

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Sciences Alimentaires  
Filière : Sciences Alimentaires  
Spécialité : Technologie agroalimentaire



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Optimisation de l'extraction assistée par ultrasons des  
composées phénoliques du raisin et étude de l'activité  
antioxydante**

Présenté par :

*MESSAOUDI Wassila et RAHOU Chaima*

Soutenu le : 01/07/2024

Devant le jury composé de :

|                          |            |              |
|--------------------------|------------|--------------|
| Mme. OUKIL Dahbia        | MCA        | Présidente   |
| Mr. MOKRANI Abderrahmane | MCA        | Encadrant    |
| Mme. ISSAADI Ouarda      | MCB        | Examinatrice |
| Mme BOUHROUR Razika      | Doctorante | Invitée      |

Année universitaire : 2023/2024

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de fin d'études au niveau de  
département des sciences alimentaires spécialité technologie agro-alimentaire  
de*

*L'université Abderrahmane Mira de Béjaia*

*Nous remercions en premier Dieu le tout puissant et miséricordieux pour nous  
avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre*

*Encadrant, Mr MOKRANI Abderrahmane.*

*Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ses directives et  
conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste  
travail.*

*On tient à exprimer toute notre reconnaissance à notre Co-encadrante M<sup>elle</sup>  
BOUHEROUR Razika de nous avoir Co-encadré tout au long de ce travail. On  
la remercie pour ses conseils, sa compréhension et surtout pour ses qualités  
humaines et scientifiques.*

*Nous adressons nos profonds remerciements à M<sup>me</sup> OUKIL Dahbia d'avoir  
accepté de Présider le jury ;*

*Nous remercions également M<sup>me</sup> ISSAADI Ouarda pour*

*L'honneur qu'elle nous a fait d'avoir examiné notre travail ;*

*Un remerciement à M<sup>r</sup> Ait Mezegue Fari de nous avoir donné la chance de  
réaliser notre stage pratique au sein du PTAPC Béjaia*

*Nous remercions s'adressent aussi à toutes personnes ayant contribué de près ou de  
loin à la réalisation de ce travail.*

## **DÉDICACE**

*Du profond du cœur je dédie ce travail à tous qui me sont chers*

***A mes chers parents***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Puisse Dieu vous préservez et vous procurer santé et bonheur*

***A mon cher frère et ma belle-sœur,***

*Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études*

***A ma chère sœur et son mari,***

*Pour leurs présences et leurs encouragements*

***A mes petits anges***

*Ahmed, Aimad et Elina*

***A mes très chères amies Sabine, Massilya et Anais,***

*Merci pour votre amitié sincère et votre amour inconditionnel.*

***A ma chère binôme, Chaima***

*Pour son entente et sa sympathie*

***A tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réussite de ce modeste travail.***

***A toute ma famille paternelle et maternelle***

***A tous ceux qui sont proches de mon cœur et qui m'encouragent et me soutiennent pour donner le meilleur de moi-même***

***Wassila***

## ***DÉDICACE***

*Je dédie ce travail*

***À mes chers parents.***

*Aucun hommage ne saurait être à la hauteur de l'amour et de l'affection dont ils ne cessent de me combler. Puissent-ils trouver dans ce travail un témoignage de mon profond amour et de ma reconnaissance éternelle. Que Dieu leur accorde une longue vie et une bonne santé*

***À mes frères et sœurs :***

***MOHAMMED, KARIMA, NADIA, HANANE.*** *Vous êtes ma source d'inspiration quotidienne. Votre soutien inébranlable, vos conseils avisés et votre présence joyeuse ont illuminé chaque étape de ce parcours. Ce mémoire est aussi le vôtre, car vous avez partagé avec moi chaque moment de cette aventure*

***À mes amis fidèles :***

*Vous avez été mes compagnons de route les plus précieux spécialement **LAAMOURI NADA..** Pour vos rires partagés, vos épaules sur lesquelles reposer et votre soutien indéfectible. Merci d'avoir été là à chaque étape, de m'avoir encouragé et soutenu avec tant de générosité. Ce mémoire célèbre notre amitié.*

***A ma chère binôme, Wassila***

*Pour votre soutien discret, vos encouragements sincères et votre présence bienveillante.*

*Ce mémoire vous est dédié avec gratitude et humilité.*

*Avec tout mon amour et ma reconnaissance*

***Chaima.***

## Tableau de matière

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Remerciements</b> .....                          |           |
| <b>Dédicace</b> .....                               |           |
| <b>Sommaire</b> .....                               |           |
| <b>Introduction</b> .....                           | <b>1</b>  |
| <b>Synthèse bibliographique</b>                     |           |
| <b>I. Le raisin</b> .....                           | <b>3</b>  |
| 1. Origine et historique.....                       | 3         |
| 2. Classification botanique.....                    | 4         |
| 3. La structure et les valeurs nutritionnelles..... | 5         |
| 4. Les variétés du raisin.....                      | 6         |
| 5. Production du raisin.....                        | 7         |
| 5.1. Production mondiale.....                       | 7         |
| 5.2. Production algérienne.....                     | 7         |
| 6. Industries de transformation du raisin.....      | 7         |
| 6.1. Le raisin sec.....                             | 8         |
| 6.2. Le jus.....                                    | 8         |
| 6.3. Le vin :.....                                  | 8         |
| 7. Les propriétés biologiques.....                  | 8         |
| 7.1. Les propriétés antioxydantes.....              | 8         |
| 7.2. Les propriétés antibactériennes.....           | 9         |
| 7.3. Les propriétés anticancéreuses.....            | 9         |
| 7.4. Les bienfaits cardiovasculaires.....           | 10        |
| 7.5. Les propriétés neuroprotectrices.....          | 10        |
| <b>II. Les polyphénols du raisin</b> .....          | <b>11</b> |
| 1. Définition.....                                  | 11        |
| 2. Les polyphénols présents dans le raisin.....     | 11        |
| 2.1. Les acides phénoliques.....                    | 11        |
| 2.1.1. Les acides hydroxycinnamiques.....           | 11        |
| 2.1.2. Les acides hydroxybenzoïques.....            | 12        |
| 2.2. Les flavonoïdes .....                          | 12        |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 2.2.1.   | Les anthocyanines.....  | 13        |
| 2.2.2.   | Les flavonols.....  | 13        |
| 2.3.   | Les stilbènes.....  | 13        |
| 2.3.1.   | Le resveratrol.....   | 14        |
| <b>III. Extraction assistée par ultrasons.....</b> |   | <b>15</b> |
| 3.   | Les méthodes d'extraction.....  | 15        |
| 4.   | Définition de l'extraction assistée par ultrason.....                 | 15        |
| 5.   | Principe.....   | 15        |
| 6.   | Facteur influençant la performance de l'EAU.....                      | 16        |
| 6.1.   | Choix et volume du solvant.....                                       | 16        |
| 6.2.   | La fréquence des ondes ultrasonores.....                              | 17        |
| 6.3.   | Puissance des ultrasons.....  | 17        |
| 6.4.   | Temps de l'extraction.....  | 17        |
| 6.5.   | Température de l'extraction.....                                      | 17        |
| 7.   | Équipement de laboratoire.....  | 18        |
| 7.1.   | Le bain à ultrasons.....  | 18        |
| 7.2.   | La sonde ultrasonique.....  | 18        |
| 8.   | Application des ultrasons.....  | 18        |
| 9.   | Les avantages et inconvénients.....                                   | 19        |
| 10.  | Otimisation de l'extraction par le plan d'expérience.....             | 19        |
| 10.1.  | Les plans d'expérience.....   | 19        |
| 10.2.  | La méthodologie de surface de réponse.....                            | 20        |
| 10.2.1.  | Le plan Box-Behnken (BBD).....  | 20        |
| <b>Matériel et méthodes</b>                        |   |           |
| 1.   | Matériel végétale.....  | 21        |
| 1.1.   | Échantillonnage.....  | 21        |
| 1.2.   | Extraction assistée par ultrasons (EAU) des composés phénoliques..... | 21        |
| 2.   | Dosage des composés phénoliques.....                                  | 22        |
| 2.1.   | Dosage des polyphénols totaux (PT).....                               | 22        |
| 2.1.1.   | Principe de la méthode.....   | 22        |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.1.2. | Protocole.....                                   | 22 |
| 2.2.   | Dosage des flavonoïdes totaux (FT).....          | 23 |
| 2.2.1. | Principe de la méthode.....                      | 23 |
| 2.2.2. | Protocole.....                                   | 23 |
| 2.3.   | Dosage des proanthocyanidines.....               | 23 |
| 2.3.1. | Principe de la méthode.....                      | 23 |
| 2.3.2. | Protocole.....                                   | 23 |
| 3.     | Activité antioxydant par DPPH.....               | 24 |
| 3.1.   | Neutralisation du radical DPPH.....              | 24 |
| 3.1.1. | Principe de la méthode.....                      | 24 |
| 3.1.2. | Protocole.....                                   | 24 |
| 3.2.   | Neutralisation du radical ABTS .....             | 24 |
| 3.2.1. | Principe.....                                    | 24 |
| 3.2.2. | Protocole .....                                  | 25 |
| 3.3.   | Pouvoir de réduction (PR) .....                  | 25 |
| 3.3.1. | Principe .....                                   | 25 |
| 3.3.2. | Protocole .....                                  | 25 |
| 4.     | Étude préliminaire par méthode séquentielle..... | 25 |
| 4.1.   | Choix de solvant d'extraction.....               | 26 |
| 4.2.   | Gradient du solvant (acétone).....               | 26 |
| 4.3.   | Température d'extraction .....                   | 26 |
| 4.4.   | Temps d'extraction .....                         | 26 |
| 4.5.   | Ratio échantillon/solvants .....                 | 26 |
| 5.     | Optimisation par plan d'expérience .....         | 27 |
| 6.     | Analyse statistique .....                        | 29 |

## **Résultats et discussions**

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Extraction assisté par ultrason.....                           | 30 |
| 2.   | Etude préliminaire.....  | 30 |
| 2.1. | Effet du type de solvant.....                                  | 30 |
| 2.2. | Effet du gradient en acétone.....                              | 33 |
| 2.3. | Effet de la température sur l'extraction des CP et les AA..... | 33 |

|        |  |           |
|--------|--|-----------|
| 2.4.   | Effet du temps d'extraction.....   | 36        |
| 2.5.   | Effet du ratio (solide/liquide).....   | 40        |
| 3.     | Les conditions optimales.....  | 42        |
| 4.     | La méthodologie de surface de réponse.....                                       | 42        |
| 4.1.   | Étude de l'optimisation de la procédure d'extraction assistée par ultrasons..... | 43        |
| 4.2.   | Application du plan d'expérience.....  | 43        |
| 4.2.1. | Vérification du modèle.....  | 43        |
| 4.2.2. | Analyse de la variance.....  | 46        |
| 4.2.3. | Effet des facteurs.....  | 48        |
| 4.2.4. | Analyse du modèle mathématique.....  | 51        |
| 4.2.5. | Représentation spatiale et analyse des surfaces de réponses.....                 | 51        |
| 4.2.6. | Etude de la désirabilité et détermination des conditions optimales.....          | 53        |
| 4.2.7. | La validation du modèle.....   | 54        |
|        | <b>Conclusion.....</b>   | <b>55</b> |
|        | <b>Référence bibliographique -----</b>   | <b>57</b> |
|        | <b>Annexe</b>  |           |
|        | <b>Résumé</b>  |           |

## *Listre de l'abréviation*

ABTS sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique.

AHC : acides hydroxycinnamiques

BBD : Box-Behnken Design

CCD : Central Composite Design

CFT : composés flavonoïdes totaux

CPT : composés phénoliques totaux

DPPH : 1,1-diphényle-2-picryl hydrazyl

EAM : extraction assistée par micro-ondes

EAU : extraction assistée par ultrasons

EFS : extraction par fluide supercritique

FAO : Food and Agriculture Organization

FC : Folin-Ciocalteu

HI : hectolitres

L'ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacité

LDL : Low Density Lipoprotein

MS : matière sèche

MSR : Méthodologie Surface de Réponse

P : Probabilité

PAC : proanthocyanidines

PPR : poudre pellicules de raisin

PR : pouvoir réducteur

PT : polyphénols totaux

R : Résidus

R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination

resvératrol : 3,5,4-trans-trihydroxystilbène

UV : Ultraviolet

## *Liste des tableaux*

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I:</b> Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant l'extraction par ultrasons.....   | 27 |
| <b>Tableau II:</b> Les combinaisons effectuées par l'optimisation des conditions d'extraction.....  | 28 |
| <b>Tableau III:</b> Conditions optimales de l'extraction des PT ainsi que l'AA obtenues à partir de l'étude préliminaire. ....  | 40 |
| <b>Tableau IV:</b> Valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des PT et de piégeage du radical DPPH par le plan BBD pour la poudre des pellicules de raisin. .... | 43 |
| <b>Tableau V:</b> Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour les PT .....   | 45 |
| <b>Tableau VI:</b> Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour l'AA.....   | 45 |
| <b>Tableau VII:</b> Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les PPT et AA en utilisant le BBD de la surface de réponse.....  | 47 |
| <b>Tableau VIII:</b> Conditions et valeurs optimales pour l'extraction des PT et de piégeage du radical DPPH de la poudre des pellicules de raisin par la MSR. ....                                     | 53 |

## *Liste de figure*

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 01:</b> Classification botanique de la vigne (Reynier, 2011b)-----  | 04  |
| <b>Figure 02:</b> La structure de la baie de raisin (Kennedy, 2002)-----  | 05  |
| <b>Figure 03:</b> Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira et al., 2008) -----  | 12  |
| <b>Figure 04:</b> Génération, croissance et éclatement de bulles résultantes du phénomène de cavitation (Mason, 2002)-----  | 16  |
| <b>Figure 05:</b> Bain à ultrason (a et b) et sonde à ultrason(c et d) (Shen et al., 2023)-----   | 18  |
| <b>Figure 06:</b> Photo représentative du Bain à ultrason (ELmasonic S60H). -----   | 22  |
| <b>Figure 07:</b> Effet du choix du solvant sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin -----   | 32  |
| <b>Figure 08:</b> Effet du gradient en solvant sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin -----  | 34  |
| <b>Figure 09:</b> Effet de la température sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », FRAP « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin-----  | 36  |
| <b>Figure 10:</b> Effet du temps sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin -----  | 37  |
| <b>Figure 11:</b> Effet du ratio (solide/liquide) sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin -----   | 39  |
| <b>Figure 12:</b> Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites en PT (A), et de piégeage du radical DPPH (B)-----   | .44 |
| <b>Figure 13:</b> Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet du gradient du solvant et du ratio d'extraction (S/L) sur l'extraction de PT (A) et le piégeage du radical DPPH (B) des pellicules de raisin ----- | 51  |
| <b>Figure 14:</b> Profil de prévision des conditions optimales de l'EAU des Pt et de piégeage du radical DPPH des écorces de raisin-----  | 53  |

# INTRODUCTION

### Introduction

Les effets négatifs possibles de l'utilisation d'additifs synthétiques ont conduit de nombreux secteurs à rechercher des alternatives pour obtenir des composés de sources naturelles dotés de propriétés biologiques actives (**Santos et Martins, 2022**). Présents dans l'écorce, les feuilles, les graines et les pétales de plusieurs végétaux, les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des composés phytochimiques d'un grand intérêt car ils ont des effets bioactifs bénéfiques (activité antioxydante, antiradicalaire,...) (**Santos and Martins, 2023**), qui seraient à l'origine de la réduction de risques de développement de plusieurs pathologies comme les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Lutz et al., 2011**).

Au-delà des bienfaits sur la santé humaine, les polyphénols ont une large gamme d'utilisations dans l'industrie alimentaire en tant que colorants, additifs fonctionnels dans les boissons, les produits laitiers, les bonbons, la boulangerie et les céréales (**González-M et al., 2006**).

Le raisin (*Vitis vinifera L.*) est une source riche de composés bioactifs tel que les composés phénoliques qui sont des métabolites secondaires trouvés dans la peau, les graines et la chair et sont extraits dans les vins lors de la vinification (**Ojeil et al., 2010**). Les principaux groupes de polyphénols retrouvés comprennent généralement les anthocyanes, les catéchines, le resvératrol, les acides phénoliques et les procyanidines (**Zhou and Raffoul, 2012**).

Le raisin est un fruit nutritif qui figure toujours parmi les fruits les plus produits au monde (**Zhou, 2022**). Il représente 14,6% de la production mondiale de fruits juste après l'orange (**Chira, 2008**). La production de raisins de table, de raisins secs et de raisins de cuve est l'une des principales activités de l'Union Européenne dans le domaine de la viticulture (**Biniari et al., 2020**).

L'extraction est considérée comme l'étape initiale la plus importante pour la récupération et la purification des composés bioactifs des matières végétales (**Meziant et al., 2014**). De nombreuses méthodes d'extraction avancées incorporant diverses technologies telles que les ultrasons, les micro-ondes, la haute pression, la haute tension et les forces mécaniques ont été utilisées pour extraire les composés bioactifs des matières végétales (**Chuo, 2020**). Parmi ces méthodes, l'extraction assistée par ultrasons (EAU) est l'une des techniques d'extraction qui attire de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de son efficacité par rapport aux méthodes conventionnelles (**Khan et al., 2010**).

L'extraction des composés phénoliques dépend de plusieurs facteurs tels que les procédures d'extraction, la température, la durée, la pression, la polarité du solvant, la taille des particules, etc **Brahmi *et al.* (2021)**.

L'optimisation du processus d'extraction est réalisée par méthodes empiriques ou statistiques. La méthodologie de surface de réponse (MSR) est un ensemble de techniques statistiques et mathématiques nécessaires au développement, à l'amélioration et à l'optimisation des processus. Le principal avantage de la MSR est de réduire le nombre d'essais expérimentaux nécessaires pour évaluer plusieurs variables et leurs interactions (**Bachir Bey *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016**).

La présente étude a pour objectif principal l'optimisation des conditions d'extraction par ultrason (EAU) des composés phénoliques et de l'activité antioxydante à partir de la poudre de pellicule (peau) de raisin (variété Red Globe) par l'application de la méthodologie de surface de réponse en utilisant le plan d'expérience Box-Behnken (BBD). Les principaux paramètres étudiés sont la concentration en solvant, le temps et la température d'extraction et le ratio (rapport échantillon/solvant).

**SYNTHÈSE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

### I. Le raisin

#### 1. Origine et historique

Le raisin (*Vitis Vinifera*), l'une des premières plantes vivaces domestiques, est apparu au Proche-Orient et demeure une culture importante sur le plan économique et culturel (**Migicovsky, 2017**).

L'histoire de la vigne a commencé lors de la transformation graduelle de la vigne sauvage en vigne cultivée et s'est probablement réalisée à partir du septième millénaire avant l'ère chrétienne. À partir de la Géorgie, la culture de la vigne s'est répandue dans tous les pays tempérés depuis l'Inde jusqu'à l'Occident Européen. Les premières peintures murales représentant des procédés de vinification ont été retrouvées en Égypte dans des lieux de sépulture datant de 3000 ans avant J.C. La Grèce, grâce à ses contacts avec l'Égypte, adopta la culture de la vigne, la vinification et le commerce du vin (vers 2000 ans avant J.C). Les Grecs, au cours de leurs nombreux voyages, ont implanté la vigne dans tout le bassin méditerranéen et ont glorifié les bienfaits du vin (**Reynier, 1986**).

La viticulture en Algérie remonte à l'Antiquité et particulièrement à la colonisation romaine puisqu'elle a trouvé les conditions agro-climatiques idéales pour son développement (**Levadoux et al., 1971**). Durant la période de la colonisation française, la viticulture algérienne a connu un très fort développement de vignes de cuve, grâce aux conditions extrêmement favorables du milieu. Mais la viticulture de table n'y était l'objet d'aucune attention particulière. Néanmoins, il faut signaler que dès l'époque romaine, l'Algérie cultivait des cépages tardifs, en majorité de table. Les facteurs climatiques et pédologiques favorables expliquent la richesse de l'encépagement de la viticulture algérienne (**FODIL, 1989**). Les peuples autochtones (les Berbères ou les Numides) d'Algérie cultivaient la vigne depuis très longtemps en Afrique du Nord, au premier siècle avant J.C. (**Rahali et al., 2019**). D'énormes quantités de vignes furent exportées par les Phéniciens à travers la Méditerranée, puis les Romains développèrent la viticulture jusqu'à l'arrivée des chrétiens et utilisèrent l'Algérie comme un simple entrepôt de céréales pour leur royaume. Ensuite, les raisins de table ont été importés par les Arabes musulmans, également connus sous le nom de raisins de table, toujours du Moyen-Orient vers l'Afrique du Nord, et au début du XIXe siècle, l'occupation française a élargi la richesse et l'hétérogénéité de la viticulture. Plusieurs cultivars ont été dirigés vers l'Espagne et la France après la crise du phylloxéra en Europe. En 1960, l'Algérie était devenue le quatrième pays producteur mondial de vin, mais après avoir

obtenu son indépendance en 1962, la production de vin a chuté et a perdu une grande partie de sa part du marché (Khouni *et al.*, 2023).

## 2. Classification botanique

Le raisin est le fruit de la vigne (*Vitis vinifera*. L) appartient à la pentandrie monogynie de Linné et une famille naturelle qui constitue un ordre de la classe des Dicotylédones polypétales à étamines hypogynes à fruit supère Jussieu (Herpin, 1889). La vigne est classée dans l'ordre botanique des Rhamnales, elle appartient à la famille des vitacées anciennement connue sous le nom des ampélidacées (Zhou and Raffoul, 2012). Cette famille comprend environ 15 genres et 800 espèces présentes dans les régions tempérées (Di Pietro Fernandes, 2023), parmi lesquels le genre *Vitis* qui se divise lui-même en deux sous-genres, *Muscadinia* et *Eu vitis*. La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie de ce dernier. Environ 30 espèces sont dénombrées dans le genre *Eu vitis* et *Vitis vinifera* est l'espèce la plus cultivée (Zhou and Raffoul, 2012). Toutes les vignes sont des plantes pérennes, ligneuses et grimpantes (Bouby, 2001). La classification botanique du raisin est représentée sur la figure ci-dessous (Figure 01).

