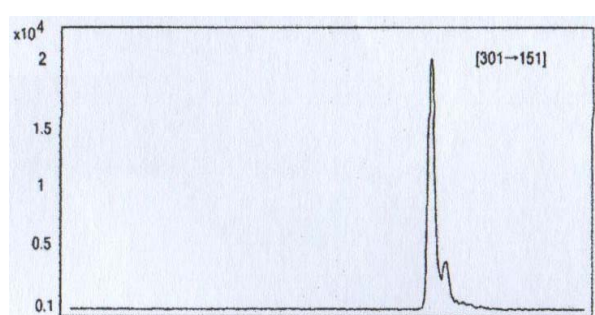
**Suite annexe 8 :** Chromatogrammes d'HPLC des principaux composés flavonoïdes de jus d'orange



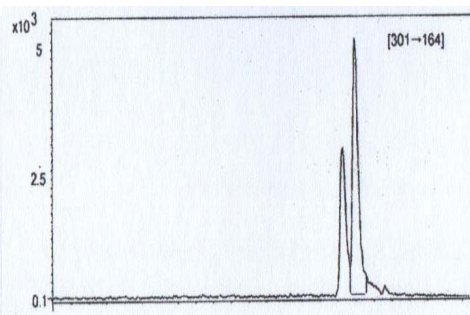
Pic. 5 isosakuranetin-7-O-rutinoside



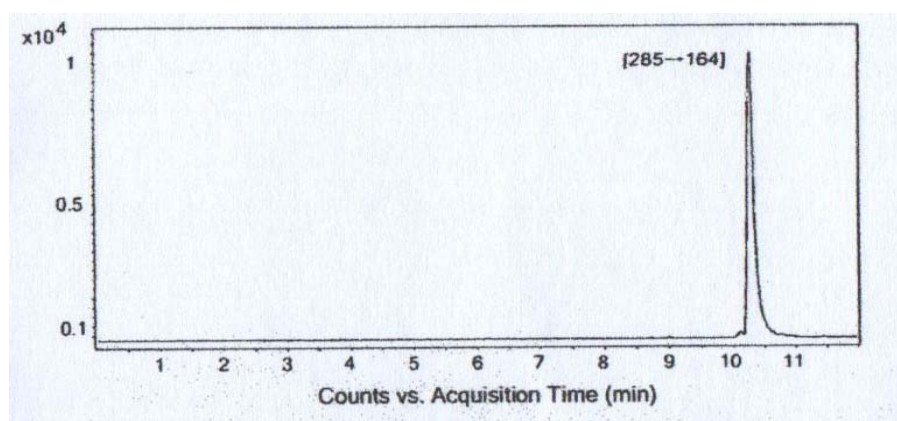
Pic. 6 naringenin



Pic. 7 homoeriodictyol



Pic. 8 hesperetin



Pic. 9 isosakuranetin