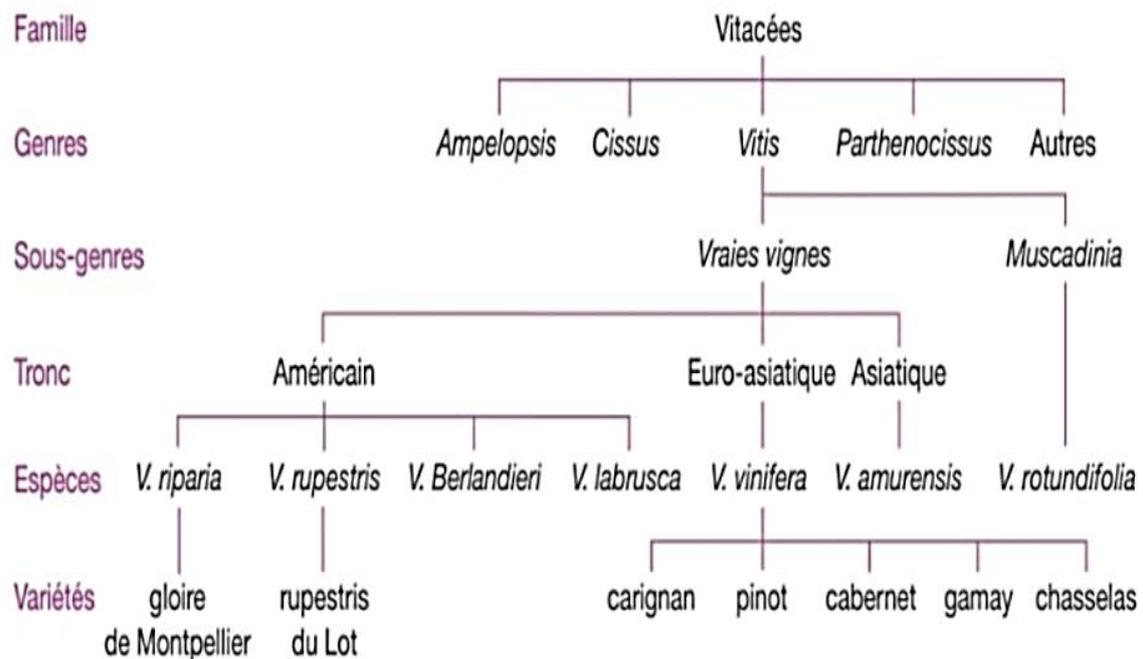
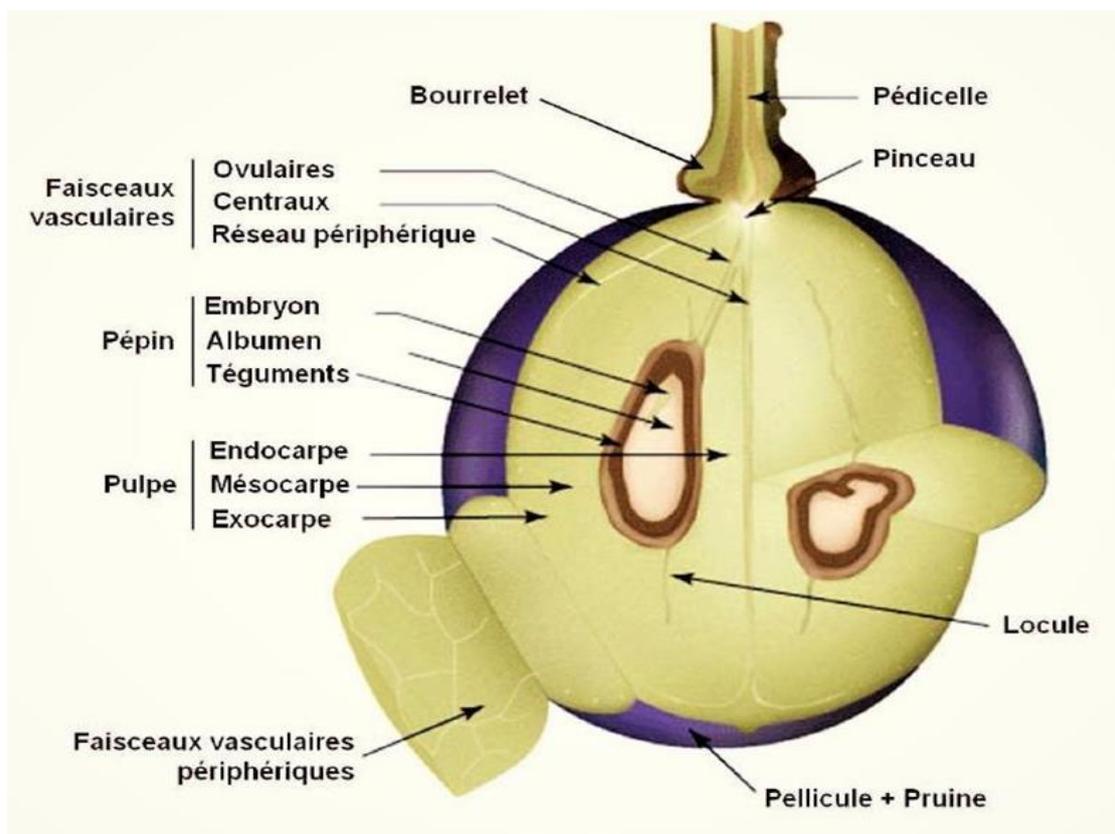


Figure 01: Classification botanique de la vigne (Reynier, 2011b).

### 3. La structure et les valeurs nutritionnelles

Les raisins sont des baies pédicellées ou disposées en grappes sur un pédoncule commun. Ces fruits sont ronds ou ovales plus ou moins gros, de couleur variable blanc-verdâtre, dorés, rosés, rouges, noirs, bleuâtres ; ils sont plus ou moins savoureux, plus ou moins chargés de sucre, d'acides, d'alcalis, de tannin, de fer, etc. selon les pays, le terrain et surtout les cépages ou variétés de la vigne qui sont très nombreuses (**Herpin, 1889**). La baie est un fruit charnu de forme arrondie plus ou moins allongée en fonction des variétés. Elle est composée de trois tissus majeurs, la pulpe, la pellicule et les pépins (**Kennedy, 2002**)



**Figure 02:** La structure de la baie de raisin (**Kennedy, 2002**)

Le raisin appartient à la famille des baies puisqu'il est attaché à la tige. Plusieurs baies constituent une grappe de raisin. Son fruit est considéré comme l'un des aliments les plus agréables à consommer et possède de nombreuses propriétés médicinales et nutritionnelles connues par les consommateurs. Le raisin est une bonne source d'eau (~ 82%), de glucides (12-18%), de protéines (0,5- 0,6%), et de graisses (0,3-0,4%). En outre, le raisin contient des quantités importantes de potassium (0,1-0,2%), de vitamine C (0,01-0,02%) et de vitamine A

(0,001-0,0015%), ainsi qu'une petite quantité de calcium (0,01-0,02%) et de phosphore (0,08-0,01%). Le raisin est également une source importante d'autres nutriments tels que le bore (**Yadav et al., 2009**). Il contient aussi 40% de fibres, 16% d'huile, 11% de protéines et 7% de phénols complexes, de tanins et d'autres minéraux et vitamines (**Majeed, 2023**).

#### 4. Les variétés du raisin

Les vignes appartiennent à la seule espèce *Vitis vinifera*, cette espèce comprend plus de 5000 cépages, différents par leur aspect et la qualité de leurs fruits. En viticulture, le terme de cépage désigne une variété cultivée. Il existe plusieurs milliers de cépages identifiés mais seulement 320 sont actuellement inscrits au catalogue des variétés cultivées (**Reynier, 2011b**).

Les raisins sont divisés en deux groupes selon la couleur de leur peau. Le premier groupe est les raisins à peau de teinte claire, vert pale, jaune plus ou moins dure (cépages blancs). Le deuxième groupe est les raisins à peau plus foncée allant du rosé, rouge et noir violet (cépages rouges) (**Chira, 2008**).

Selon **Reynier (2011a)**, chaque cépage a une vocation particulière. D'après les caractéristiques morphologiques des grappes et des baies, comme la compacité, la grosseur et la forme des baies, l'épaisseur de la pellicule, la consistance de la pulpe, le nombre de pépins, et en fonction de la destination des raisins, on distingue plusieurs catégories de cépages à savoir:

- Cépages de cuve : comme Grenache, Merlot, Syrah, Carignan, Cabernet sauvignon, Melon, Gamay, Chardonnay, etc.

- Cépages destiné au séchage : Sultanine B, Corinthe N, Perlette, Muscat d'Alexandrie et Rosaki.

- Cépages de table : Chasselas, Danlas, Italia, Muscat Hambourg, Dattier de Beyrouth, Cardinal, etc.

Le Red Globe est aussi une variété de raisin de table rouge à grosses graines. Parmi ses caractéristiques distinctives on peut citer sa chair croquante, sa saveur délicate, sa couleur rose-rouge attrayante de ses baies et son goût légèrement sucré. Ses baies servent également de glaçons dans les jus et les boissons fraîches en raison de leur grande taille et de leur pulpe charnue. Dans la plupart des pays producteurs de raisin, le Red Globe est strictement un

cultivar de serre. Les vignes peuvent toutefois être cultivées en plein champ dans des conditions chaudes avec une longue période de végétation (Alenazi et al., 2019).

### 5. Production du raisin

#### 5.1. Production mondiale

Le raisin est le deuxième fruit le plus cultivé au monde. En effet, selon un rapport de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) concernant le marché mondial du fruit, le raisin représente 14,6% de la production mondiale de fruits juste après l'orange (Chira et al., 2008). Selon l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, la culture de la vigne (*Vitis vinifera*) couvre environ 7,4 millions ha sur l'ensemble des cinq continents avec une production de 78 millions tonnes de raisins dont 27,3 millions de tonnes de raisins de table, 1,3 millions de tonnes de raisins secs et de 292 millions d'hl de vin (MEGATELI, 2023). Pour la saison 2020/2021, la Chine occupait la première place avec 36,2% de la production mondiale totale, suivie de l'Inde (11,5%), la Turquie (6,2%), l'Égypte (4,9%), l'Iran (4,5%), l'Ouzbékistan (4,1%), l'Italie (3,3%), le Brésil (2,8%), les États-Unis (2,7%), le Pérou et le Japon (2,5%), le Chili (2,1%) et l'Afrique du Sud (1,2%) (Kgang Itumeleng E, 2023).

#### 5.2. Production algérienne

En Algérie, la vigne est la troisième culture fruitière la plus abondante après l'olive et la datte (Khouni et al., 2023). Durant la dernière décennie, la viticulture algérienne a connu un important développement. En effet, la superficie du vignoble algérien est passée de 50000 ha en 2000 à plus de 69642 ha en 2018; dont 67% occupée par la vigne de table et 33% par la vigne de transformation, la production totale des raisins est de 5665787 quintaux (88% pour les raisins de table et 12% pour les raisins de transformation). Le total des variétés homologuées s'élève à 96 dont 55 variétés de tables, 33 de transformation, 5 de séchage et 10 variétés de portes greffes (MEGATELI, 2023).

### 6. Industries de transformation du raisin

Les sous-produits de la transformation du raisin, appelés "marc de raisin", comprennent les peaux, les pépins, la pulpe et les tiges. Le marc représente environ 20% de la masse des raisins transformés (Chedea and Pop, 2019). Le raisin (*Vitis vinifera L.*) est utilisé à la fois comme denrée alimentaire fraîche et aussi pour la transformation industrielle telle que le jus, les raisins secs et le vin (Guo, 2014).

### 6.1. Le raisin sec

Le raisin sec est parmi les fruits secs les plus consommés mondialement. Il est obtenu par le séchage de certaines variétés de raisin, représentées essentiellement par la Sultanine, la Golden, la Muscata et le Corinthe noir. La variété Sultanine étant la plus utilisée (**Ferradji *et al.*, 2008**)

### 6.2. Le jus

Le jus de raisin est un jus soit pur ou bien reconstitué à base de concentré (jus ABC). Ce dernier est principalement utilisé pour les mélanges de jus de fruits (**Escudier *et al.*, 2016**).

### 6.3. Le vin

La vinification consiste à transformer le moût de raisin en un type précis de vin doté de caractéristiques organoleptiques spécifiques. Les raisins réceptionnés après la récolte et ayant donné le moût sont transformés par pressurage au vin blancs et par foulage au vin rouges. Cette étape est généralement complétée par l'élevage du vin (**Киркилевич, 2020**). Environ 80% des raisins sont utilisés pour la vinification et 13% sont consommés comme raisins de table (**Mitić *et al.*, 2012**).

## 7. Les propriétés biologiques

Les polyphénols des raisins et des vins rouges ont attiré l'attention des scientifiques afin de définir leur composition chimique et leurs propriétés biologiques. Les polyphénols font partie des composés antioxydants les plus abondants dans notre alimentation et peuvent jouer un rôle clé dans la prévention de plusieurs maladies (**Urpi-Sarda *et al.*, 2009**).

Bien qu'un grand nombre de composés ont été isolés à partir du raisin, seuls certains d'entre eux se sont avérés avoir des activités biologiques et médicinales. Plusieurs activités biologiques du resvératrol, un composé majeur extrait de la peau et des pépins de raisin, ont été rapportées (**Yadav *et al.*, 2009**). Les sous-produits du raisin constitués principalement de pelures, contiennent une grande quantité de métabolites secondaires, notamment des acides phénoliques, des flavanols et des anthocyanes, qui possèdent des propriétés antibactériennes, antivirales, antioxydants, anti-inflammatoires, anticancérigènes, et pourraient prévenir les maladies cardiovasculaires (**Corrales *et al.*, 2008**).

### 7.1. Les propriétés antioxydantes

Les caractéristiques antioxydantes des composés phénoliques du raisin, qui constituent l'activité la plus notable, ont été largement étudiées y compris le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de l'oxydation des lipides, la réduction de la formation d'hydroperoxydes, etc.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer les capacités antioxydants des composés phénoliques extraits de divers raisins ou de différentes parties de raisin telles que la méthode DPPH, ABTS, PR, l'ORAC...etc. (Xia *et al.*, 2010). Grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres oxygènes en particulier les radicaux peroxydes (ROO<sup>•</sup>), alkoxyles (RO<sup>•</sup>), superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) et les hydroxyles (OH<sup>•</sup>) générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections...) (Min and Ebeler, 2008; Ojeil *et al.*, 2010).

Une phytoalexine naturelle que l'on trouve en abondance dans le raisin et le vin rouge qui est le resvératrol (3,5,4-trans-trihydroxystilbène) possède de puissantes propriétés antioxydants et protectrices (Yadav *et al.*, 2009).

### 7.2. Les propriétés antibactériennes

Les raisins secs sont largement connus par leur richesse en composés phénoliques. Il a été démontré que ces composés, en particulier le resvératrol, ont un large éventail d'effets biologiques notamment antimicrobiens et antioxydants (Hollecker *et al.*, 2009). Guessaibia *et al.* (2019) ont pu confirmer à travers leur investigation que la variété algérienne de raisins secs Black Corinth, possédait de puissantes propriétés antibactériennes indiquant ainsi leur potentiel en tant que produits pharmaceutique naturel pour prévenir et traiter les maladies humaines infectieuses.

Il a été démontré aussi que les composés phénoliques des extraits de marc de raisin présentent aussi des propriétés antioxydante et antibactérienne contre *E. coli*, *L. monocytogenes*, et *S. aureus*. Les activités antimicrobiennes sont attribuées à leur capacité à se lier aux protéines extracellulaires et solubles ce qui leur permet de se complexer avec les parois cellulaires bactériennes (Xu *et al.*, 2016).

### 7.3. Les propriétés anticancéreuses

Le resvératrol du raisin est présent en concentration significative dans le vin rouge, inhibe *in vitro* la croissance cellulaire des leucémies, du cancer de la prostate, du sein et d'autres cancers épithéliaux. Le resvératrol bloque la tumorigenèse au niveau de la peau endommagée par les rayons UV et chez les rats. Il bloque la néoplasie des glandes mammaires (Opipari Jr, 2004).

### 7.4. Les bienfaits cardiovasculaires

Les raisins sont associés à une incidence plus faible de maladies cardiaques et d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques (**Jiménez, 2008**). Des études ont confirmé les bienfaits du raisin et les produits à base de raisin sur la réduction des maladies cardiovasculaires, sur l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la diminution de l'oxydation des LDL, la réduction du stress oxydatif, l'amélioration aiguë et chronique de la fonction endothéliale, la diminution de l'inflammation et la réduction de la tension artérielle en particulier chez les personnes ayant une tension artérielle habituelle plus élevée (**Rasines-Perea, 2017**).

### 7.5. Les propriétés neuroprotectrices

Les fruits riches en polyphénols tels que les raisins sont reconnus pour leur potentiel neuroprotecteur qui est directement lié à leurs propriétés antioxydants (**Renaud, 2011**). Des études ont démontré la capacité du resvératrol du raisin à protéger contre les dommages neuronaux causés par l'administration d'acide kaïnique. Il réduit également la mort des cellules neuronales induites par l'éthanol (**Sun et al., 2002**).

Le raisin peut être bénéfique pour ralentir les déficits neuronaux associés au vieillissement. Les extraits de pépins de raisin ont aussi un effet neuroprotecteur. Une consommation accrue de raisin et de vin riche en resvératrol est très efficace pour la neuroprotection (**Lee et al., 2017**).

## II. Les polyphénols du raisin

### 1. Définition

Les composés phénoliques constituent un groupe de molécules biologiquement actives et l'une des classes les plus importantes de métabolites secondaires des plantes. Ils sont essentiels à la croissance des plantes et peuvent présenter un large éventail de propriétés biologiques (**Ghitescu et al., 2015**). Ils sont largement présents dans les fruits, les légumes, les céréales, l'huile d'olive extra vierge, les légumineuses sèches, le chocolat et les boissons telles que le thé, le café et le vin (**D'Archivio 2008**). Ce sont des composés organiques formés d'un ou de plusieurs cycles aromatiques (le benzène) liés à un ou plusieurs groupements hydroxyle (**Élie, Frédéric, 2022**). Il existe environ 8000 composés d'une grande diversité structurelle (**Garcia-Salas et al., 2010**). Ils sont solubles dans l'eau et les solvants organiques (**Ashraf et al., 2018**).

### 2. Les polyphénols présents dans le raisin

Les raisins sont une source riches de composés phénoliques, environ 75% de ces derniers se trouvent dans la peau et les pépins (**Ghafoor et al., 2009**). Ces composés phénoliques peuvent être classés en deux groupes : les non-flavonoïdes et les flavonoïdes (**Rebello, 2013**). Les flavonoïdes comprennent les flavan-3-ols (catéchine), les flavonols (quercétine) et les anthocyanes. Les non flavonoïdes comprennent les acides phénoliques et les stilbènes. Dans la baie de raisin, les flavonoïdes sont principalement localisés dans la peau comme les anthocyanes et le resvératrol, tandis que les flavan-3-ols (catéchines et proanthocyanidines) sont présents dans la peau, les graines et la pulpe (**Mané et al., 2007**).

#### 2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont classés en fonction de leurs deux structures carbonées distinctes, de la position et le nombre des groupements hydroxyles sur le cycle aromatique, en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques (**Chandrasekara and Shahidi, 2018**). Les acides benzoïques, contenant sept atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) et les acides cinnamiques comprenant neuf atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ces composés se présentent sous forme libre ou conjuguée (**Garrido, 2013**).

##### 2.1.1. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques (AHC) constituent l'une des principales classes de composés phénoliques présents dans la nature (**Herrmann and Nagel, 1989**). Ce sont des

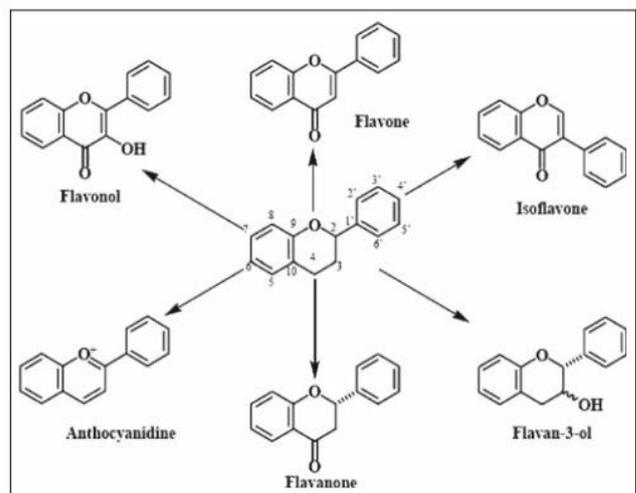
métabolites secondaires dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine. Ils ont tous un squelette carboné C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> avec une double liaison dans la chaîne latérale (El-Seedi *et al.*, 2012). Ces principaux acides hydroxycinnamiques sont les acides caféique, férulique, sinapique, *p*-coumarique, cinnamique, *o*-coumarique et *m*-coumarique (El-Seedi *et al.*, 2012; Herrmann and Nagel, 1989). Ces constituants sont surtout présents dans la pulpe de la baie de raisin. Le composé majeur des acides hydroxycinnamiques dans le raisin est l'acide caftarique (ester caféoyl-tartrique) (Chira, 2008).

### 2.1.2. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque avec une structure à sept atomes de carbone de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (Rashmi and Negi, 2020). Ils comprennent notamment les acides gallique, *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, syringique et protocatéchique. Leur concentration est généralement faible dans les fruits (Tomás-Barberán and Clifford, 2000) à l'exception de certains fruits rouges (les raisins), du radis noir, de l'oignon et de la peau des pommes de terre (Lewis *et al.*, 1998). Les principaux acides hydroxybenzoïques sont les acides gallique, éllagique, protocatéchique et 4-hydroxybenzoïque (Lafay and Gil-Izquierdo, 2008).

### 2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones (Chira *et al.*, 2008). Ils peuvent être subdivisés en différents sous-groupes (figure 03) en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel est fixé l'anneau B (Panche *et al.*, 2016).



**Figure 03:** Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008).

Parmi les flavonoïdes on trouve les flavanols, les anthocyanes, les flavanones, les flavonols, les flavones, et les isoflavones (Ghedira, 2005). Dans la baie de raisin, les flavonoïdes sont principalement localisés dans la pellicule, comme les anthocyanes et le resvératrol, tandis que les flavan-3-ols (catéchines et proanthocyanidines) sont présents dans la pellicule, les pépins et dans la pulpe (Mitić *et al.*, 2012).

### 2.2.1. Les anthocyanines

Les anthocyanidines sont largement présentes dans le règne végétal principalement sous formes de glycosides, exclusivement dans la pellicule des raisins noirs (les raisins blancs sont dépourvus d'anthocyanidines) (**Chira et al., 2008**). Les anthocyanes sont directement responsables de la couleur rouge, bleue et violette des raisins noirs. Ce sont des monoglycosides de 5 anthocyanidines à savoir la delphinidine, la cyanidine, la pétunidine, la péonidine, et la malvidine (**Xia et al., 2010**). Les anthocyanidines et les anthocyanes se distinguent des autres flavonoïdes par la présence de deux doubles liaisons dans leurs anneaux hétérocycliques (**Singla, 2019**) et présentent des teneurs importantes en anthocyanes 3,5 diglucosides (**Conde, 2007**).

### 2.2.2. Les flavonols

Les flavonols incolores sont parmi les flavonoïdes les plus abondants dans les plantes et sont généralement présents sous forme de mono, di ou triglycosides (**Stracke, 2010**).

Les flavonols sont une classe de composés flavonoïdes présents dans la pellicule des baies de raisin *Vitis vinifera* et participent à la protection contre les rayons UV (**Castillo-Muñoz, 2010**). Les flavonols présents dans le raisin sont : le kaempférol, la quercétine, la myricétine, l'isorhamnétine, larictrine et syringétine des glycosides qui provient des aglycones (**Garrido, 2013**).

### 2.2.3. Les flavanols (proanthocyanidines)

Les flavanols sont également rencontrés sous forme d'oligomères et de polymères, appelés tannins condensés ou proanthocyanidines parce qu'ils libèrent des anthocyanidines (**Cheyrier, 2005**). Les flavan-3-ols sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ils sont présents à la fois dans la pellicule et les pépins de raisin. Les pellicules contiennent des concentrations en flavan-3-ols beaucoup plus faibles que les pépins et leur composition est également différente (**González-Manzano Susana, 2004**).

### 2.3. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés organiques comportant deux anneaux phénoliques dont la formule de base est C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. Ils sont localisés généralement dans la pellicule de raisin frais essentiellement sous forme glycosylés et localisés aussi dans les pépins et les tiges (**Geana et al., 2015**). Ils sont synthétisés par les plantes en tant que composés de défense contre les stress biotique et abiotique (**Wang et al., 2010**). Ils peuvent être sous forme de monomères, dimères ou oligomères (**Chong et al., 2009**). Les stilbènes monomères peuvent subir

différents types de modifications telles que l'oligomérisation, la glycosylation, la méthylation et la prénylation, et peuvent également donner naissance à d'autres stilbénoides (Kiselev *et al.*, 2019).

### 2.3.1. Le resvératrol

Le resvératrol (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>), phytoalexine produite par la vigne en réponse aux agressions fongiques et bactériennes, a été identifié dans plus de 70 espèces de végétaux et est abondant dans la pellicule de raisin *Vitis vinifera* et dans le vin rouge (Piñeiro *et al.*, 2006). Le resvératrol et ses dérivés appartiennent à une catégorie de métabolites secondaires végétaux particuliers appelés stilbènes ou stilbénoides (Chastang, 2014). Les resvératrols sont aussi connus pour accroître l'activité anti-oxydante, stimuler les fonctions digestives, inhiber la peroxydation des LDL, et réduire le processus de thrombose (Zhang *et al.*, 2006).

### III.Extraction assistée par ultrason

#### 1. Les méthodes d'extraction

L'extraction est une étape primordiale dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques (**Ghafoor et al., 2009**). Elle est généralement réalisée à l'aide de techniques conventionnelles (Soxhlet, macération et hydrodistillation) (**Milella et al., 2019**). Outre ces procédés classiques d'extraction par solvant utilisés pour la récupération des composés phénoliques, des méthodes non conventionnelles sont apparues comme alternatives à ces dernières telles que l'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction par fluide supercritique (EFS) et l'extraction assistée par micro-ondes (EAM). Elles sont plus rapides et automatisées (**Dahmoune et al., 2013**). Parmi ces techniques, l'EAU a suscité un grand intérêt car elle offre plusieurs avantages comme l'accélération du processus d'extraction et l'amélioration du rendement d'extraction des composés bioactifs en particulier de composés phénoliques (**Corrales et al., 2008**).

#### 2. Définition de l'extraction assistée par ultrason

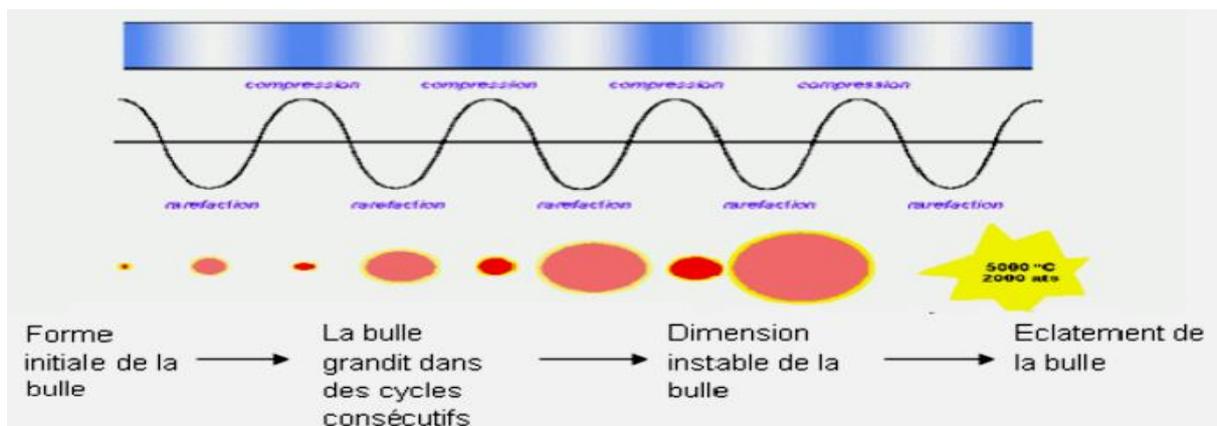
L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (20-100 kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant (**Chemat and Khan, 2011**). La matière première est immergée dans le solvant soit par contact direct (sonde) ou indirect (bain) et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatiques ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (**Sališová et al., 1997**).

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est reconnue comme une technologie d'extraction respectueuse de l'environnement et très efficace (**Shen et al., 2023**). Les ultrasons permettent un bon transfert de masse avec un chauffage limité (**Călinescu, 2021**).

#### 3. Principe

Pendant la sonication, les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Ces ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu (**figure 04**). La dilatation écarte les molécules tandis que la compression les rapproche, les pousse l'une vers l'autre. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et

s'effondrent dans un liquide (**Luque-Garcia and De Castro, 2003**). La taille de ces bulles augmente jusqu'à atteindre une taille critique puis elles implosent spontanément en créant une zone d'énergie intense. L'éclatement des bulles de cavitation provoque l'apparition de micro-jets de solvant dirigés vers la cellule entraînant une diffusion plus rapide de ce dernier. L'entrée du solvant dans la cellule provoque le gonflement de cette dernière, ce qui induit un élargissement des pores de la paroi cellulaire et contribue ainsi aux taux de diffusion élevés. L'augmentation du volume de la cellule provoque l'éclatement de la paroi cellulaire, ce qui contribue à l'enrichissement du solvant en composés. Par conséquent, des rendements plus



**Figure 04:** Génération, croissance et éclatement de bulles résultantes du phénomène de cavitation (**Mason, 2002**).

importants ont été observés pour l'extraction assistée par ultrasons (**Fabiano-Tixier, 2016**).

## 4. Facteur influençant la performance de l'EAU

### 4.1. Choix et volume du solvant

Le solvant d'extraction doit être choisi en fonction de la solubilité des composés visés par le processus. En outre, la toxicité, le coût et la disponibilité doivent également être pris en compte (**Medina-Torres et al., 2017**). Lors de la sélection d'un solvant d'extraction pour les composés bioactifs, divers facteurs doivent être pris en considération notamment le transfert de masse, la toxicité humaine, l'affinité moléculaire, la sécurité environnementale et la faisabilité économique. Divers solvants ont des propriétés variables conduisant à différents effets de cavitation ultrasonore dans des conditions identiques. La viscosité du solvant joue un rôle car des solvants plus visqueux réduisent l'effet de cavitation. La polarité et la solubilité du composé cible dans le solvant peuvent avoir un impact significatif sur l'efficacité de l'extraction et enfin, la volatilité du solvant doit être prise en compte. Si l'extraction est

effectuée pendant des périodes prolongées à des températures plus élevées, les solvants volatils peuvent s'évaporer, entraînant une réduction de l'efficacité de l'extraction. La prise en compte de ces facteurs est importante lors de la sélection d'un solvant d'extraction approprié afin d'obtenir des résultats optimaux (Bellumori *et al.*, 2016).

### 4.2. La fréquence des ondes ultrasonores

La fréquence a une importance primordiale dans l'EAU. La plupart des études sont réalisées avec des équipements à basse fréquence (20-60 kHz) car ces dernières n'affectent pas la stabilité des composés phénoliques bioactifs après leur extraction (Soria and Villamiel, 2010). La haute fréquence réduit l'effet de la cavitation, par contre à une plus basse fréquence, des cavitations plus violentes sont produites ayant pour résultat une augmentation de la température et de la pression (Wu *et al.*, 2012).

### 4.3. Puissance des ultrasons

La puissance ultrasonique est directement proportionnelle à l'amplitude ultrasonique. Une puissance ultrasonique plus élevée génère une force de cisaillement plus forte ce qui améliore le rendement et l'efficacité de l'EAU (Carreira-Casais *et al.*, 2021). Cependant, une puissance ultrasonique élevée (supérieure à 600 W) génère des radicaux hydroxyles qui réagissent avec les composés phénoliques et les dégradent (Dzah *et al.*, 2020). Ćurko *et al.* (2017) ont observé une réduction significative des polyphénols totaux et des anthocyanidines totaux dans le vin soumis à une puissance élevée.

### 4.4. Temps de l'extraction

Le temps a une grande influence sur l'extraction. L'accroissement du temps améliore le rendement de l'extraction. Cependant, il peut y avoir également un risque de dégradation des composants de la plante en raison d'une exposition prolongée (Ranjha *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2023). Lors de l'ajustement de la température, une période de temps plus longue peut entraîner la dégradation des phytoconstituants (Ranjha *et al.*, 2021).

### 4.5. Température de l'extraction

Une température plus élevée peut augmenter la solubilité des molécules et la diffusion du solvant d'extraction mais il est également important d'éviter la surchauffe car si la température d'extraction est trop élevée, le solvant sera vaporisé et les composés phénoliques seront décomposés (Richter, 2007).

### 5. Équipement de laboratoire

En général, le bain à ultrasons et la sonde à ultrasons (figure n°05) sont les équipements de laboratoires les plus utilisés dans le monde entier et dans différents domaines de la chimie analytique et agroalimentaire (Carreira-Casais *et al.*, 2021).

#### 5.1. Le bain à ultrasons

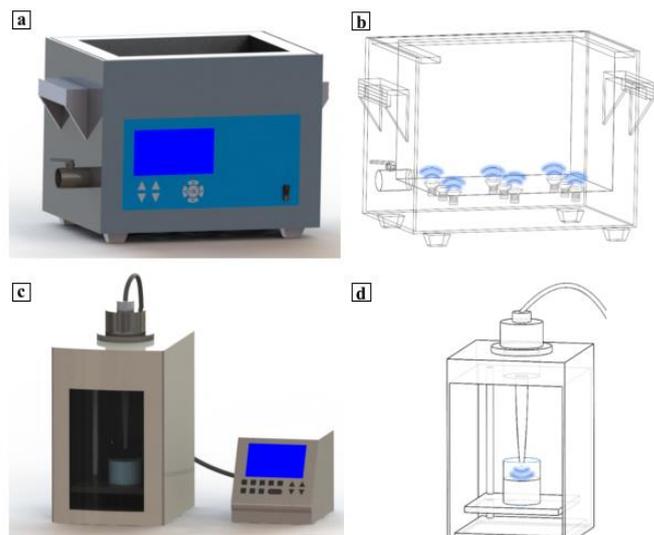
Le bain à ultrason est le type d'appareil à ultrasons le plus connu. Il est composé d'une cuve en acier inoxydable équipée d'un ou plusieurs transducteurs à ultrasons. Il fonctionne généralement à une fréquence d'environ 40 kHz et peut être équipé d'un système de contrôle de la température. Il permet de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément (Chemat *et al.*, 2017).

#### 5.2. La sonde ultrasonique

Les sondes ultrasoniques fonctionnent généralement à environ 20 kHz et utilisent un transducteur lié à la sonde qui est immergée dans le réacteur ce qui permet de délivrer des ultrasons directement dans le milieu d'extraction avec une perte minimale d'énergie ultrasonore. Le système de sonde est plus puissant en raison de l'intensité ultrasonique délivrée à travers une surface plus petite (uniquement la pointe de la sonde) par rapport au bain ultrasonique. Les sondes de forte puissance sont les plus utilisées pour les applications d'extraction et il existe plusieurs modèles de sondes avec des longueurs, des diamètres et des géométries d'extrémité différents (Chemat *et al.*, 2017).

### 6. Application des ultrasons

Les ultrasons peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire pour diverses opérations telles que l'extraction, le séchage, la filtration, l'émulsification, l'homogénéisation, etc. (Singla, 2021). Ils ont également été utilisés pour intensifier les techniques d'extraction à haute pression bien qu'à une échelle beaucoup plus réduite (Dias *et al.*, 2021).



**Figure 05:** Bain à ultrason (a et b) et sonde à ultrason (c et d) (Shen *et al.*, 2023).

L'extraction assistée par les ultrasons a été appliquée pour extraire les composants alimentaires tels que les arômes, les antioxydants, les pigments et d'autres composants organiques et minéraux à partir de plusieurs matrices. Les ultrasons jouent un rôle important en tant que technique durable potentielle pour les applications industrielles de l'extraction des polyphénols (**Petigny, 2013**).

### 7. Les avantages et inconvénients

Les avantages de l'extraction assistée par ultrasons pour l'industrie sont nombreux en particulier : l'amélioration des taux d'extraction globaux et du rendement; la possibilité d'utiliser moins de solvants; l'utilisation de sources de produits bruts moins coûteuses; l'amélioration de l'extraction de composés sensibles à la chaleur; la réduction du temps et les coûts du procédé et la non destruction des composés volatiles (**Fabiano-Tixier, 2016**). Les ultrasons peuvent aussi améliorer la pénétration du solvant dans les cellules ce qui permet d'améliorer le transfert de masse et perturber les parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu cellulaire (**Yang et al., 2017**).

La technique d'extraction assistée par ultrasons présente aussi quelques inconvénients à savoir: l'échauffement limité (**Călinescu, 2021**); l'augmentation de la température interne du récipient d'extraction pour des durées d'extraction plus longues (**Petigny, 2013**); les effets délétères des ondes ultrasonores de forte intensité sur les constituants actifs des plantes en raison de la formation de radicaux libres qui entraînent des modifications indésirables des composants extraits et la dégradation des principes actifs des matrices végétales qui est due à la pyrolyse oxydative provoquée par les radicaux hydroxyles (OH<sup>-</sup>) pendant la cavitation (**ameer, 2017**); la production d'environ 65dB (décibels) de bruit par l'équipement ultrasonique pendant le fonctionnement. Les ultrasons à haute fréquence sont susceptibles d'avoir un impact négatif sur la santé des opérateurs et ils sont susceptibles de générer une quantité importante de radicaux libres, ce qui entraîne la dégradation des polyphénols et la réduction de leur activité biologique ainsi que la réduction des composants bioactifs (**Shen et al., 2023**).

### 8. Optimisation de l'extraction par le plan d'expérience

#### 8.1. Les plans d'expérience

Les plans d'expériences sont des techniques statistiques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux

bien déterminés. Une suite d'essais organisée consistant à manipuler les facteurs afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale (**Hancco et al., 2011**).

### 8.2. La méthodologie de surface de réponse

L'optimisation du processus d'extraction est réalisée par des méthodes empiriques ou statistiques. La méthodologie de surface de réponse (MSR) fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation. C'est un protocole statistique et mathématique utilisé dans la modélisation mathématique. Le principal avantage de la MSR est de réduire le nombre d'essais expérimentaux nécessaires pour évaluer plusieurs variables et leurs interactions (**Chen et al., 2016**) à l'aide d'un logiciel statistique qui est le JMP (de l'institut SAS). Le modèle de la MSR peut donner une équation mathématique (**Bachir Bey et al., 2014**). La MSR permet de concevoir des expériences, de construire des modèles, d'évaluer les effets des facteurs et de rechercher les conditions optimales des facteurs pour obtenir les réponses souhaitées. Le processus d'optimisation de cette méthodologie implique l'étude de la réponse des combinaisons conçues statistiquement, l'estimation des coefficients en les adaptant à un modèle mathématique qui correspond le mieux aux conditions expérimentales, la prédiction de la réponse du modèle adapté et la vérification de la validation du modèle (**Dong, 2009**).

Parmi les trois types de plans de surface de réponse couramment utilisés les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans composites centrés (CCD) (**Fadil et al., 2015**). Dans le présent travail le Box-Behnken est le plan qui a été appliqué.

#### 8.2.1. Le plan Box-Behnken (BBD)

Le plan Box-Behnken (BBD) est un type de plan de MSR employé pour examiner le rapport entre une ou plusieurs variables de réponse et un ensemble de paramètres expérimentaux quantitatifs (**Ragonese et al., 2002**). Le BBD a été proposé en utilisant seulement trois niveaux de chaque facteur et un nombre raisonnable de points expérimentaux. Ce plan est rotatif, il nécessite trois niveaux pour chaque facteur au lieu de cinq comme dans le CCD, ce qui réduit le nombre d'essais expérimentaux pour évaluer les variables multiples et leurs interactions et il est plus pratique et moins coûteux à mettre en œuvre que le CCD (**Wu, 2012**).

**MATÉRIEL**

**ET**

**MÉTHODE**

### 1. Matériel végétale

La présente étude porte sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir de la pellicule de raisin *Vitis vinifera* de la variété Red Globe.

#### 1.1. Échantillonnage

Les échantillons de raisins (environ 4 kg) ayant servis pour notre étude ont été récoltés à la ferme El Aifa d'Amizouren Septembre 2022. Les échantillons ont été emballés dans des sacs hermétiquement fermés, transportés au laboratoire puis soigneusement lavés avec l'eau du robinet afin d'éliminer toutes les impuretés à la surface. Les fruits ont été tout d'abord coupés en deux avec un couteau afin d'extraire les pépins. Ensuite, les pellicules ont été soigneusement retirées de la pulpe. Les pellicules ont été séchées dans un lyophilisateur jusqu'à séchage complet (48h). Après séchage, ces derniers ont été broyés dans un broyeur électrique et la poudre obtenue a été conservée au réfrigérateur (4°C) dans des boîtes en verre hermétiques jusqu'à analyse (optimisation de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante).

#### 1.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU) des composés phénoliques

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante à partir des pellicules de raisin (variété Red Globe) a été réalisée par l'extraction assistée par ultrasons (EAU) dans le but d'extraire le maximum de composés phénoliques.

L'extraction des polyphénols à partir de la poudre des pellicules de raisin (PPR) a été réalisée dans un bain à ultrasons (ELmasonic S 60 H) (**figure05**) fonctionnant à une fréquence comprise entre 50 et 60 Hz, une puissance maximale de 550 W et à température maximale de 80°C. Une quantité de la PPR (50 mg) a été placée dans un flacon en verre puis mélangée avec différents solvants d'extraction (15 ml) et soniquée pendant différents temps et différentes températures. La température au cours de l'extraction a été mesurée à l'aide d'un thermomètre à sonde fixe. Après extraction, les extraits obtenus ont été refroidis puis centrifugés dans une centrifugeuse (Sigma 3-16 kl) à 4200 rpm et à 15°C/20 min. Les surnageants ont été filtrés à travers un papier filtre. Les extraits filtrés ont été conservés à 4°C jusqu'à analyse. Ces extraits ont été utilisés pour la détermination des composés phénoliques totaux (CPT), des composés flavonoïdes totaux (CFT), et des proanthocyanidines ainsi que la mesure de l'activité antioxydante (neutralisation du radical DPPH, neutralisation du radical ABTS, et le pouvoir réducteur PR).



**Figure 05:** Bain ultrason utilisé (ELmasonic S60H).

## **2. Dosage des composés phénoliques**

### **2.1. Dosage des polyphénols totaux (PT)**

#### **2.1.1. Principe de la méthode**

Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et de phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Cette réaction, est réalisée avec du carbonate de sodium. La coloration bleue est lue à 765 nm (Georgé, Brat *et al.*, 2005).

#### **2.1.2. Protocole**

La teneur en composés phénoliques totaux a été mesurée par colorimétrie en utilisant la méthode au Folin-Ciocalteu (FC). Un volume de 100 $\mu$ l de l'extrait a été transféré dans un tube à essai puis mélangé avec 1ml de réactif de FC dilué 1/10. Après 3 minutes, un volume de 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%, p/v) a été ajouté. Les mélanges ont été incubés pendant 30 min dans l'obscurité avant de mesurer l'absorbance à 765 nm dans un spectrophotomètre UV-Vis contre un blanc contenant du solvant d'extraction à la place de l'extrait. Les concentrations en PT ont été calculées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique dans un gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (**Figure 01, Annexe I**) (**Dranca and Oroian 2016**).

### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

#### 2.2.1. Principe de la méthode

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 susceptible de se fixer aux ions  $Al^{+3}$  du chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) pour donner un complexe de couleur jaunâtre. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon 1968**).

#### 2.2.2. Protocole

La quantification des flavonoïdes a été estimée selon la méthode de **Woisky and Salatino (1998)**. Un volume de 0,5 ml de l'extrait ont été transféré dans un tube à essai puis mélangé avec 0,5 ml de solution d'éthanol à 2% d' $AlCl_3$ . Les mélanges ont été incubés pendant 30 min avant de mesurer l'absorbance à 420 nm. La teneur en FT a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine. Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent de la quercétine dans un gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) (**Figure 02, Annexe I**) (**Ordonez, Gomez et al., 2006**).

### 2.3. Dosage des proanthocyanidines

#### 2.3.1. Principe de la méthode

Les proanthocyanidines vont subir une hydrolyse (dépolymérisation) acide pour libérer des unités de flavan-3-ols. Chaque unité de flavan-3-ol va réagir avec une molécule de vanilline pour former un complexe de couleur rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proanthocyanidines présente dans l'extrait (**Schofield, Mbugua et al., 2001**).

#### 2.3.2. Protocole

La teneur en proanthocyanidines a été déterminée selon la méthode décrite par **Li, Guo et al. (2006)** Un volume de 100  $\mu$ L d'extrait a été transféré dans un tube à essai puis mélangé avec 0,6 ml de vanilline à 4% (w/v) dilué dans le méthanol. Le mélange a été ensuite ajouté à un volume de 0,3 ml d'HCl pur puis incubé pendant 15 minutes avant la lecture de l'absorbance à 500 nm. La teneur en proanthocyanidines a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine. Les résultats ont été exprimés en milligramme

équivalents catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS) (**Figure 03, Annexe I**) (**Vuong, Hirun et al., 2013**).

### **3. Activité antioxydant par DPPH**

#### **3.1. Neutralisation du radical DPPH**

##### **3.1.1. Principe de la méthode**

Le test de neutralisation du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) est basé sur la mesure de la capacité de piégeage de ce radical par les antioxydants. L'électron impair de l'atome d'azote dans le DPPH est réduit en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants pour former l'hydrazine correspondante. Le DPPH présente une forte bande d'absorption à 517 nm en raison de son électron impair et la solution apparaît d'une couleur violette profonde (**Kedare and Singh 2011**).

##### **3.1.2. Protocole**

La détermination de la capacité de piégeage des radicaux libres a été évaluée à l'aide du radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), comme décrit par **Brand-Williams, Cuvelier et al. (1995)** et modifié par **Sánchez-Moreno, Larrauri et al. (1998)**. Un volume de 50 µl de l'extrait a été transféré dans un tube à essai puis mélangé avec à 1450 µl de solution méthanolique de DPPH (0,03 mg/ml) puis incubé pendant 30 min. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le taux de neutralisation du radical DPPH a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec le trolox. Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalents trolox par gramme de matière sèche (mg ET/g MS) en se référant à la courbe d'étalonnage en (**Figure 04, Annexe II**) (**Júnior, Araujo et al. 2021**).

#### **3.2. Neutralisation du radical ABTS**

##### **3.2.1. Principe**

Le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de couleur verte réagit rapidement avec les oxydants par transfert d'électron et se décolore (**Huang, Lin et al. 2021**).

##### **3.2.2. Protocole**

Le test de neutralisation du radical ABTS a été déterminé conformément selon la méthode **Babbar, Oberoi et al. (2011)** avec quelques modifications. Une solution mère

d'ABTS a été préparée en mélangeant un volume d'une solution de persulfate de potassium (2,45 mM) avec le même volume d'une solution d'ABTS (7 mM) puis incubé pendant 16h à température ambiante dans l'obscurité. La solution ABTS a été ensuite diluée avec de l'éthanol 70% jusqu'à ce que l'absorbance soit de 0,7 à 734 nm. Un volume de 100 µL d'extrait a été mélangé avec 0,9 ml de solution d'ABTS. Après 6 min, l'absorbance est lue à 734 nm contre un blanc contenant du le solvant d'extraction à la place de l'extrait. Le taux de neutralisation du radical ABTS a été calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec le trolox. Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent trolox par gramme de matière sèche (mg ET/g MS) (**Figure 06, Annexe II**) (**Singanusong, Nipornram et al. 2015**).

### 3.3. Pouvoir de réduction (PR)

#### 3.3.1. Principe

Le PR est basé sur la capacité des composés phénoliques à réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ , en présence du 2, 4,6-trypyridyl-s-triazine pour former un complexe coloré (**Roginsky and Lissi 2005**).

#### 3.3.2. Protocole

Le pouvoir réducteur (PR) des extraits a été mesuré selon la méthode **Oyaizu (1986)**. Un volume de 100 µl d'extrait a été ajouté à un volume de 250 µl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 250 µl de ferricyanure de potassium (1%). Les mélanges ont été incubés à 50°C pendant 20 min dans un bain marie puis 250 µl d'acide trichloracétique (10%) ont été ajoutés au mélange. Un volume de 250 µl de mélange a été prélevé et placé dans un tube à essai puis additionné de 250 µl d'eau distillée et 50 µl de  $FeCl_3$  (1%). L'absorbance est lue à 700 nm. Le PR a été calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS) (**Figure 05, Annexe II**).

## 4. Étude préliminaire par méthode séquentielle

Des essais préliminaires ont été effectués pour pouvoir choisir les paramètres à fixer pour l'étude préliminaire. Afin d'optimiser les paramètres d'extraction, les extraits obtenus ont fait l'objet de différents dosages en polyphénols totaux (PT), flavonoïdes (FT), proanthocyanidines (PAC) et l'activité antioxydante a été évaluée (DPPH, ABTS et PR). Les résultats des différents dosages ont été déterminés à partir des équations de régression

linéaires des courbes d'étalonnage qui sont représentées en Annexe I et II et exprimées en mg équivalent par gramme de matière sèche.

### **4.1. Choix de solvant d'extraction**

L'extraction par ultrasons a été réalisée en utilisant 04 types de solvants : acétone 50%, méthanol 50%, éthanol 50%, et eau distillée. Les paramètres de départ ont été fixés comme suit : le temps d'extraction à 20 min, la température à 35°C, le ratio à 50 mg/15 ml. La puissance et la fréquence ont été fixées à 550 W et à 50-60 Hz, respectivement. Le meilleur solvant a été choisi en se basant sur la teneur en polyphénols totaux.

### **4.2. Gradient du solvant (acétone)**

Après avoir choisi le meilleur solvant d'extraction qui est l'acétone. Différentes extractions ont été effectuées à différentes concentrations en acétone (10, 30, 50, 70, et 90% v/v). La meilleure concentration a été choisie en se basant également sur la teneur en polyphénol totaux.

### **4.3. Température d'extraction**

La température idéale d'extraction a été étudiée en utilisant le meilleur solvant et la meilleure concentration en solvant qui ont été déterminés précédemment. Les températures testées sont 25, 30, 35, 40, 45, et 50°C. La meilleure température a été sélectionnée en se basant sur la teneur en polyphénol totaux.

### **4.4. Temps d'extraction**

La variation du temps d'extraction (5, 10, 20, 30 et 40 min) a été réalisée après avoir fixé les trois paramètres précédents (type et concentration en solvant et la température d'extraction). Le meilleur temps d'extraction a été choisi en se basant sur la teneur en polyphénol totaux.

### **4.5. Ratio échantillon/solvants**

La détermination du ratio a été effectuée en fixant le solvant (15 ml d'acétone) et en variant la quantité de la poudre de pellicule de raisin : 25, 50, 100, 150 et 200 mg. Les autres paramètres déterminés précédemment en été fixés. Le meilleur ratio d'extraction a été choisi en se basant sur la teneur en polyphénol totaux.

## 5. Optimisation par plan d'expérience

Dans cette étude, l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydant à partir de la poudre de pellicule de raisin a été réalisée par la méthode de surfaces de réponses (MSR). Un plan Box-Behnken à trois niveaux (-1, 0, +1) a été utilisé pour évaluer l'effet de quatre variables indépendantes sur les deux réponses étudiées.

Quatre variables spécifiques du processus d'extraction dénommées X1 (concentration de solvant, variant de 30 à 70%), X2 (temps d'extraction allant de 10 à 30 min), et X3 (température variant entre 30 à 50°C) et X4 (Ratio solide/ liquide, allant de 25 à 100 mg/15ml) ont été sélectionnées. Au total, 27 séries expérimentales ont été réalisées de manière aléatoire comme indiqué dans le tableau II. Les données recueillies au cours de ces expériences ont été utilisées pour développer un modèle polynomial complet du second ordre.

L'étude préliminaire a permis de déterminer les niveaux haut et bas pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans le **tableau I**.

**Tableau I:** Variables indépendantes et les niveaux des facteurs influençant l'extraction par ultrasons.

| Les variables indépendantes                  | Niveaux des facteurs |      |     |
|--|----------------------|------|-----|
|  | -1                   | 0    | +1  |
| <b>X1 : Gradient d'acétone (%)</b>           | 30                   | 50   | 70  |
| <b>X2 : Temps (min)</b>                      | 10                   | 20   | 30  |
| <b>X3 : Température (C°)</b>                 | 30                   | 40   | 50  |
| <b>X4 : Ratio solide / liquide (mg/15ml)</b> | 25                   | 62,5 | 100 |

**Tableau II:** Les combinaisons effectuées par l'optimisation des conditions d'extraction.

| <b>Essai</b> | <b>Configuration</b> | <b>Gradient de solvant</b> | <b>Temps</b> | <b>Température</b> |
|--------------|----------------------|----------------------------|--------------|--------------------|
| <b>1</b>     | -00                  | 30                         | 10           | 40                 |
| <b>2</b>     | --00                 | 30                         | 30           | 40                 |
| <b>3</b>     | +00                  | 70                         | 10           | 40                 |
| <b>4</b>     | ++00                 | 70                         | 30           | 40                 |
| <b>5</b>     | 00--                 | 50                         | 20           | 30                 |
| <b>6</b>     | 00++                 | 50                         | 20           | 30                 |
| <b>7</b>     | 00+-                 | 50                         | 20           | 50                 |
| <b>8</b>     | 00++                 | 50                         | 20           | 40                 |
| <b>9</b>     | -00-                 | 30                         | 20           | 40                 |
| <b>10</b>    | -00+                 | 30                         | 20           | 40                 |
| <b>11</b>    | +00-                 | 70                         | 20           | 40                 |
| <b>12</b>    | +00+                 | 70                         | 20           | 40                 |
| <b>13</b>    | 0--0                 | 50                         | 10           | 30                 |
| <b>14</b>    | 0+-0                 | 50                         | 10           | 50                 |
| <b>15</b>    | 0+-0                 | 50                         | 30           | 30                 |
| <b>16</b>    | 0++0                 | 50                         | 30           | 50                 |
| <b>17</b>    | -0-0                 | 30                         | 20           | 30                 |
| <b>18</b>    | -0+0                 | 30                         | 20           | 50                 |
| <b>19</b>    | +0-0                 | 70                         | 20           | 30                 |
| <b>20</b>    | +0+0                 | 70                         | 20           | 50                 |
| <b>21</b>    | 0-0-                 | 50                         | 10           | 40                 |
| <b>22</b>    | 0-0+                 | 50                         | 10           | 40                 |
| <b>23</b>    | 0+0-                 | 50                         | 30           | 40                 |
| <b>24</b>    | 0+0+                 | 50                         | 30           | 40                 |
| <b>25</b>    | 0000                 | 50                         | 20           | 40                 |
| <b>26</b>    | 0000                 | 50                         | 20           | 40                 |
| <b>27</b>    | 0000                 | 50                         | 20           | 40                 |

### **6. Analyse statistique :**

Les résultats représentent la moyenne de 3 essais ( $n=3$ ) et de deux extractions ( $N=2$ ) et présentés sous forme de moyenne  $\pm$  ET. Une analyse de la variance (ANOVA) suivi de test Tukey a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 12 afin de mettre en évidence les différences significatives entre les résultats pour chaque paramètre. Le degré de signification des données est pris à la probabilité  $p < 0,05$ . Un logiciel JMP Pro 14 a été utilisé pour construire le plan d'expérience de (BBD) pour l'analyse de tous les résultats.

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

### 1. Extraction assisté par ultrason

Dans le présent travail, la méthode d'extraction assistée ultrasons (EAU) a été utilisée pour optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante des pellicules de raisin (variété Red Globe). Quatre paramètres ont été variés dont le type de solvant, le gradient en solvant (concentration en %), la température et le temps d'extraction ainsi que le ratio (solide/liquide, mg/15 ml).

### 2. Etude préliminaire

Le type de solvant d'extraction était le premier paramètre étudié. En tout, quatre solvants de polarité différente ont été testés à savoir l'eau, l'éthanol, le méthanol et l'acétone. Après avoir déterminé le meilleur solvant (acétone), nous avons testé l'effet de gradient de ce solvant (10, 30, 50, 70 et 90%) suivi par l'effet de la température d'extraction (25, 30, 35, 40, et 50°C), du temps d'extraction (5, 10, 15, 20, 30 et 40 min) et enfin, l'étude de l'effet du ratio solide/liquide en fixant le volume du solvant à 15ml et en variant le poids de l'échantillon (25/15, 50/15, 100/15, 150/15 et 200 mg/15 ml).

#### 2.1. Effet du type de solvant

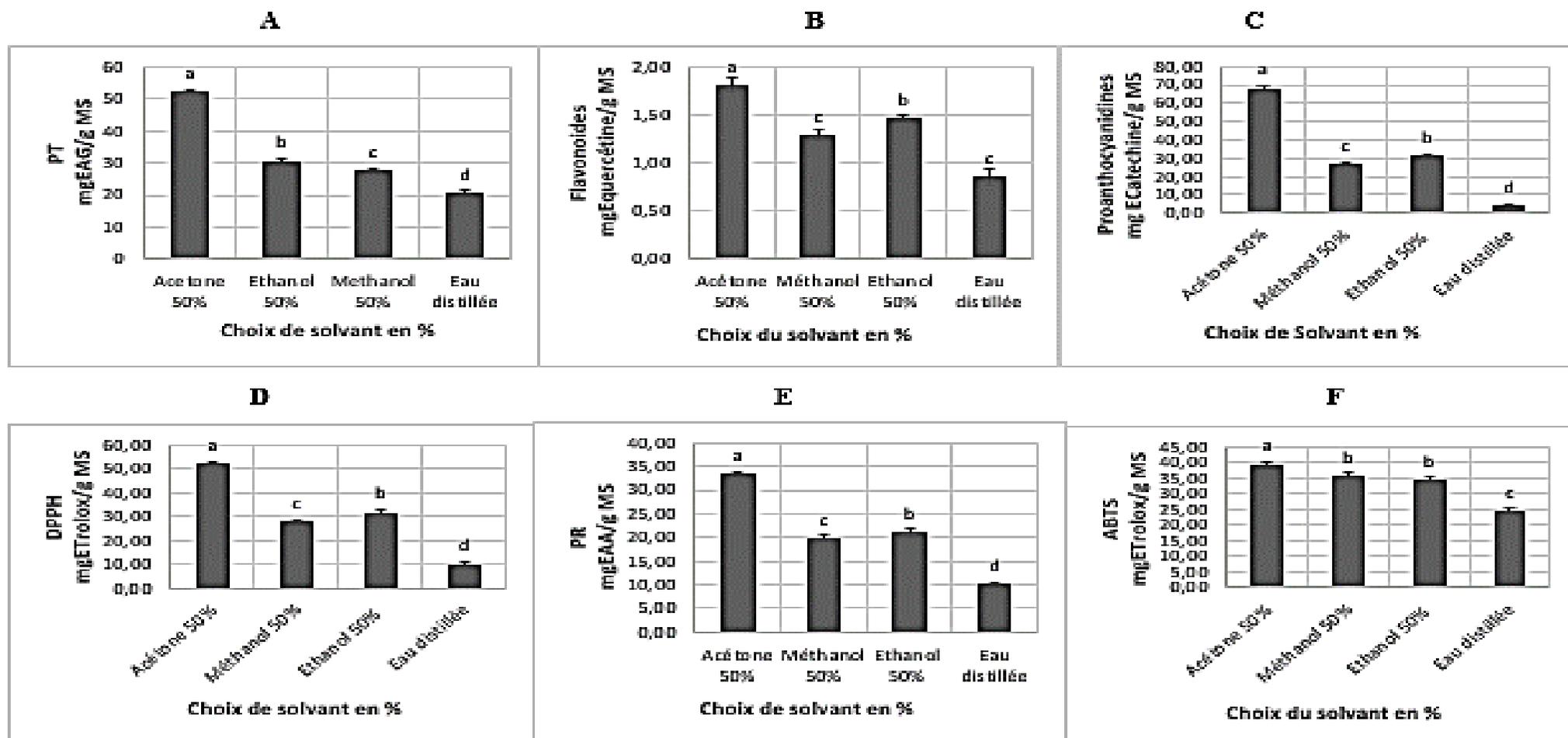
La **figure 07** montre les résultats de l'étude de l'effet du type de solvant sur l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la poudre de pellicule de raisin. Ces résultats montrent que le type de solvant a un effet significatif ( $p < 0.05$ ) sur le taux d'extraction des polyphénols totaux (PT) (**figure 07A**), flavonoïdes totaux (FT) (**figure 07B**), proanthocyanidines (PAC) (**figure 07C**) ainsi que sur l'activité antioxydante à savoir piégeage du radical DPPH (**figure 07D**), pouvoir réducteur PR (**figure 07E**) et piégeage du radical ABTS (**Figure 07F**). L'acétone 50% présentait le meilleur taux d'extraction des PT, des FT et des PAC avec des teneurs de 52,41 mg EAG/g MS, 1,81 mg EQ/g MS, et 68,24 mg EC/g MS, respectivement. L'extrait acétonique manifestait également la meilleure activité antioxydante avec des valeurs de 52,44 mg ET/g MS (piégeage du DPPH), 39,34 mg ET/g MS (piégeage de l'ABTS), et de 33,38 mg EAA/g MS (PR); suivie de l'extrait éthanolique, méthanolique et enfin l'extrait aqueux qui possédait l'activité antioxydante la plus faible.

Les valeurs obtenues des différents dosages effectués dans l'étude préliminaire sont enregistrées dans le **tableau I (Annexe III)**. Les valeurs en PT du raisin rouge Reg Globe, obtenues dans cette étude sont supérieures à celles rapportées par d'autres auteurs. **Guerrero et al. (2009)** ont trouvé des teneurs allant de 119,1 à 336,1 mg EAG/100 g MS dans cinq variétés de raisin rouge espagnoles. Ces différences pourraient être dues à l'influence de la région géographique, à l'effet de la variété (facteur génétique), ainsi qu'aux facteurs liés à

l'extraction telle que la méthode d'extraction, la puissance et la fréquence du bain à ultrasons, etc.

D'après **Munoz *et al.* (2008)**, les composés phénoliques se trouvent principalement dans les couches internes de la pellicule et des pépins du raisin. Leur concentration dépend du cultivar et est influencée par des facteurs viticoles et environnementaux. L'efficacité de l'extraction par les solvants varie en fonction de leurs polarités et de leurs viscosités. L'utilisation des ultrasons permet d'augmenter la capacité d'extraction des PT avec l'acétone car celui-ci peut facilement diffuser dans la matrice de la plante. De plus, la cavitation acoustique se produit plus facilement dans le solvant d'extraction à faible viscosité vu que l'énergie ultrasonore dépasse plus facilement les forces intermoléculaires du liquide. Cependant, l'acétone a une pression de vapeur élevée (229,52 mmHg), ce qui entraîne moins de violence et d'intensité d'effondrement des bulles (**Hemwimol *et al.*, 2006**).

Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui ont montré que l'acétone était le meilleur solvant d'extraction. **Medouni-Adrar *et al.* (2015)** ont extrait les PT dans la pellicule de deux variétés de raisin et ont montré que l'acétone 50% donnait le meilleur rendement en composés phénoliques totaux avec des teneurs allant de 27,90 à 31,15 mg EAG/g MS, suivi de l'éthanol puis le méthanol et enfin l'eau avec les teneurs les plus faibles de 5,58 à 12,53 mg/g MS. **Chaalal *et al.* (2012)** ont trouvé que l'acétone 50% était le meilleur solvant dans l'extraction des polyphénols et de l'activité antioxydante de la figue de Barbarie, suivi par l'éthanol, le méthanol et l'eau. Les résultats de l'EAU des PT à partir des pelures de la mandarine et du citron vert obtenus par **Singanusong *et al.* (2015)** ont révélé que l'acétone donnait le meilleur rendement en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes, suivi le méthanol et l'éthanol.



**Figure 07:** Effet du choix de solvant sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) avec  $e < d < c < b < a$ .

### 2.2. Effet du gradient en acétone

Après avoir déterminé le type du solvant approprié pour l'extraction des PT, qui est l'acétone, différentes combinaisons acétone/eau ont été testées afin d'étudier l'effet de la concentration du solvant (10, 30, 50, 70 et 90%, v/v) sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante de la pellicule de raisin.

Les résultats obtenus **figure 08** montrent que le gradient en acétone a un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante. Ces dernières augmentent avec l'augmentation de la concentration en acétone jusque à atteindre le maximum en PT, FT et en PAC à la concentration de 50% d'acétone. La même chose a été observée pour l'effet du gradient en acétone sur l'activité antioxydante (piégeage du radical DPPH, piégeage du radical ABTS et pouvoir réducteur PR).

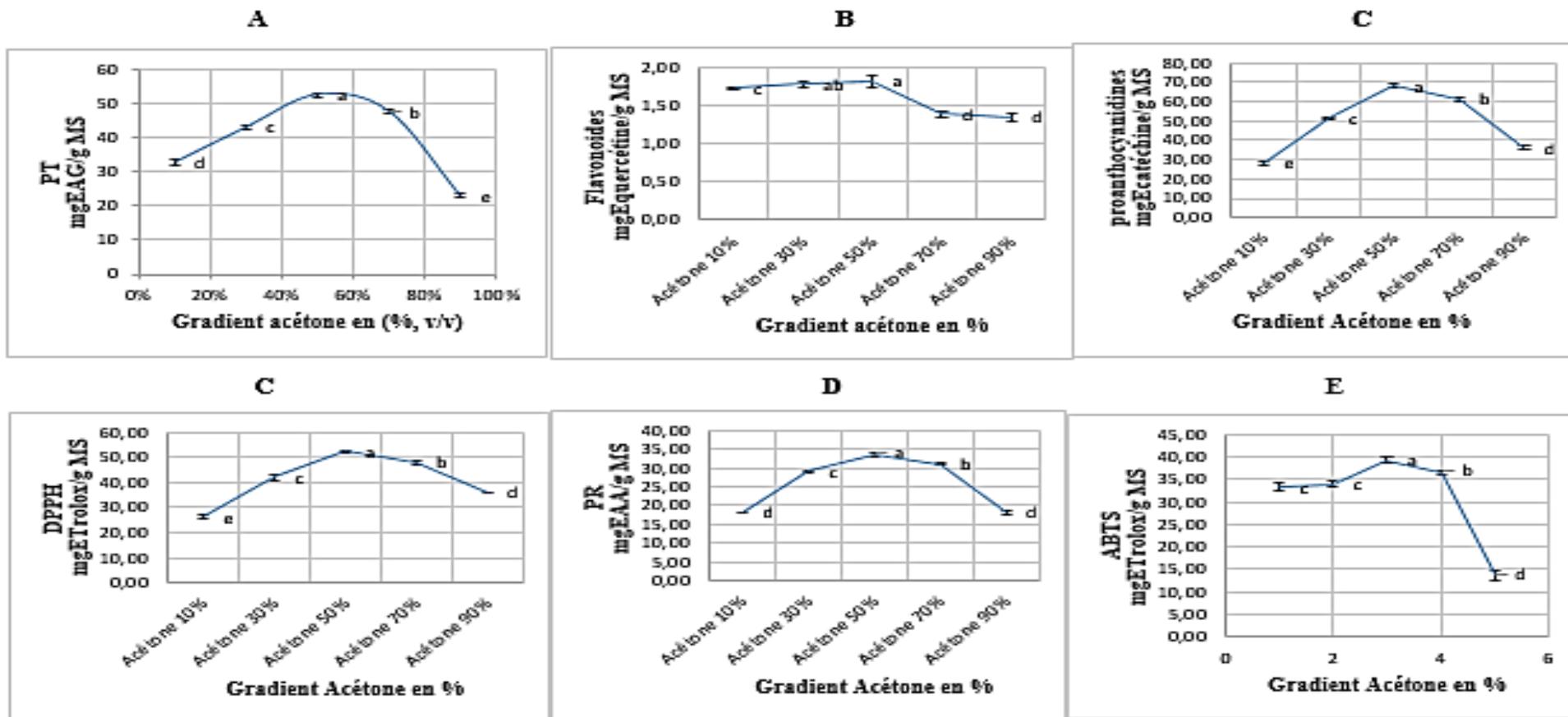
Cependant, en appliquant des gradients en acétone supérieurs à 50% a induit des diminutions des teneurs en composés phénoliques et de l'activité antioxydante. Les teneurs les plus faibles ont été enregistrées au niveau de l'acétone 90% **Tableau I (Annexe III)**. L'élévation de l'activité antioxydante (activité antiradicalaire et pouvoir réducteur) de l'extrait acétone 50% est due à sa richesse en composés phénoliques.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Brahmi et al. (2021)** qui ont trouvé que l'augmentation du gradient en acétone à partir de 10% induisait une augmentation de la teneur en PT des pépins de raisin jusqu'à atteindre le maximum à la concentration de 70%. A partir de ce dernier gradient, les PT ont diminué. **Mitić et al. (2012)** ont rapporté que les extraits de variétés de raisin à forte teneur en composés phénoliques totaux présentaient des activités antioxydantes plus élevées, ce qui corrobore nos résultats.

Selon **Naczk et Shahidi (2006)**, la récupération des composés phénoliques à partir des matières végétaux est influencée par la solubilité du solvant utilisé pour le processus d'extraction. En outre, la polarité des solvants joue un rôle primordial dans l'augmentation de la solubilité phénolique.

### 2.3. Effet de la température sur l'extraction des CP et les AA

Les résultats présentés sur la **figure 09** montrent que la température a un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante de la pellicule de raisin pour les températures 25, 30 et 50°C. Cependant, les températures 35, 40 et 45°C n'ont eu aucun effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'extraction des PT, FT, le PR et le piégeage de l'ABTS car les valeurs de ces paramètres sont statistiquement identiques dans cette marge de température.



**Figure 08:** Effet du gradient en solvant sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) avec  $e < d < c < b < a$ .

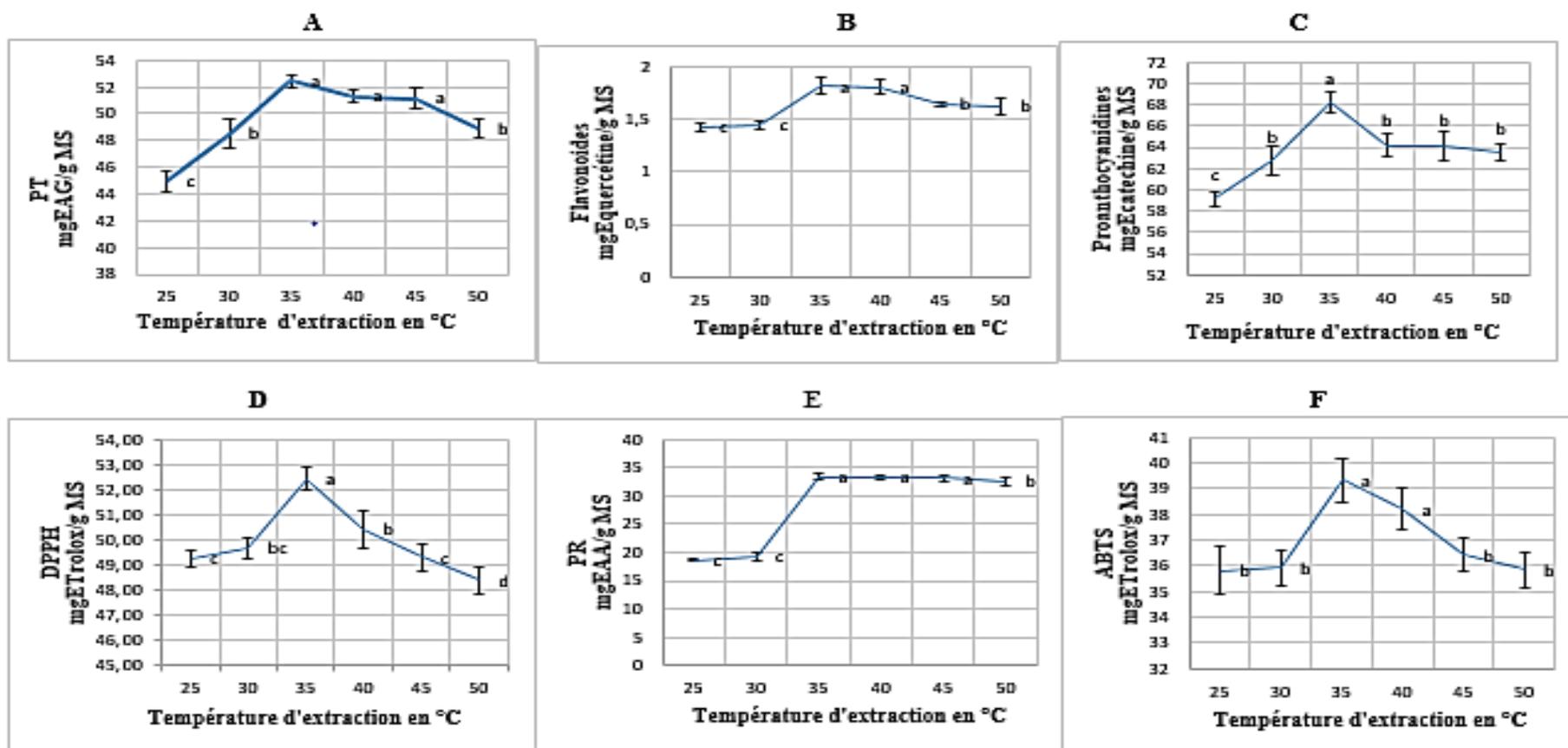
Différentes études ont montré l'impact bénéfique de l'élévation de la température sur l'extraction des composés bioactifs. Il a été démontré que la diffusion de ces divers composés est fortement influencée par la température, et que l'impact de cette dernière est généralement représenté par une variation du coefficient de diffusion (Amor, 2008).

Selon Prasad *et al.* (2011), l'augmentation de la température d'extraction peut rompre les liens de la matrice phénolique et influencer la structure membranaire des cellules végétales ce qui les rend moins sélectives en raison de la coagulation des lipoprotéines. Cependant, un contrôle approprié de la température est nécessaire pour éviter la destruction des composés organiques et pour permettre une application efficace des ultrasons sachant que les effets des ultrasons diminuent avec des températures supérieures à 40 et 50°C, des températures modérées entre 9,9 et 40°C ont été choisies. En outre, l'augmentation des phénomènes de cavitation est directement proportionnelle à l'augmentation de la température du système. Enfin, les polyphénols pourraient subir une dégradation à des températures supérieures à 40 °C surtout lorsqu'ils sont combinés avec les ultrasons (Pingret *et al.*, 2012).

Ainsi, en tenant compte de cela et pour toute éventuelle destruction et/ou dégradation des composés phénoliques la température de 35°C a été choisie comme température optimale pour la suite de l'étude des autres paramètres (temps d'extraction et ratio).

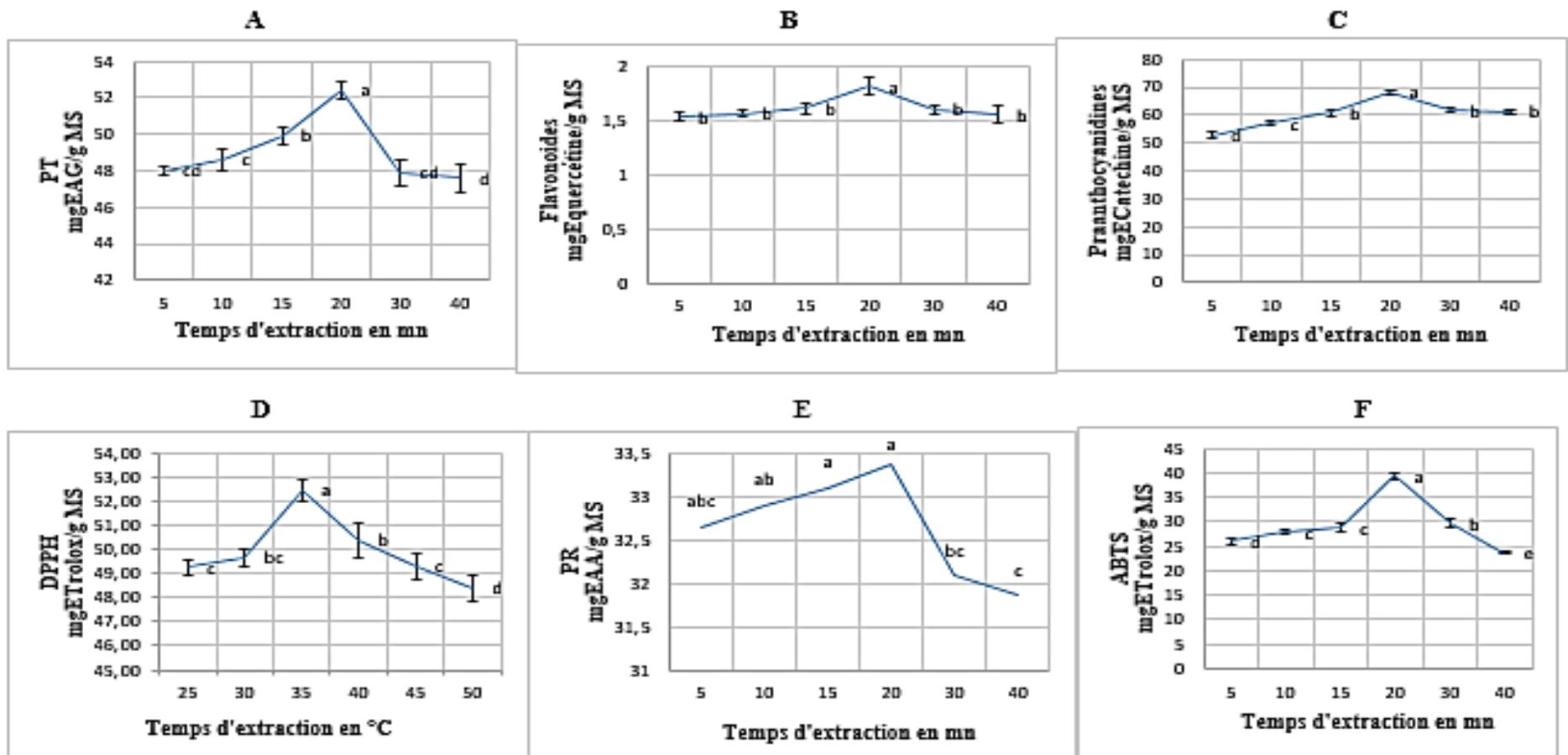
### 2.4. Effet du temps d'extraction

Les résultats présentés dans la **figure 10** montrent que le temps a un effet significatif ( $p < 0.05$ ) sur l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la poudre de pellicule de raisin. L'augmentation du temps d'extraction a fait augmenter le rendement en composés phénoliques et l'activité antioxydante. En appliquant des temps d'extraction allant de 5 à 20 min, on note une élévation de la teneur en PT allant de 48 jusqu'à 52,41 mg EAG/g MS, une augmentation du piégeage du radical DPPH allant de 49,80 à 52,44 mg ET/g MS pour. La même chose a été observée au niveau des FT, PAC et les autres tests antioxydants, Par contre, en appliquant des temps d'extraction supérieurs à 25 min, on observe une diminution du taux d'extraction (les résultats sont mieux illustrés dans le **Tableau I (Annexe III)**). Ainsi, le temps de 20 min a été considéré comme temps optimum d'extraction car il a donné les meilleures teneurs en composés phénoliques et de l'activité antioxydante.



**Figure 09 :** Effet de la température sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) avec  $e < d < c < b < a$



**Figure 10:** Effet des temps sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) avec  $e < d < c < b < a$

Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature. **Bonilla et al. (1999)** qui ont obtenu un meilleur rendement d'extraction en composés phénoliques des extraits aqueux de marc de raisin rouge à un temps de 20 mn. **Novak et al. (2008)** ont appliqué l'EAU pour la détermination des flavonoïdes dans les pellicules de raisin rouge à l'aide d'un bain à ultrason et ont noté qu'une extraction rapide a été obtenue entre 15 et 30 min pour les différents types de flavonoïdes.

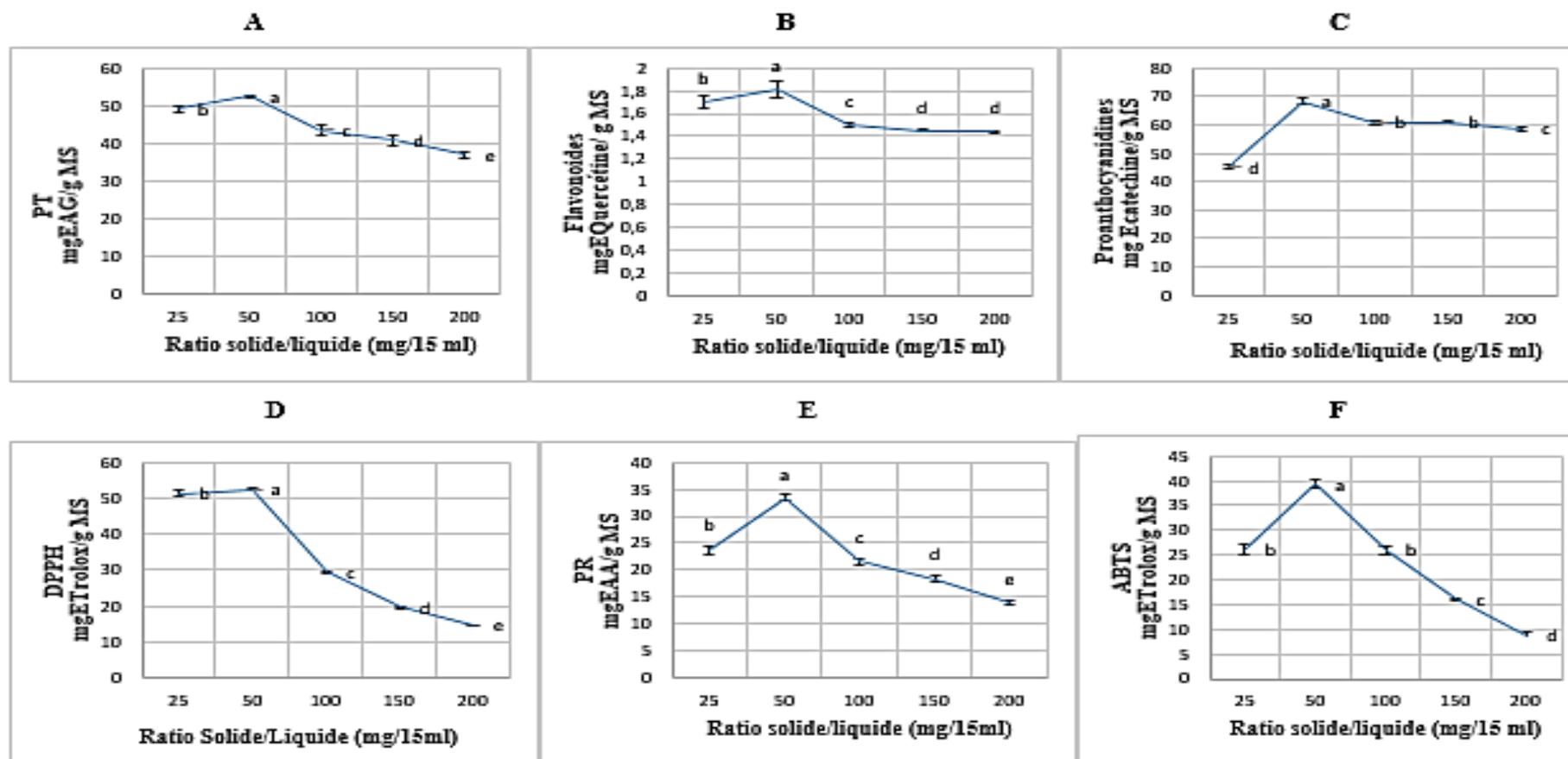
Selon certains auteurs, l'extraction des polyphénols augmente avec le temps d'exposition aux ultrasons, et le rendement d'extraction est ainsi le plus élevé. D'autre part, l'application prolongée d'ultrasons peut entraîner la dénaturation des composés phénoliques. Il convient donc de contrôler soigneusement la durée d'exposition aux ultrasons (**González-M et al., 2006**).

De nombreux chercheurs ont démontré aussi la possibilité d'oxydation des composés phénoliques à des temps d'extraction longs, ce qui peut mener à une diminution extrême de leurs teneurs (**Drużyńska et al., 2007**). D'après **Chavan et Singhal (2013)**, un temps d'extraction prolongé peut augmenter la décomposition des composés bioactifs et diminuer de ce fait le rendement. Il est également évident qu'un temps beaucoup plus long est moins pratique du point de vue économique.

### 2.5. Effet du ratio (solide/liquide)

Les résultats obtenus dans le **tableau I (Annexe III)**, montrent clairement que l'augmentation du poids du solide ou bien ratio d'extraction fait augmenter le rendement en PPT ainsi qu'en AA.

Le ratio (solide/liquide) a un effet significatif ( $p < 0.05$ ) sur l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la poudre de pellicule de raisin, comme indiqué dans la **figure 11**. La teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante augmentait avec l'augmentation du solide, pour atteindre la teneur maximale de 52,41 mg EAG/g MS pour le poids de 50 mg de poudre de raisin. Pour des quantités de poudre allant de 100 à 200 mg, on remarque une diminution remarquable du rendement en PT ainsi que l'activité antioxydante jusqu'à atteindre un taux de 1,44 mg EAG/g MS de PT et des valeurs de 14,55, 13,84 et 8,69 mg/g MS pour les tests antioxydants. Cette diminution est due à l'insuffisance en solvant d'extraction c'est-à-dire qu'on a atteint le stade de saturation de notre solution.



**Figure 11:** Effet du ratio (solide/liquide) sur l'extraction des PT « A », FT « B », PAC « C », DPPH « D », PR « E » et l'ABTS « F » de la poudre des écorces de raisin.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) avec  $e < d < c < b < a$ .

D'après **Eskilsson et Björklund (2000)**, le volume de solvant peut être un paramètre fondamental pour des extractions efficaces. Le volume de solvant doit être suffisant afin d'assurer une immersion totale de l'échantillon, en particulier lorsque la matrice est susceptible de gonfler au cours du processus d'extraction.

### 3. Les conditions optimales

Les conditions optimales de l'extraction assistée par ultrasons des polyphénols totaux ainsi que l'activité antioxydante à partir de la pellicule de raisin (variété Red Globe), sont indiqués dans le **tableau III**. Ces résultats optimaux sont obtenus à partir de l'étude préliminaire des différents paramètres étudiés.

**Tableau III:** Conditions optimales de l'extraction des PT ainsi que l'AA obtenues à partir de l'étude préliminaire.

| Les paramètres d'extraction | Les optimums obtenus | Valeurs des teneurs optimales |                         |                         |                         |                         |                         |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                             |                      | PT                            | FT                      | PAC                     | DPPH                    | PR                      | ABTS                    |
| Choix du solvant            | Acétone              |                               |                         |                         |                         |                         |                         |
| Concentration en acétone    | 50%                  |                               |                         |                         |                         |                         |                         |
| Température d'extraction    | 35°C                 |                               |                         |                         |                         |                         |                         |
| Temps d'extraction          | 20 min               | 52,41±0,52 <sup>a</sup>       | 1,81 ±0,08 <sup>a</sup> | 68,24±0,98 <sup>a</sup> | 52,44±0,42 <sup>a</sup> | 33,38±0,56 <sup>a</sup> | 39,34±0,84 <sup>a</sup> |
| Ratio (solide/liquide)      | 50 mg                |                               |                         |                         |                         |                         |                         |

### 4. La méthodologie de surface de réponse

La méthode de surfaces de réponses (MSR) est une approche mathématique et statistique employée afin de modéliser et d'analyser un processus dans lequel la réponse d'intérêt est affectée par divers variable. L'objectif de cette méthode est d'optimiser la réponse. La MSR explore les relations entre les variables de réponse et plusieurs variables d'entrée. Les paramètres qui affectent le processus sont appelés variables indépendantes, tandis que les réponses sont des variables dépendantes (**Silva, 2018**).

Dans cette étude, deux réponses sont seulement choisies pour l'optimisation de l'extraction des composés phénolique à partir de la poudre des pellicules de raisin par la MSR qui sont les PT et le piégeage du radical DPPH, ce qui permet d'expliquer l'influence de

chacun des quatre paramètres étudiés à savoir la température, la concentration en solvant, le temps d'extraction et le ratio (solide/liquide) indépendamment et d'analyser l'interaction entre eux sur les réponses étudiées.

D'après l'étude préliminaire, les quatre paramètres étudiés ont montré une influence significative sur l'extraction des PT et sur l'activité antioxydante (% solvant, température, temps et ratio S/L).

Dans la MSR trois étapes ont été suivies : réalisation du plan expérimental, modélisation de la réponse et représentations graphiques des résultats. Le plan Box-Behnken a été utilisé pour l'optimisation de l'extraction des antioxydants à partir de la poudre des pellicules de raisin.

### **4.1. Étude de l'optimisation de la procédure d'extraction assistée par ultrasons**

Le logiciel JMP a été employé pour traiter les résultats de l'optimisation par la MSR. Les courbes d'iso-réponses sont utilisées pour identifier les zones de compromis entre les facteurs qui engendrent les réglages conduisant à la réponse désirée. L'objectif de cet outil est d'obtenir des courbes de surface qui reflètent les variations des réponses (**Marti-Mestres *et al.*, 1998**). Après la détermination du modèle et la vérification de sa validité, les courbes d'isoréponses peuvent être tracées à l'intérieur du domaine expérimental. Ces courbes représentent des plans de surfaces de réponse, c'est-à-dire la représentation graphique des résultats (modèle estimé) afin d'en tirer des optimums. Ensuite, pour chercher le réglage optimal exact avec un certain pourcentage de compromis, la fonction « désirabilité » a été utilisée permettant de donner un réglage optimal exact variant entre 0 et 1 (**Fadil *et al.*, 2015**).

### **4.2. Application du plan d'expérience**

En se basant sur l'étude préliminaire, les gammes de chaque variable indépendante, la concentration de solvant (acétone/eau 30-70% v/v), le temps (10- 30 min), la température (30-50°C) et le ratio (S/L 25-100 mg/15 ml) ont été choisis pour la construction du plan d'expérience par le logiciel JMP selon le modèle Box-Behnken pour déterminer l'effet de la réponse étudiée sur les PT et le piégeage du radical DPPH de la poudre des pellicules de raisin.

#### **4.2.1. Vérification du modèle**

Les conditions optimales pour l'extraction des PT et l'activité antioxydante de la poudre des pellicules de raisin qui dépendent du gradient de solvant, temps et température

d'extraction ainsi que du ratio S/L ont été obtenues à l'aide des équations prédictives de la MSR. Les valeurs expérimentales et prédites ont été comparées afin de déterminer la validité du modèle et sont indiquées dans le **Tableau IV** ci-dessous. Il ressort de ces résultats que les valeurs expérimentales et prédites sont fortement rapprochées.

Les résultats montrent que le taux d'extraction des PT varie entre 39,017 et 66,490 mg EAG/g MS et ceux du piégeage du radical DPPH varient entre 28,908 et 60,495 mg ET/g MS. Ces résultats sont très proches des valeurs prédites avec des valeurs comprises entre 36,400 et 66,053 mg EAG/g MS pour les PT et des valeurs comprises entre 26,292 et 59,935 mg ET/g MS pour piégeage du radical DPPH.

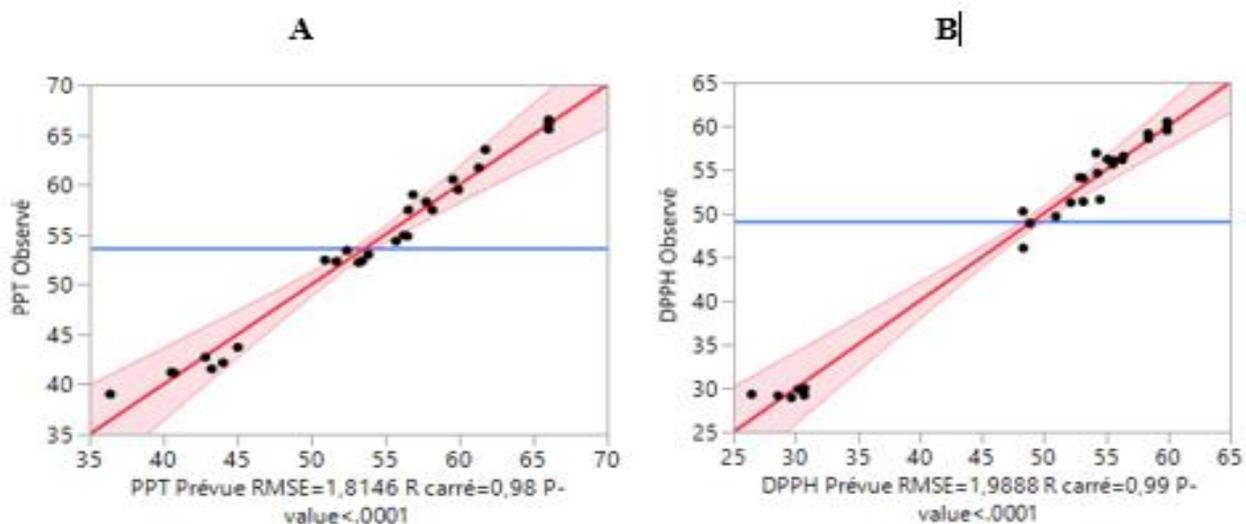
**Candrawinata *et al.* (2015)** ont confirmé que les paramètres temps et température d'extraction ainsi que le ratio ont un impact sur le taux des PT et de piégeage du radical DPPH des extraits aqueux de marc de pomme en utilisant la MSR.

**Tableau IV:** Valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des PT et de piégeage du radical DPPH par le plan BBD pour la poudre des pellicules de raisin.

| Essai | Configuration | Paramètres          |       |             |       | Composés phénoliques |         | Activité antioxydante (DPPH) |         |
|-------|---------------|---------------------|-------|-------------|-------|----------------------|---------|------------------------------|---------|
|       |               | Gradient de solvant | Temps | Température | Ratio | Mesurés              | Prédits | Mesurée                      | Prédite |
| 1     | --00          | 30                  | 10    | 40          | 62.5  | 57,462               | 56,549  | 56,212                       | 54,791  |
| 2     | -+00          | 30                  | 30    | 40          | 62.5  | 58,991               | 56,862  | 54,029                       | 52,841  |
| 3     | +000          | 70                  | 10    | 40          | 62.5  | 57,462               | 58,177  | 54,617                       | 53,985  |
| 4     | ++00          | 70                  | 30    | 40          | 62.5  | 58,263               | 57,762  | 55,624                       | 55,225  |
| 5     | 00--          | 50                  | 20    | 30          | 25    | 53,406               | 52,401  | 59,895                       | 55,895  |
| 6     | 00++          | 50                  | 20    | 30          | 100   | 42,703               | 42,824  | 28,908                       | 29,664  |
| 7     | 00+-          | 50                  | 20    | 50          | 25    | 52,451               | 50,916  | 51,235                       | 48,658  |
| 8     | 00++          | 50                  | 20    | 40          | 100   | 41,133               | 40,725  | 29,184                       | 31,363  |
| 9     | -00-          | 30                  | 20    | 40          | 25    | 43,713               | 45,020  | 48,873                       | 49,392  |
| 10    | -00+          | 30                  | 20    | 40          | 100   | 41,201               | 40,529  | 29,302                       | 26,292  |
| 11    | +00-          | 70                  | 20    | 40          | 25    | 52,314               | 51,677  | 46,039                       | 48,843  |
| 12    | +00+          | 70                  | 20    | 40          | 100   | 39,017               | 36,400  | 29,144                       | 28,419  |
| 13    | 0--0          | 50                  | 10    | 30          | 62.5  | 63,505               | 61,769  | 58,564                       | 58,763  |
| 14    | 0+-0          | 50                  | 10    | 50          | 62.5  | 60,520               | 59,577  | 56,128                       | 56,330  |
| 15    | 0+-0          | 50                  | 30    | 30          | 62.5  | 61,685               | 61,318  | 59,151                       | 58,744  |
| 16    | 0++0          | 50                  | 30    | 50          | 62.5  | 59,500               | 59,926  | 56,044                       | 55,639  |
| 17    | -0-0          | 30                  | 20    | 30          | 62.5  | 54,913               | 56,248  | 51,594                       | 54,857  |
| 18    | -0+0          | 30                  | 20    | 50          | 62.5  | 52,365               | 53,437  | 51,342                       | 53,179  |
| 19    | +0-0          | 70                  | 20    | 30          | 62.5  | 54,841               | 56,493  | 56,548                       | 56,737  |
| 20    | +0+0          | 70                  | 20    | 50          | 62.5  | 54,331               | 55,719  | 54,113                       | 52,877  |
| 21    | 0-0-          | 50                  | 10    | 40          | 25    | 52,177               | 53,189  | 51,235                       | 52,675  |
| 22    | 0-0+          | 50                  | 10    | 40          | 100   | 42,157               | 44,022  | 29,853                       | 30,066  |
| 23    | 0+0-          | 50                  | 30    | 40          | 25    | 52,997               | 53,855  | 49,660                       | 51,473  |
| 24    | 0+0+          | 50                  | 30    | 40          | 100   | 41,543               | 43,254  | 29,971                       | 30,557  |
| 25    | 0000          | 50                  | 20    | 40          | 62.5  | 66,490               | 66,053  | 59,487                       | 59,935  |
| 26    | 0000          | 50                  | 20    | 40          | 62.5  | 66,126               | 66,053  | 60,495                       | 59,935  |
| 27    | 0000          | 50                  | 20    | 40          | 62.5  | 65,544               | 66,053  | 59,823                       | 59,935  |

Chan *et al.* (2009) ont aussi confirmé l'effet des paramètres temps, température et concentration en solvant sur le taux des composés phénoliques extraits à partir des pellicules de combava (*Citrus hystrix*) en utilisant la MSR.

Les résultats des valeurs expérimentales et prédites sont fortement proches, le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites (**figure 12A et 12B**) montre que les valeurs des modèles concordent avec les réponses mesurées, les valeurs des PT et de piégeage du radical DPPH font partie de l'intervalle de confiance.



**Figure 12:** Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites en PT (A), et de piégeage du radical DPPH (B).

### 4.2.2. Analyse de la variance

Les résultats de l'analyse de la variance du modèle du plan Box-Behnenken (BBD) sont illustrés dans les **tableaux V et VI**.

#### 4.2.2.1. Modèle globale et manque d'ajustement

Afin de vérifier si le modèle était statistiquement significatif, le rapport (F) entre le carré moyen de la régression du modèle (M) et le carré moyen résiduel (R) a été utilisé comme référence. Plus la valeur de F est élevée par rapport à l'unité, plus elle explique la variation des données autour de leur moyenne, et plus les effets estimés des facteurs sont réels. La valeur du rapport F (M/R) explique de façon adéquate la variation des données autour de leur valeur moyenne, en plus, elle atteste l'effet significatif principal. De même, le rapport F (DA/EP) entre le carré moyen dû au défaut d'ajustement (DA) et le carré moyen dû à l'erreur pure (EP) est utilisé pour évaluer l'ajustement du modèle par rapport aux observations. Des valeurs élevées du rapport F(DA/EP) indiquent un manque d'ajustement du modèle (Ammar *et al.*, 2010).

L'analyse de la variance de la régression du modèle (**Tableau V et VI**) a montré que le modèle est très significatif pour les deux réponses ( $p < 0,05$ ) par rapport à l'erreur pure qui n'est pas significative, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant.

Dans un modèle, si la valeur de P du manque d'ajustement est significative ce modèle sera rejeté (**Wang et Wang, 2005**).

**Tableau V:** Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour les PT

| Source              | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen (CM) | Rapport F (M/R) | Prob. > F |
|---------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------|
| Modèle (M)          | 14                | 1778,3603        | 127,026          | 38,5754         | <0,001*   |
| Résiduel (R)        | 12                | 39,5150          | 3,293            |                 |           |
| Défaut d'ajustement | 10                | 39,059632        | 3,90596          | 17,1548         | 0,0563    |
| Erreur pure (EP)    | 2                 | 0,455379         | 0,22769          |                 |           |
| R2                  | 0,978263          |                  |                  |                 |           |
| R2 carré ajusté     | 0,952903          |                  |                  |                 |           |

**Tableau VI:** Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour l'AA

| Source                   | Degrés de liberté | Somme des carrés | Carré moyen (CM) | Rapport F (M/R) | Prob. > F |
|--------------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------|
| Modèle (M)               | 14                | 3240,2031        | 231,443          | 58,5171         | <0,001*   |
| Résiduel (R)             | 12                | 47,4617          | 3,955            |                 |           |
| Défaut d'ajustement (DA) | 10                | 46,934803        | 4,69348          | 17,8172         | 0,0543    |
| Erreur pure (EP)         | 2                 | 0,526848         | 0,26342          |                 |           |
| R2                       | 0,985564          |                  |                  |                 |           |
| R2 carré ajusté          | 0,968721          |                  |                  |                 |           |

### 4.2.2.2. Coefficient de détermination $R^2$

Les coefficients de régression de la surface de réponse ont été utilisés pour étudier l'impact des variables sur l'extraction des composés phénoliques totaux et leur capacité antioxydante totale (Uma *et al.*, 2010).

Le facteur de détermination ( $R^2$ ) nous renseigne sur la qualité du modèle. Les valeurs de  $R^2$  de l'ordre de 97,82% et 98,55% nous indiquent qu'il y a une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites du modèle pour les PT ainsi que le piégeage du radical DPPH et elles impliquent aussi que de la réponse est expliquée par le modèle.

Selon Meziant *et al.*, (2014), l'analyse de la variance permet de calculer un paramètre statistique très utile qui est le coefficient de détermination  $R^2$  (efficacité d'ajustement globale). Ce dernier nous renseigne sur la qualité du modèle utilisé. Si cette grandeur se rapproche de 1 cela veut dire que le modèle exprime une forte puissance d'explication, et s'il se rapproche de 0 cela indique qu'il présente une faible puissance d'explication (Meziant *et al.*, 2014).

Les résultats de l'analyse de la variance (tableau V et VI) pour l'effet des facteurs sur le taux de PT ainsi que le piégeage du radical DPPH indiquent que les deux modèles de réponse sont hautement significatifs ( $p < 0,05$ ) avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,97$  pour les PT et  $R^2 = 0,98$  pour le piégeage du radical DPPH, ce qui signifie que 3 et 2% des variations ne sont pas expliquées par le modèle (cela pourrait s'expliquer par des erreurs de manipulation ou par la pureté du solvant utilisé) et une valeur de  $R^2_{ajusté}$  de 0,95 et 0,96 pour les deux réponses étudiées du modèle. Cependant, le  $R^2_{ajusté}$  est proche de la valeur de  $R^2$  ce qui affirme la significativité du modèle, et que les valeurs expérimentales sont fortement expliquées par les valeurs prédites.

D'après Chan *et al.* (2009), le  $R^2_{ajusté}$  est une valeur corrigée de  $R^2$  après l'élimination des termes du modèle non significatifs.

### 4.2.3. Effet des facteurs

Dans l'analyse statistique, les valeurs p ont été utilisées comme outil pour vérifier la signification de chaque coefficient et indiquer également la force d'interaction de chaque paramètre. Plus les valeurs p sont faibles, plus le coefficient correspondant est significatif (Liu *et al.*, 2010).

Les effets des facteurs dans les modèles mathématiques des surfaces de réponses des teneurs en PT et le piégeage du radical DPPH incluent les effets linéaires, d'interactions et les effets quadratiques des différents facteurs.

Les effets des quatre facteurs étudiés (Gradient de solvant ( $X_1$ ), Temps ( $X_2$ ), Température ( $X_3$ ) et le Ratio S/L( $X_4$ ) ainsi que leurs interactions sur les réponses d'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH sont exprimés dans le **tableau VII** suivant :

**Tableau VII:** Analyse de la variance pour l'effet des facteurs sur les PPT et AA en utilisant le BBD de la surface de réponse.

| TERME                              | Estimation | Erreur standard | Ration | Prob.> t |
|------------------------------------|------------|-----------------|--------|----------|
| <b>Composés phénoliques</b>        |            |                 |        |          |
| <b>Constante</b>                   | 66,053333  | 1,047683        | 63,05  | <0,001*  |
| <b>Effet linéaire</b>              |            |                 |        |          |
| Gradient solvant: (30,70)          | 0,6319167  | 0,523841        | 1,21   | 0,2509   |
| Temps: (10,30)                     | -0,025333  | 0,523841        | -0,05  | 0,9622   |
| Température : (30,50)              | -0,896083  | 0,523841        | -1,71  | 0,1129   |
| Ratio(S/L) : (25,100)              | -4,942     | 0,523841        | -9,43  | <0,001*  |
| <b>Effet d'interaction</b>         |            |                 |        |          |
| Gradient de solvant *Temps         | -0,82      | 0,90732         | -0,20  | 0,8444   |
| Gradient solvant * Température     | 0,5095     | 0,90732         | 0,56   | 0,5848   |
| Temps * Température                | 0,2        | 0,90732         | 0,22   | 0,8292   |
| Gradient solvant * Ratio(S/L)      | -2,69625   | 0,90732         | -2,97  | 0,0117*  |
| Temps * Ratio(S/L)                 | -0,3585    | 0,90732         | -0,40  | 0,6997   |
| Température * Ratio(S/L)           | -0,15375   | 0,90732         | -0,17  | 0,8683   |
| <b>Effet quadratique</b>           |            |                 |        |          |
| Gradient solvant* Gradient solvant | -6,944625  | 0,785762        | -8,84  | <0,001*  |
| Temps * Temps                      | -1,771     | 0,785762        | -2,25  | 0,0437*  |
| Température * Température          | -3,634625  | 0,785762        | -4,63  | 0,0006*  |
| Ratio(S/L) * Ratio(S/L)            | -15,70225  | 0,785762        | -19,98 | <0,001*  |

## *Résultats et discussion*

| <b>Activité antioxydante</b>        |           |          |        |         |
|-------------------------------------|-----------|----------|--------|---------|
| <b>Constante</b>                    | 59,935    | 1,43716  | 42,40  | <0,001* |
| <b>Effet linéaire</b>               |           |          |        |         |
| Gradient solvant : (30,70)          | 0,3944167 | 0,706858 | 0,56   | 0,5871  |
| Temps : (10,30)                     | -0,1775   | 0,706858 | -0,25  | 0,8060  |
| Température : (30,50)               | -1,3845   | 0,706858 | -1,96  | 0,0738  |
| Ratio(S/L) : (25,100)               | -10,88125 | 0,706858 | -15,39 | 0,001*  |
| <b>Effet d'interaction</b>          |           |          |        |         |
| Gradient solvant * Temps            | 0,7975    | 0,994376 | 0,65   | 0,5271  |
| Gradient solvant * Température      | -0,54575  | 0,994376 | -0,45  | 0,6637  |
| Temps * Température                 | -0,16775  | 0,994376 | -0,14  | 0,8933  |
| Gradient solvant * Ratio(S/L)       | 0,669     | 0,994376 | 0,55   | 0,5948  |
| Temps * Ratio(S/L)                  | 0,42325   | 0,994376 | 0,35   | 0,7356  |
| Température * Ratio(S/L)            | 2,234     | 0,994376 | 1,82   | 0,0930  |
| <b>Effet quadratique</b>            |           |          |        |         |
| Gradient solvant * Gradient solvant | -4,340583 | 0,861155 | -4,09  | 0,0015* |
| Temps * Temps                       | -1,384208 | 0,861155 | -1,31  | 0,2162  |
| Température * Température           | -1,181958 | 0,861155 | -1,11  | 0,2868  |
| Ratio(S/L)* Ratio(S/L)              | -17,35783 | 0,861155 | -16,37 | <0,001* |

### 4.2.3.1. Effet linéaire

Les résultats du plan BBD de la MSR montrent que le facteur qui influence significativement sur l'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH est seulement le Ratio solide/liquide ( $X_4$ ) avec une probabilité de l'ordre de  $p < 0,001$  pour les deux réponses étudiées. Cependant, les autres facteurs à savoir le gradient de solvant ( $X_1$ ), le temps ( $X_2$ ) et la température ( $X_3$ ) n'ont pas d'effet linéaire significatif sur l'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH sur les pellicules de raisin.

### 4.2.3.2. Effet quadratique

L'effet quadratique le plus prononcé pour les PT et le piégeage du radical DPPH est représenté par  $(X_4)^2$  (Ratio S/L\*Ratio S/L) ainsi que  $(X_1)^2$  (Gradient solvant\*Gradient solvant) et ils influent d'une manière significative sur l'extraction des PT avec des probabilités de l'ordre de  $p < 0,001$ , suivi de l'effet  $X_3X_3$  (Température\*Température) et de  $(X_2)^2$  (Temps\*Temps) avec des probabilités de l'ordre de  $p(0,0006)$  et  $p(0,0437)$ , respectivement. Par contre, pour le piégeage du radical DPPH l'effet quadratique le plus marqué est l'effet  $(X_4)^2$  avec une probabilité de l'ordre  $p < 0,001$  suivi de l'effet  $(X_1)^2$  avec une probabilité  $p(0,0015)$ , alors que les autres effets quadratiques  $(X_2)^2$  et  $(X_3)^2$  n'ont pas d'effet significatifs avec des probabilités de  $p(0,2162)$  et  $p(0,2868)$ , respectivement.

### 4.2.3.3. Effet d'interaction

Le seul effet d'interaction qui influe significativement sur l'extraction des PT est l'effet  $X_1X_4$  (Gradient solvant\*Ratio S/L) avec une probabilité de l'ordre de  $p(0,0117)$  par contre les autres interactions n'ont pas d'effet significatif sur l'extraction des PT à savoir  $X_1X_2$  (Gradient solvant\*Temps),  $X_1X_3$  (Gradient solvant\*Température),  $X_2X_3$  (Temps\*Température),  $X_2X_4$  (Temps\*Ratio S/L) et  $X_3X_4$  (Température\*Ratio S/L) avec des probabilités supérieures à 0,005 ( $p > 0,005$ ) (**tableau VII**).

Les effets d'interaction des quatre paramètres étudiés ont influencé négativement l'activité antioxydante. Les interactions  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ ,  $X_1X_4$ ,  $X_2X_4$  et  $X_3X_4$  ne sont pas significatives sur le piégeage du radical DPPH avec des probabilités supérieures à 0,005 ( $p > 0,005$ ) qui sont de l'ordre de  $p(0,5271)$ ,  $p(0,6637)$ ;  $p(0,8933)$ ;  $p(0,5948)$ ;  $p(0,7356)$  et  $p(0,0930)$  respectivement.

#### **4.2.4. Analyse du modèle mathématique**

Dans le but de réduire le nombre de paramètres à tester, plusieurs paramètres ont déjà été testés dans une gamme plus large avant l'optimisation par la MSR (**Bachir Bey et al., 2014**).

L'optimisation de l'extraction par ultrasons d'antioxydants à partir de la poudre des pellicules de raisin était basée sur la maximisation de l'extraction des PT et de piégeage du radical DPPH. Les coefficients de régression des termes linéaires quadratiques et d'interaction du modèle ont été calculés à l'aide de la technique des moindres carrés et qui sont représentés dans le **tableau VII**. Ces coefficients ont permis de voir que les quatre paramètres linéaires, et les quatre paramètres quadratiques et les paramètres d'interaction ( $X^2$ ) étaient significatifs pour certains paramètres et non significatifs pour d'autres.

D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des PT ainsi de piégeage du radical DPPH à partir de la poudre des pellicules de raisin rouge (variété Red Globe) étudiée sont alors bien connues. Le modèle mathématique quadratique ajusté de la réponse en PT et de piégeage du radical DPPH dans la présente étude est représenté par les équations  $Y_{PPT}$  et  $Y_{AA}$  pour les paramètres ayant un effet significatif ( $p < 0,005$ ) seulement.

##### **Pour les composés phénoliques**

$$Y_{PPT}: 66.053 - 4.942 X_4 - 2.696 X_1 X_4 - 6.944 X_1 X_1 - 1.771 X_2 X_2 - 3.634 X_3 X_3 - 15.702 X_4 X_4$$

##### **Pour de piégeage du radical DPPH**

$$Y_{AA} : 59.935 - 10.881 X_4 - 4.340 X_1 X_1 - 17.357 X_4 X_4$$

##### **Avec**

$Y_{PPT}$  : Rendement en polyphénols totaux (réponse)

$Y_{AA}$  : Rendement en activité antioxydante (réponse)

$X_1$  : Gradient de solvant

$X_2$  : Temps d'extraction

$X_3$  : température d'extraction

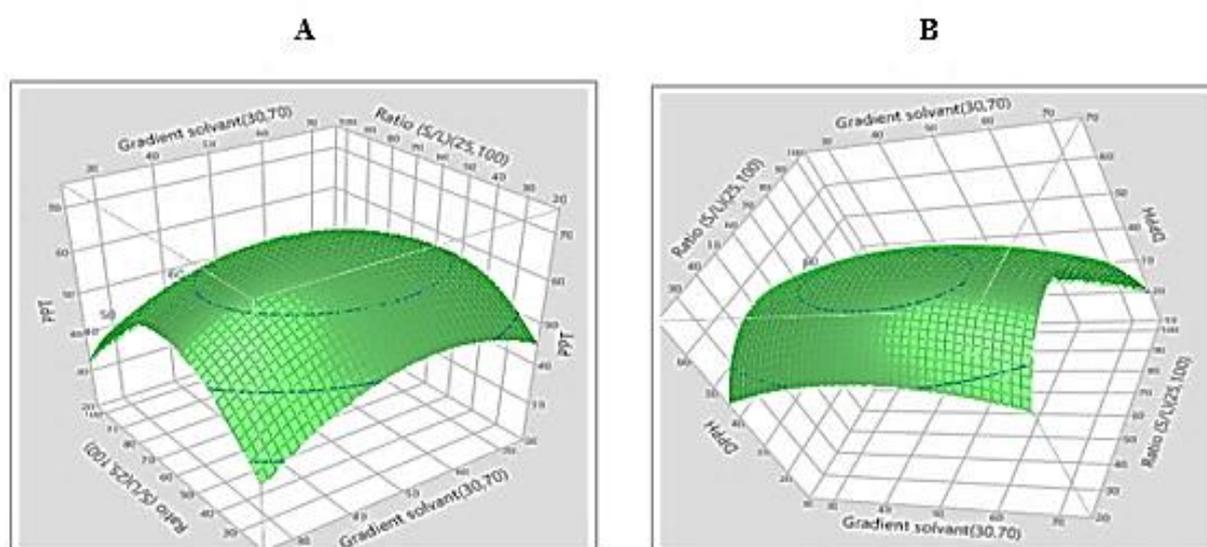
$X_4$  : Ratio (solide/liquide)

#### **4.2.5. Représentation spatiale et analyse des surfaces de réponses**

D'après **Meziant et al., (2014)**, le principal avantage de la MSR est de réduire le nombre d'essais expérimentaux nécessaires pour évaluer plusieurs variables et leurs

interactions et la meilleure façon d'exprimer l'effet d'une variable indépendante sur l'extraction des PT et l'activité antioxydante était de générer des diagrammes de surface de réponse du modèle en faisant varier deux variables dans la plage expérimentale étudiée et en maintenant l'autre variable à son niveau central.

Dans un cette étude, l'interaction des quatre variables indépendantes, concentration du solvant, temps, température et ratio a été utilisée pour tracer les courbes de surfaces de réponses. Mais on s'est contenté de présenter une seule présentation spéciale pour chaque réponse en choisissant les deux paramètres qui influent significativement sur l'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH dans ce modèle qui sont le gradient en solvant et le ratio (S/L). Ces paramètres ont été choisi aussi car le seul effet d'interaction bien est l'effet  $X_1X_4$  (Gradient solvant\*Ratio S/L).



**Figure 13:** Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet du gradient du solvant et du ratio d'extraction (S/L) sur l'extraction de PT (A) et le piégeage du radical DPPH (B) des pellicules de raisin

Les figures 13A et 13B illustrent la représentation en trois dimensions des effets de la concentration du solvant et du ratio sur l'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH de la poudre de pellicules de raisin. L'effet de la concentration en solvant et du ratio montrent une forte influence sur la teneur en PT et sur le piégeage du radical DPPH. Le taux d'extraction des antioxydants augmente aussi avec l'augmentation de ces deux paramètres avec un maximum d'extraction à une concentration de 50,86% et un ratio de 53,33 mg/ 15ml. Au-delà, la teneur en composés phénoliques et de piégeage du radical DPPH diminuent. Concernant le ratio d'extraction et le gradient de solvant, les effets linéaire et quadratique sur

l'extraction des PT et le piégeage du radical DPPH sont significatifs. Par contre l'effet linéaire est significatif uniquement pour le paramètre ratio (S/L) sur les deux réponses.

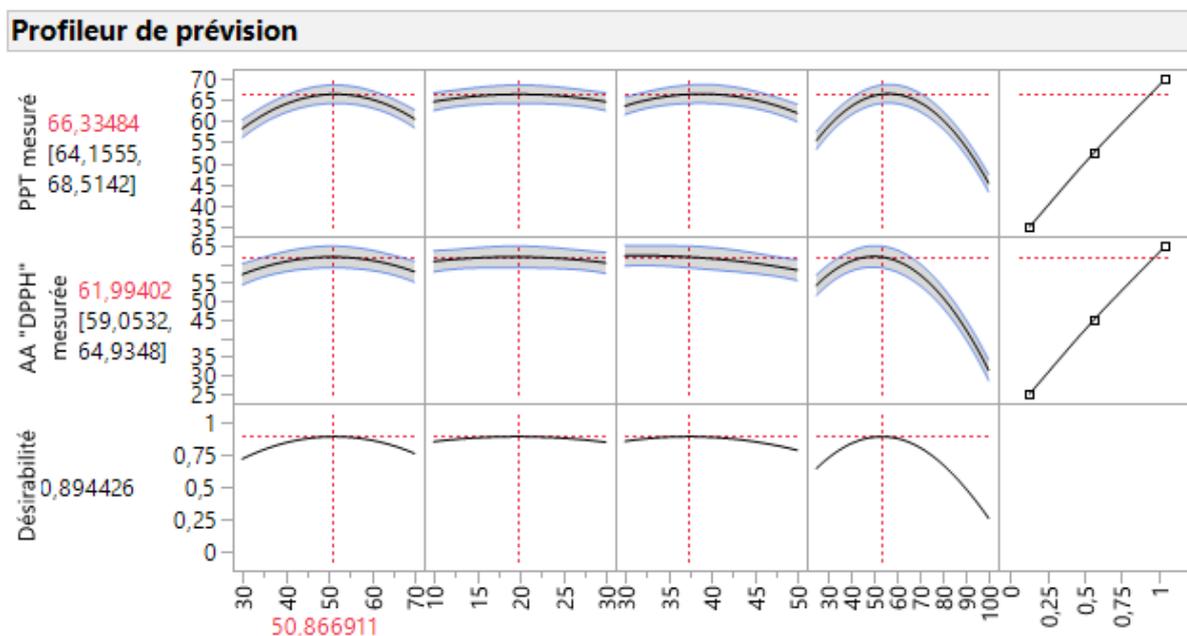
Selon **Luximon-Ramma et al. (2005)**, les mélanges acétone/eau sont les meilleurs solvants d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante. Le paramètre de la concentration en solvant est le plus utilisé pour l'extraction des antioxydants polaires et des composés phénoliques à partir de différentes matrices.

Le rapport solide/liquide entre l'échantillon et le solvant est l'une des variables les plus importantes dans le transfert de masse car un volume important de solvant affecte la procédure de diffusion (**Medina-Torres et al., 2017**).

**Brahmi et al. (2021)** ont montré qu'un rapport soluté/solvant plus élevé génère un gradient de concentration plus important sur la diffusion du solide dans la solution et un gonflement plus important de la matière végétale ce qui augmente la surface de contact entre le solide et le liquide.

#### 4.2.6. Etude de la désirabilité et détermination des conditions optimales

L'objectif de notre étude est de maximiser le rendement en PT ainsi que le piégeage du radical DPPH afin qu'il atteigne des valeurs maximales tout en garantissant un ratio (solide/liquide), un temps, une température et un solvant d'extraction minimaux. La **figure 14** indique que l'atteinte de valeurs de rendement maximales est possible avec une désirabilité de l'ordre de 89,44%.



**Figure 14:** Profil de prévision des conditions optimales de l'EAU des Pt et de piégeage du radical DPPH des écorces de raisin

Les niveaux estimés des conditions d'extraction optimales pour une réponse maximale des composés phénoliques totaux et de l'activités antioxydante des extraits de pellicule de raisin obtenus par extraction assistée par ultrasons sont résumés dans le **tableau VIII**. Les conditions d'extraction assistée par ultrasons prédites étaient un gradient de solvant de 50,86%, un temps d'extraction de 19,80 mn, une température de 37,37°C et finalement un ratio de 53,33 mg de matière végétale. Ces conditions ont permis d'obtenir le maximum de PT et de piégeage du radical DPPH de l'ordre de 66,33 mg EAG/g MS et 61,99 mg ET/g MS, respectivement.

**Tableau VIII:** Conditions et valeurs optimales pour l'extraction des PT et de piégeage du radical DPPH de la poudre des pellicules de raisin par la MSR.

| Paramètre optimisé       | Valeur optimale    |
|--------------------------|--------------------|
| Concentration du solvant | 50,86%             |
| Température d'extraction | 37,37°C            |
| Temps d'extraction       | 19,80 min          |
| Ratio (solide/liquide)   | 53,33 mg/15ml      |
| Composés phénoliques     | 66,334 mg EAG/g MS |
| Activité antioxydante    | 61,994 mg ET/g MS  |

### 4.2.7. La validation du modèle

Les valeurs  $R^2$  ajustées du modèle sont de l'ordre de 0,952 et 0,968 pour les PT et le piégeage du radical DPPH respectivement. Ceci signifie que le modèle a représenté de manière adéquate la relation réelle entre les paramètres choisis. Pour comparer les résultats prédits avec les valeurs expérimentales, un contrôle expérimental a été effectué pour chaque réponse en utilisant les conditions d'extraction optimales obtenues ci-dessus.

Les valeurs expérimentales étaient de 65,900 mg EAG/g MS et 59,07 mg ET/g MS pour les composés phénoliques et le piégeage du radical DPPH respectivement. Ces résultats expérimentaux étaient en accord avec les valeurs prédites qui étaient de 66,33 mg EAG/g MS pour les PT et 61,99 mg ET/g MS pour le piégeage du radical DPPH.

La bonne corrélation entre ces résultats a confirmé la validité du modèle de la MSR pour les deux réponses étudiées.

# CONCLUSION

### Conclusion

Les plantes ont été considérées depuis longtemps comme source essentielle de substances bioactives naturelles tels que les composés phénoliques. Actuellement, ces molécules attirent l'attention de nombreux chercheurs en raison de leurs bienfaits bénéfiques sur la santé humaine.

Notre étude s'est consacrée à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la poudre de pellicule de raisin (variété Red Globe) en utilisant l'extraction assistée par ultrasons (EAU) comme moyen d'extraction. L'optimisation a été réalisée tout d'abord par une étude préliminaire puis la méthodologie des surfaces de réponses (MSR) en appliquant le modèle Box et Behnken.

Une étude préliminaire a été effectuée afin d'évaluer l'effet de différents paramètres sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante de la pellicule de raisin à savoir le type de solvant (acétone, éthanol, méthanol et eau), la concentration en solvant (acétone 10, 30, 50, 70 et 90%), la température d'extraction (25, 30, 40, 45, et 50°C), le temps d'extraction (5, 10, 15, 20, 30, et 40 min) ainsi que le ratio solide/liquide (ratio : 25/15, 50/15, 100/15, 150/15, et 200 mg/15 ml) avec un degré de signification des données ( $p < 0,05$ ).

L'étude préliminaire nous a permis de déterminer les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante qui sont l'extraction avec l'acétone 50% à 35°C pendant 20 min avec un ratio de 50/15 (mg/ml). Ces conditions optimales ont permis d'obtenir des valeurs de 52,41±0,52 mg EAG/g MS (pour les PT), 1,81±0,08 mg EQ/g MS (pour les FT) 68,24±0,98 mg EC/g MS (pour les PAC), 52,44±0,42 mg ET/g MS (pour le piégeage du radical DPPH), 39,34±0,84 mg ET/g MS (pour le piégeage du radical ABTS) et enfin 33,38 ±0,56 mg EAA/g MS (pour le PR).

Après l'étude préliminaire, nous avons réalisé l'optimisation par la méthodologie des surfaces de réponses (MSR), en appliquant le modèle Box-Behnken pour étudier les effets de quatre variables indépendantes : la concentration en acétone (30 à 70%), le temps (10 à 30 min), la température (30 à 50°C) et le ratio solide/liquide (25 à 100%) sur deux réponses (PT et piégeage du radical DPPH). Les résultats montrent une bonne adéquation avec le modèle proposé ( $R^2 = 0,97$ ). La valeur de la probabilité pour le manque d'ajustement était insignifiante, ce qui a confirmé la validité des modèles. L'analyse des surfaces de réponses a montré que les paramètres d'extraction optimaux permettant d'optimiser l'extraction des

composés phénoliques et de l'activité antioxydante étaient 50,86% d'acétone, 19,80 min, 37,37°C, et 53,33 mg/15ml. Dans des conditions optimales, les valeurs expérimentales correspondantes pour les PT et piégeage du radical DPPH étaient de 66,334 mg EAG/ g de MS et de 61,994 mg ET/g MS respectivement. Les résultats expérimentaux correspondent à ceux prédits, ce qui témoigne de la pertinence du modèle et de la réussite de la MSR dans l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante à partir des pellicules de raisin.

En conclusion et à la lumière des résultats obtenus, il nous a permis de conclure que la pellicule de raisin rouge (variété Red Globe) est une bonne source de composés phénoliques et possède une bonne activité antioxydante. Ainsi, il est suggéré que la pellicule de raisin rouge (variété Red Globe) pourrait être utilisée comme source d'antioxydants naturels dans le domaine agroalimentaire et/pharmaceutique.

En perspectives et dans le but de compléter et d'améliorer ce travail, il serait intéressant de :

- Réaliser une analyse chromatographie (HPLC) afin d'identifier les composés phénoliques présents dans nos extraits.
- De valoriser la poudre de pellicule de raisin rouge (variété Red Globe) comme ingrédient dans la formulation de certains produits alimentaires comme le yaourt.
- D'étudier d'autres activités biologiques comme l'activité antibactérienne de nos extraits

Enfin, de réaliser des études *in vivo* pour voir l'effet de nos extraits à l'échelle cellulaire.

RÉFÉRENCE

BIBLIOGRAPHIQUE

## Référence bibliographique

- Alenazi M.M., Shafiq M., Alobeed R.S., Alsdon A.A., Abbasi N.A., Ali I., Mubushar M., Javed I. (2019) Application of abscisic acid at veraison improves red pigmentation and accumulation of dietary antioxidants in red table grapes cv. Red Globe at harvest. *Scientia Horticulturae* 257:108672.
- Ameer k. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their by products comprehensive reviews in food science and food safety:295-315.
- Ammar A.H., Zagrouba F., Romdhane M. (2010) Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a 24 complete factorial design. *Flavour and Fragrance journal* 25:503-507.
- Amor B.B. (2008) Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC), Université de La Rochelle.
- Ashraf M.A., Iqbal M., Rasheed R., Hussain I., Riaz M., Arif M.S. (2018) Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*:153-167.
- Aslan NEVZAT, C. Y. (2007). Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 90-97.
- Bachir Bey M., Meziat L., Benchikh Y., Louaileche H. (2014) Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dried dark fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity.
- Bellumori M., Innocenti M., Binello A., Boffa L., Mulinacci N., Cravotto G. (2016) Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound-and microwave-assisted extraction procedures. *Comptes Rendus. Chimie* 19:699-706.
- Ben Amor, B. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). La Rochelle.
- Biniari K., Xenaki M., Daskalakis I., Rusjan D., Bouza D., Stavrakaki M. (2020) Polyphenolic compounds and antioxidants of skin and berry grapes of Greek *Vitis vinifera* cultivars in relation to climate conditions. *Food chemistry* 307:125518.

- Bonilla, F. M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 209-215.
- Bouby L. (2001) *La vigne et les débuts de la viticulture en France: apports de l'archéobotanique*. Gallia:13-28.
- Brahmi F., Merchiche F., Mokhtari S., Smail L., Guemghar-Haddadi H., Yalaoui-Guellal D., Achat S., Fahmi Elsebai M., Madani K., Boulekbache L. (2021) Optimization of some extraction parameters of phenolic content from apple peels and grape seeds and enrichment of yogurt by their powders: A comparative study. *Journal of Food Processing and Preservation* 45:e15126.
- Călinescu I. (2021) A new reactor for process intensification involving the simultaneous application of adjustable ultrasound and microwave radiation. *Ultrasonics sonochemistry*:105701.
- Candrawinata V.I., Golding J.B., Roach P.D., Stathopoulos C.E. (2015) Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts. *CyTA- Journal of Food* 13:293-299.
- Carreira-Casais A., Otero P., Garcia-Perez P., Garcia-Oliveira P., Pereira A.G., Carpena M., Soria-Lopez A., Simal-Gandara J., Prieto M.A. (2021) Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. *International journal of environmental research and public health* 18:9153.
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso, Sergio, García-Romero, Esteban, Hermosín-Gutiérrez, Isidro. (2010) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*:699-705.
- Chaalal M., Touati N., Louaileche H. (2012) Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta botanica gallica* 159:467-475.
- Chan S., Lee C., Yap C., Wan Aida W., Ho C. (2009) Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16:203-213.
- Chastang T. (2014) Etude de la synthèse du resvératrol et de ses dérivés (viniférines) par des suspensions de cellules de vigne et optimisation de la production en bioréacteur, Châtenay-Malabry, Ecole centrale de Paris.

- Chavan Y., Singhal R.S. (2013) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17:106-113.
- Chedea V.S., Pop R.M. (2019) Total polyphenols content and antioxidant DPPH assays on biological samples, *Polyphenols in plants*, Elsevier. pp. 169-183.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.-S., Abert-Vian M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry* 34:540-560.
- Chen R., Jin C., Tong Z., Lu J., Tan L., Tian L., Chang Q. (2016) Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydrate Polymers* 136:187-197.
- Cheyrier V. (2005) polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*:223S-229S.
- Chira K., Suh J.-H., Saucier C., Teissèdre P.-L. (2008) Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 6:75-82.
- Chong J., Poutaraud A., Huguency P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant science* 177:143-155.
- Chuo S.C., Nasir, H. M., Mohd-Setapar, S. H., Mohamed, S. F., Ahmad, A., Wani, W. A., ... Alarifi, A. (2020) A Glimpse into the Extraction Methods of Active Compounds from Plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*:667–696.
- Conde C., Silva, Paulo, Fontes, Natacha, Dias, Alberto Carlos Pires Tavares, Rui M Sousa, Maria João Agasse, Alice Delrot, Serge Gerós, Hernâni. (2007), Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality.
- Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:85-91.
- Ćurko N., Kelšin K., Režek Jambrak A., Tomašević M., Gracin L., Poturica V., Ružman E., Kovačević Ganić K. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition,

chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croatian journal of food science and technology* 9:136-144.

- Dahmoune F., Boulekbache L., Moussi K., Aoun O., Spigno G., Madani K. (2013) Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products* 50:77-87.
- Das, S. S. (2017). Box-Behnken statistical design to optimize preparation of activated carbon from *Limonia acidissima* shell with desirability approach. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 588-600.
- Di Pietro Fernandes C. (2023) Nutraceutical Potential of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil in Oxidative Stress, Inflammation, Obesity and Metabolic Alterations. *Molecules*:7811.
- Dias A.L.B., de Aguiar A.C., Rostagno M.A. (2021) Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics sonochemistry* 74:105584.
- Dong, C.-H. (2009). Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food and bioproducts processing*, 139-144.
- Drużyńska B., Stępniewska A., Wołosiak R. (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6:27-36.
- Dzah C.S., Duan Y., Zhang H., Wen C., Zhang J., Chen G., Ma H. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food bioscience* 35:100547.
- Escudier J.-L., Payraud R., Brienza E., Moreau S., Guyot P., Samson A., Mikolajczak M., Bouissou D., Veyret M., Caillé S. (2016) New vineyard fields: Grape Juice. Selection of grapevine species, juice making, stabilization/Nouvelle filière: jus de raisin. Sélection des cépages, élaboration, stabilisation, BIO Web of Conferences, EDP Sciences. pp. 01001.
- Eskilsson C.S., Björklund E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 902:227-250.

- Fabiano-Tixier A.-S., Rombaut Natacha, Jacottet-Navarro M, Bily Antoinen, Chemat, Farid. (2016) Éco-extraction du végétal intensifiée par ultrasons. *La Sonochimie*:31-35.
- Fadil M., Farah A., Ihssane B., Haloui T., Rachiq S. (2015) Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology. *J. Mater. Environ. Sci* 6:2346-2357.
- Ferradji A., Goudjal Y., Malek A. (2008) Séchage du raisin de variété Sultanine par un séchoir solaire à convection forcée et un séchoir de type coquillage. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS* 8:177-185.
- FODIL O. (1989) Les cépages autochtones en Algérie.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2010) Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15:8813-8826.
- Garrido J., Fernanda. (2013) Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food research international*:1844-1858.
- Geana E.I., Dinca O.R., Ionete R.E., Artem V., Niculescu V.C. (2015) Određivanje trans-veratrola u pokožici grožđa tijekom sazrijevanja iu vinu pomoću metode HPLC. *Food Technology and Biotechnology* 53:73-80.
- Ghafoor K., Choi Y.H., Jeon J.Y., Jo I.H. (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:4988-4994.
- Ghafoor K., Choi Y.H., Jeon J.Y., Jo I.H. (2009) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:4988-4994.
- Ghitescu R.-E., Volf I., Carausu C., Bühlmann A.-M., Gilca I.A., Popa V.I. (2015) Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics sonochemistry* 22:535-541.
- González-M G., Usaquén-C X., Martínez-R M., Aya-Baquero H. (2006) Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis Vinifera*) Residues, 13th World Congress of Food Science & Technology 2006. pp. 638-638.

- González-Manzano Susana R.-G.J.C., Santos-Buelga Celestino. (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica chimica acta*:283-289.
- Guerrero R.F., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gil-Izquierdo Á., García-Barroso C., Cantos-Villar E. (2009) Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food chemistry* 112:949-955.
- Guessaibia N., Debib A., Tir-Touil A., Meddah B., Saidi F., Benrima-Guendouz A. (2019) Antibacterial activity of Algerian sun-dried raisins extracts against isolates of extended-spectrum beta-lactamase ESBL-producing Enterobacteriaceae.
- Guo C. (2014) Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Journal of experimental botany*:1513-1528.
- Hanco V., Poilâne C., Chen J. (2011) Composite lin/époxy: optimisation par plan d'expériences, 17èmes Journées Nationales sur les Composites (JNC17). pp. 50.
- Hemwimol S., Pavasant P., Shotipruk A. (2006) Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics sonochemistry* 13:543-548.
- Herpin J.-C. (1889) *La vigne et le raisin: histoire botanique et chimique* Baillière.
- Hollecker L., Pinna M., Filippino G., Scrugli S., Pinna B., Argiolas F., Murru M. (2009) Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography–electron spray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216:3402-3408.
- Jiménez J.P. (2008) Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*:646-653.
- K. Nagendra Prasad, F. A. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 1121-1127.
- Kennedy J. (2002) Understanding grape berry development. *Practical winery & vineyard*:1-5.
- Kgang Itumeleng E K.A., I Husselmann Lizex, Nkomo Andrew Mathabe Patricia MK, Belay Zinash A, Caleb Oluwafemi James. (2023) Bioassays and proteomics as early detection

tools in postharvest management of table grapes (*Vitis vinifera* L.) diseases—A Review. *Food Bioscience*:102645.

Khouni S., Laiadi Z., Bertazzon N., Angelini E., Migliaro D. (2023) Preservation and sanitary status of Algerian grapevine germplasm: Management and improvement. *South African Journal of Botany* 153:346-356.

Kiselev K., Grigorchuk V., Ogneva Z., Suprun A., Dubrovina A. (2019) The effect of ultraviolet-C and precursor feeding on stilbene biosynthesis in spruce *Picea jezoensis*. *Journal of plant physiology* 234:133-137.

Lee J., Torosyan N., Silverman D.H. (2017) Examining the impact of grape consumption on brain metabolism and cognitive function in patients with mild decline in cognition: a double-blinded placebo controlled pilot study. *Experimental gerontology* 87:121-128.

Levadoux L., Benabderrabou A., Douaouri B. (1971) *Ampelographie algerienne; cepages de cuve et de table cultives en Algerie.*

Liu Q., Yang X., Zhang L., Majetich G. (2010) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research* 4:2503-2511.

Liu, Q. Y. (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2503-2511.

Luque-Garcia J., De Castro M.L. (2003) Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22:41-47.

Lutz M., Jorquera K., Cancino B., Ruby R., Henriquez C. (2011) Phenolics and antioxidant capacity of table grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars grown in Chile. *Journal of food science* 76:C1088-C1093.

Luximon-Ramma A., Baborun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T., Aruoma O.I. (2005) Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food research international* 38:357-367.

Majeed U. (2023) Grape (*Vitis vinifera* L.) phytochemicals and their biochemical protective mechanisms against leading pathologies. *Food Chemistry*:134762.

- Mané C., Souquet J., Ollé D., Verries C., Veran F., Mazerolles G., Cheynier V., Fulcrand H. (2007) Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 55:7224-7233.
- Maran, J. P. (2013). Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 604-611.
- Marti-Mestres G., Laget J., Maillols H., Fernandez C. (1998) Solubilisation de filtres-UV dans des melanges ternaires de phases apolaires, optimisation par l'utilisation de reseaux centres. *International journal of cosmetic science* 20:19-30.
- Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N. (2017) Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy* 7:47.
- Medouni-Adrar S., Boulekbache-Makhlouf L., Cadot Y., Medouni-Haroune L., Dahmoune F., Makhoukhe A., Madani K. (2015) Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Industrial Crops and Products* 77:123-132.
- Megateli m.e. (2023) caractérisation pomologique, physico-chimique et biochimique du raisins et jus extraits de quelques cépages de vigne cultivés dans la région de tipaza, algérie. *Agrobiologia*:3606-3629.
- Meziant L., Benchikh Y., Louaileche H. (2014) Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food chemistry* 162:277-282.
- Migicovsky Z. (2017) Patterns of genomic and phenomic diversity in wine and table grapes. *Horticulture research*:17035.
- Milella R.A., Basile T., Alba V., Gasparro M., Giannandrea M.A., Debiase G., Genghi R., Antonacci D. (2019) Optimized ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape (*Vitis vinifera* L.) skin using response surface methodology. *Journal of food science and technology* 56:4417-4428.
- Min K., Ebeler S.E. (2008) Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology* 46:96-104.

- Mitić M.N., Souquet J.-M., Obradović M.V., Mitić S.S. (2012) Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. *Food Science and Biotechnology* 21:1619-1626.
- Munoz S., Mestres M., Busto O., Guasch J. (2008) Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica chimica acta* 628:104-110.
- Naczek M., Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41:1523-1542.
- Novak I., Janeiro P., Seruga M., Oliveira-Brett A.M. (2008) Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta* 630:107-115.
- Ojeil A., El Darra N., El Hajj Y., Mouncef P.B., Rizk T.J., Maroun R.G. (2010) Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château KSARA. *Lebanese Science Journal* 11:117-131.
- Opipari Jr A.W. (2004) Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer research*:696-703.
- Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* 5:e47.
- Petigny L. (2013) Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *international journal of molecular sciences*:5750-5764.
- Piñeiro Z., Palma M., Barroso C. (2006) Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1110:61-65.
- Pingret D., Fabiano-Tixier A.-S., Le Bourvellec C., Renard C.M., Chemat F. (2012) Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering* 111:73-81.
- Prasad K.N., Hassan F.A., Yang B., Kong K.W., Ramanan R.N., Azlan A., Ismail A. (2011) Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant

capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food chemistry* 128:1121-1127.

- Ragonese R., Macka M., Hughes J., Petocz P. (2002) The use of the Box–Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 27:995-1007.
- Rahali M., Migliaro D., Laiadi Z., Bertazzon N., Angelini E., Crespan M. (2019) Genetic identification, origin and sanitary status of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) grown in Babar, Algeria. *Vitis* 58:153-158.
- Ranjha M.M.A., Irfan S., Lorenzo J.M., Shafique B., Kanwal R., Pateiro M., Arshad R.N., Wang L., Nayik G.A., Roobab U. (2021) Sonication, a potential technique for extraction of phytoconstituents: A systematic review. *Processes* 9:1406.
- Rasines-Perea Z., Teissedre, Pierre-Louis. (2017) Grape polyphenols' effects in human cardiovascular diseases and diabetes. *Molecules*:68.
- Renaud J. (2011) Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol sur des neurones dopaminergiques en culture.
- Reynier A. (1986) *Manuel de viticulture* Ed. 4eme Tec et Doc-Lavoisier, Paris. Ed. 4eme Tec et Doc-Lavoisier, Paris ed.
- Reynier A. (2011a) *Manuel de viticulteur: guide technique de viticulteur* Lavoisier.
- Reynier A. (2011b) *Manuel de viticulture: guide technique du viticulteur* Lavoisier.
- Richter J. (2007) Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*:2207-2217.
- Santos L.G., Martins V.G. (2023) Optimization of the green extraction of polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: A comparative study with conventional extraction techniques. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 34:100458.
- Shen L., Pang S., Zhong M., Sun Y., Qayum A., Liu Y., Rashid A., Xu B., Liang Q., Ma H. (2023) A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive

components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics sonochemistry*:106646.

Silva V. (2018) Statistical approaches with emphasis on design of experiments applied to chemical processes BoD–Books on Demand.

Singanusong R., Nipornram S., Tochampa W., Rattanatraiwong P. (2015) Low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampuang) and lime (*Citrus aurantifolia*) peels and the antioxidant. *Food Analytical Methods* 8:1112-1123.

Singla M. (2021) Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics sonochemistry*:105506.

Soria A.C., Villamiel M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in food science & technology* 21:323-331.

Sripad, G. V. (1982). Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *Journal of Biosciences*, 145-152.

Stracke R. (2010) Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12-and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation. *New Phytologist*:985-1000.

Sun A.Y., Simonyi A., Sun G.Y. (2002) The “French Paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine* 32:314-318.

Uma D., Ho C., Wan Aida W. (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana* 39:119-128.

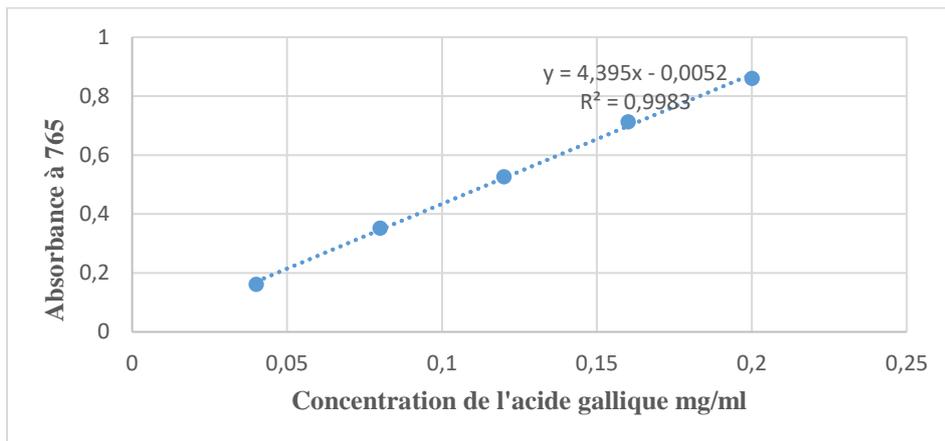
Urpi-Sarda M., Monagas M., Khan N., Lamuela-Raventos R.M., Santos-Buelga C., Sacanella E., Castell M., Permanyer J., Andres-Lacueva C. (2009) Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and bioanalytical chemistry* 394:1545-1556.

Wang W., Tang K., Yang H.-R., Wen P.-F., Zhang P., Wang H.-L., Huang W.-D. (2010) Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:142-152.

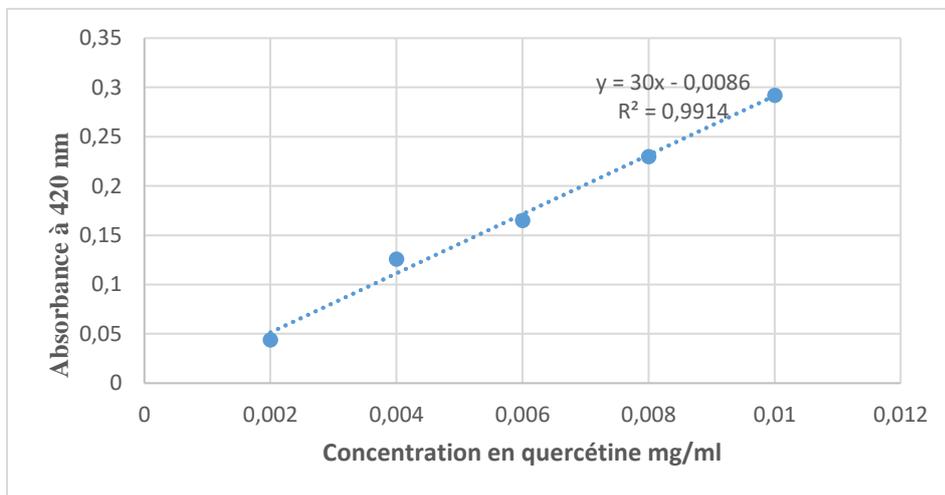
- Wu T.Y., Guo N., Teh C.Y., Hay J.X.W. (2012) Advances in ultrasound technology for environmental remediation Springer Science & Business Media.
- Xia E.-Q., Deng G.-F., Guo Y.-J., Li H.-B. (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences* 11:622-646.
- Xu Y., Burton S., Kim C., Sismour E. (2016) Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food science & nutrition* 4:125-133.
- Yadav M., Jain S., Bhardwaj A., Nagpal R., Puniya M., Tomar R., Singh V., Parkash O., Prasad G., Marotta F. (2009) Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *Journal of medicinal food* 12:473-484.
- Yang R.-F., Geng L.-L., Lu H.-Q., Fan X.-D. (2017) Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina baroni*. *Ultrasonics sonochemistry* 34:571-579.
- Zhang Y., Liu Y., Wang T., Li B., Li H., Wang Z., Yang B. (2006) Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and ionic mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications* 340:1192-1199.
- Zhou D.-D. (2022) Bioactive compounds, health benefits and food applications of grape. *foods*:2755.
- Zhou K., Raffoul J.J. (2012) Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of oncology* 2012.
- Киркилевич А. (2020) Vinification en France.

# ANNEXES

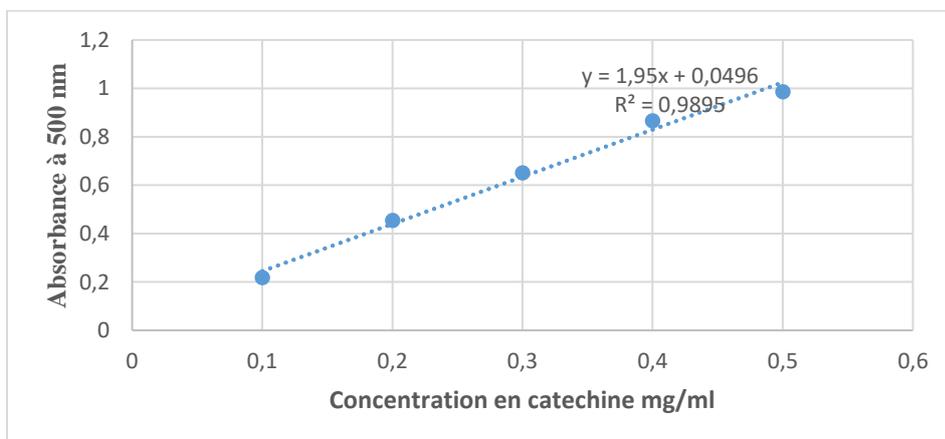
## Annexe I



**Figure N°01** : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

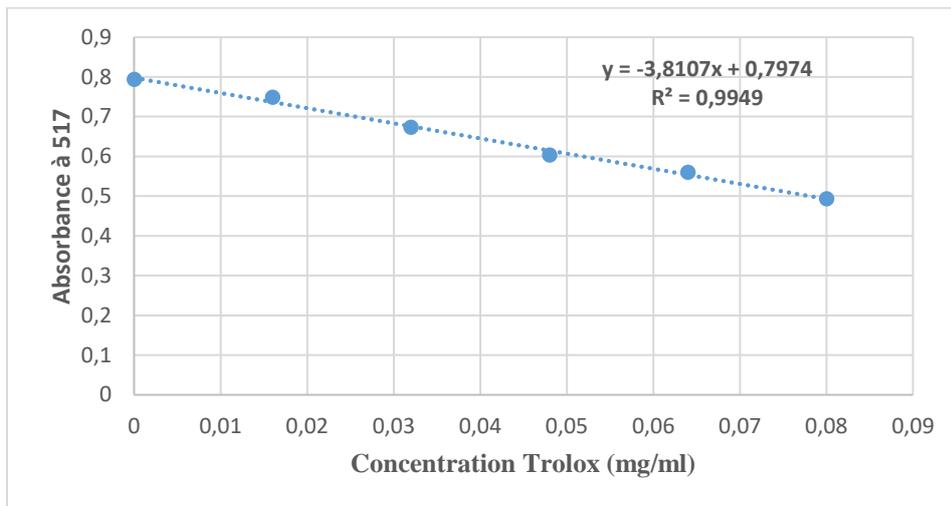


**Figure N°02** : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

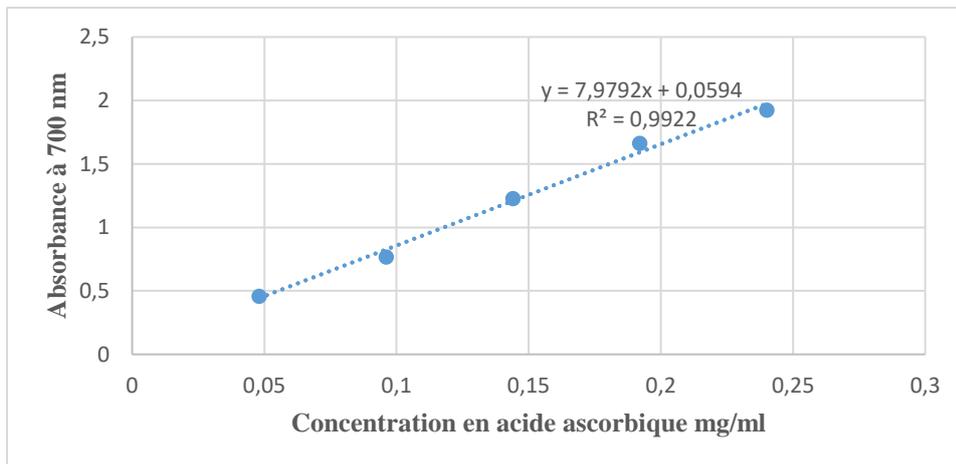


**Figure N°03** : Courbe d'étalonnage des Proanthocyanidines

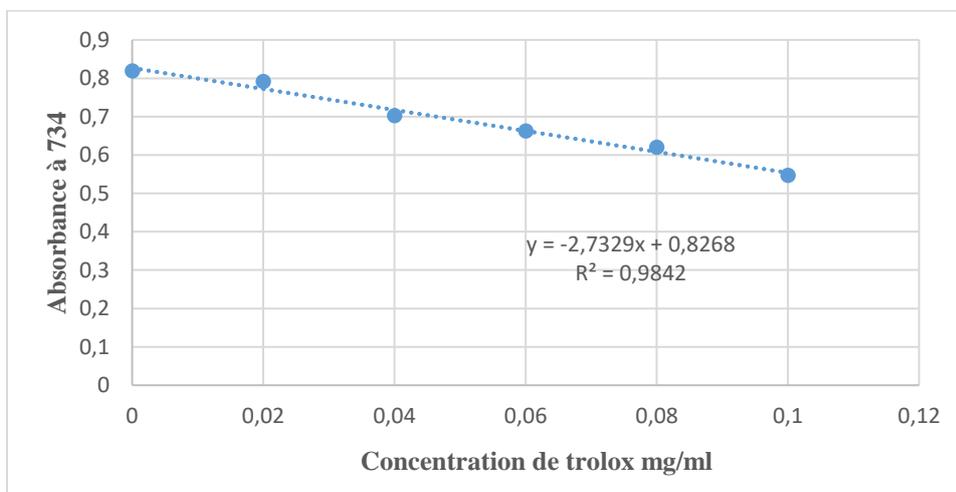
## Annexe II



**Figure N°04:** Courbe d'étalonnage de l'activité antioxydante DPPH



**Figure N°05 :** Courbe d'étalonnage du Pouvoir réducteur « FRAP »



**Figure N°06 :** Courbe d'étalonnage de l'ABTS

### Annexe III

**Tableau I:** Résultats des dosages des CP et des AA de l'étude préliminaire en mg/g MS

| <b>Dénomination</b>           | <b>PT</b><br>mgEAG/gMS | <b>FT</b><br>mgEQ/gMS | <b>PAC</b><br>mgEC/gMS | <b>DPPH</b><br>mgET/gMS | <b>PR</b><br>mgEAA/gMS | <b>ABTS</b><br>mgET/gMS |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Type de solvant</b>        |                        |                       |                        |                         |                        |                         |
| <b>Acétone 50%</b>            | 52,41±0,52             | 1,81±0,08             | 68,24±0,98             | 52,44±0,42              | 33,38±0,56             | 39,34±0,84              |
| <b>Ethanol 50%</b>            | 30,65±0,38             | 1,29±0,06             | 26,96±0,62             | 27,72±0,75              | 19,91±0,56             | 35,59±0,97              |
| <b>Méthanol 50%</b>           | 27,54±0,83             | 1,46±0,04             | 30,98±0,91             | 31,72±0,80              | 21,06±0,98             | 34,27±0,97              |
| <b>Eau</b>                    | 20,67±1,23             | 0,85±0,09             | 3,88±0,55              | 10,17±0,99              | 10,04±0,53             | 24,53±0,98              |
| <b>Gradient d'acétone%</b>    |                        |                       |                        |                         |                        |                         |
| <b>[10]</b>                   | 32,62±0,82             | 1,72±0,02             | 28,04±0,98             | 26,16±0,83              | 18,13±0,18             | 33,20±0,88              |
| <b>[30]</b>                   | 42,87±0,64             | 1,78±0,04             | 51,46±0,44             | 41,97±0,94              | 29,12±0,32             | 33,97±0,60              |
| <b>[50]</b>                   | 52,41±0,52             | 1,81±0,08             | 68,24±0,98             | 52,44±0,42              | 33,38±0,56             | 39,34±0,84              |
| <b>[70]</b>                   | 47,52±0,40             | 1,39±0,04             | 61,39±0,86             | 48,08±0,80              | 31,04±0,30             | 36,37±0,35              |
| <b>[90]</b>                   | 22,88±0,51             | 1,34±0,06             | 36,14±1,280.           | 36,05±0,16              | 18,16±0,32             | 13,66±0,93              |
| <b>Température (C°)</b>       |                        |                       |                        |                         |                        |                         |
| <b>25</b>                     | 45±0,77                | 1,43±0,04             | 59,14±0,67             | 49,26±0,33              | 18,65±0,28             | 35,8±0,93               |
| <b>30</b>                     | 48,5±1,06              | 1,44±0,05             | 62,75±1,33             | 49,65±0,38              | 19,42±0,74             | 35,91±0,68              |
| <b>35</b>                     | 52,41±0,52             | 1,81±0,08             | 68,24±0,98             | 52,44±0,42              | 33,38±0,56             | 39,34±0,84              |
| <b>40</b>                     | 51,3±0,48              | 1,8±0,07              | 64,16±1,10             | 50,40±0,73              | 33,23±0,28             | 38,2±0,81               |
| <b>45</b>                     | 51,15±0,72             | 1,64±0,03             | 64,19±1,37             | 49,31±0,53              | 33,18±0,49             | 36,42±0,65              |
| <b>50</b>                     | 48,85±0,71             | 1,62±0,08             | 63,52±0,81             | 48,38±0,54              | 32,54±0,62             | 35,84±0,69              |
| <b>Temps (min)</b>            |                        |                       |                        |                         |                        |                         |
| <b>5</b>                      | 48±0,26                | 1,53±0,04             | 52,83±0,88             | 49,80±0,53              | 32,65±0,55             | 26,03±0,63              |
| <b>10</b>                     | 48,6±0,57              | 1,56±0,03             | 56,93±0,77             | 50,09±0,38              | 32,9±0,38              | 27,9±0,45               |
| <b>15</b>                     | 49,9±0,44              | 1,61±0,05             | 60,86±1,05             | 50,26±0,77              | 33,1±0,27              | 28,78±0,81              |
| <b>20</b>                     | 52,41±0,52             | 1,81±0,08             | 68,24±0,98             | 52,44±0,42              | 33,38±0,56             | 39,34±0,84              |
| <b>30</b>                     | 47,93±0,71             | 1,6±0,04              | 61,57±0,78             | 50,38±0,34              | 32,09±0,59             | 29,91±0,94              |
| <b>40</b>                     | 47,6±0,79              | 1,55±0,08             | 61,14±0,70             | 50,18±0,72              | 31,87±0,97             | 23,76±0,33              |
| <b>Ratio (solide/liquide)</b> |                        |                       |                        |                         |                        |                         |
| <b>25</b>                     | 49,24±0,82             | 1,7±0,06              | 45,2±0,84              | 51,37±0,64              | 23,74±0,75             | 26,12±0,97              |
| <b>50</b>                     | 52,41±0,52             | 1,81±0,08             | 68,24±0,98             | 52,44±0,42              | 33,38±0,56             | 39,34±0,84              |
| <b>100</b>                    | 43,36±1,43             | 1,5±0,01              | 60,94±0,76             | 29,54±0,19              | 21,54±0,70             | 25,93±0,65              |
| <b>150</b>                    | 40,94±1,28             | 1,45±0,01             | 60,93±0,28             | 19,5±0,13               | 18,36±0,49             | 16,08±0,23              |
| <b>200</b>                    | 37,02±0,64             | 1,44±0,01             | 58,73±0,61             | 14,55±0,05              | 13,84±0,34             | 8,69±0,89               |



## Résumé

L'objectif de ce travail est l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante de la pellicule de raisin (variété Red Globe). Une étude préliminaire a été effectuée pour évaluer l'effet de différents paramètres à savoir le choix du solvant (acétone, méthanol, éthanol, et eau), la concentration en solvant (acétone 10, 30, 50, 70 et 90%), la température d'extraction (25, 30, 35, 40, 45 et 50°C), le temps d'extraction (5, 10, 15, 20, 30, et 40 min) ainsi que le ratio solide/liquide (25/15, 50/15, 100/15, 150/15, et 200/15 mg/ml) sur le rendement en composés phénoliques et l'activité antioxydante avec un degré de signification des données ( $p < 0,05$ ). Les conditions optimales trouvées étaient l'extraction avec l'acétone 50% à 35°C pendant 20 min avec un ratio de 50/15 (mg/ml). Ensuite, la méthodologie des surfaces de réponses (MSR), en appliquant le modèle Box-Behnken, a été utilisée pour étudier les effets de quatre variables indépendantes : la concentration en acétone (30 à 70%), le temps (10 à 30 min), la température (30 à 50°C) et le ratio solide/liquide (25 à 100 mg/15 ml) sur deux réponses (PT et piégeage du radical DPPH). Les résultats montrent une bonne adéquation avec le modèle proposé ( $R^2 = 0,97$ ). La valeur de la probabilité pour le manque d'ajustement était insignifiante, ce qui a confirmé la validité des modèles. L'analyse des surfaces de réponses a montré que les paramètres d'extraction optimaux permettant d'optimiser l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante étaient 50,86% d'acétone, 19,80 min, 37,37°C, et 53,33 mg/15ml. Dans des conditions optimales, les valeurs expérimentales correspondantes pour les PT et piégeage du radical DPPH étaient de 66,334 mg EAG/ g de MS et de 61,994 mg ET/g MS respectivement. Les résultats expérimentaux correspondent à ceux prédits, ce qui témoigne de la pertinence du modèle et de la réussite de la MSR dans l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante à partir des pellicules de raisin.

**Mot clefs :** pellicule de raisin, extraction, optimisation, composés phénoliques, activité antioxydante, méthodologie de surfaces de réponses, modèle Box-Benken.

## Abstract

The objective of this work is the optimization of the extraction of phenolic compounds and the antioxidant activity of grape skin (Red Globe variety). A preliminary study was carried out to evaluate the effect of different parameters namely the choice of solvent (acetone, methanol, ethanol, and water), the solvent concentration (acetone 10, 30, 50, 70 and 90%), the extraction temperature (25, 30, 35, 40, 45 and 50°C), the extraction time (5, 10, 15, 20, 30, and 40 min) as well as the solid/liquid ratio (25/15, 50/15, 100/15, 150/15, and 200/15 mg/ml) on the yield of phenolic compounds and the antioxidant activity with a degree of significance of the data ( $p < 0.05$ ). The optimal conditions found were extraction with 50% acetone at 35°C for 20 min with a ratio of 50/15 (mg/ml). Then, the response surface methodology (RSM), applying the Box-Behnken model, was used to study the effects of four independent variables: acetone concentration (30 to 70%), time (10 to 30 min), temperature (30 to 50°C) and solid/liquid ratio (25 to 100 mg/15ml) on two responses (TPC and DPPH radical scavenging). The results showed a good fit with the proposed model ( $R^2 = 0.97$ ). The probability value for lack of fit was insignificant, which confirmed the validity of the models. Response surface analysis showed that the optimal extraction parameters for optimizing the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity were 50.86% acetone, 19.80 min, 37.37°C, and 53.33 mg/15 ml. Under optimal conditions, the corresponding experimental values for TPC and DPPH radical scavenging were 66.334 mg EAG/g DM and 61.994 mg ET/g DM, respectively. The experimental results were consistent with those predicted, which demonstrates the relevance of the model and the success of RSM in optimizing the extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity from grape skins.

**Keywords:** grape skin, extraction, optimization, phenolic compounds, antioxidant activity, response surface methodology, Box-Benken model.