République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

 Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد– تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعة والحياة ،وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l’Univers

Département de biologie

**MÉMOIRE**

**Présenté par**

**Berraho meriem**

**Abdeldjellil sid ahmed**

***En vue de l’obtention du***

**Diplôme de MASTER**

**En biologie de la nutrition**

**Thème**

Méthodes d’extraction et de purification des polyphénols

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Soutenu le 30/06/2022 devant le jury composé | de : |  |
| Présidente: Mme MEDJDOUB AMEL | MCA | Université de d’oran1 |
| Encadrante: Mme MERZOUK Hafida | Professeur | Université de Tlemcen |
| Examinatrice:Mme MERZOUK Amel Zoubeyda | MCB | Université de Tlemcen |

**Année universitaire** 2021/2022

**العنوان: طرق استخلاص وتنقية البوليفينول**

**ملخص**

**كمستقلبات نباتية ثانوية ، تمثل مادة البوليفينول مجموعة كبيرة ومتنوعة من المواد الموجودة بكثرة في غالبية** الفواكه والأعشاب والخضروات. يؤدي الدور الوقائي للبوليفينول ضد الأكسجين التفاعلي وأنواع النيتروجين والأشعة فوق البنفسجية ومسببات الأمراض النباتية والآفات والحيوانات المفترسة إلى العديد من الأنشطة البيولوجية المفيدة التي تؤدي إلى الوقاية أو ربما حتى علاج العديد من الأمراض البشرية السائدة ، وخاصة أنواع مختلفة من السرطان. يعد الانتشار وخصوصية الاستجابة والغياب أو السمية المنخفضة من المزايا الحاسمة للبوليفينول كعوامل علاجية. في أطروحة الماجستير في علم الأحياء الغذائي ، يتم إجراء مراجعة ببليوغرافية على مادة البوليفينول وطرق الاستخراج المختلفة ، ويتم تسليط الضوء على استخراج السوائل فوق الحرج كبديل بيئي واعد يوفر فصلًا وحماية استثنائية.من تحلل البوليفينول غير المستقر.

الكلمات المفتاحية: **البوليفينول ، الاستخلاص ، مضادات الأكسدة ، السرطان ، التوافر البيولوجي ، التأثيرات التآزرية.**

**Titre : Méthodes d'extraction et de purification des polyphénols**

**Résumé**

En tant que métabolites végétaux secondaires, les polyphénols représentent un groupe important et diversifié de substances présentes en abondance dans la majorité des fruits, des herbes et des légumes. Le rôle protecteur des polyphénols contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, la lumière UV, les agents pathogènes des plantes, les parasites et les prédateurs se traduit par plusieurs activités biologiques bénéfiques donnant lieu à la prophylaxie ou peut-être même à la guérison de plusieurs maladies humaines prédominantes, en particulier divers types de cancer. L'omniprésence, la spécificité de la réponse et l'absence ou la faible toxicité sont des avantages cruciaux des polyphénols en tant qu'agents thérapeutiques. Dans ce mémoire de master en biologie de la nutrition, une revue bibliographique est réalisée sur les polyphénols et sur les différentes méthodes d'extraction, l'extraction par fluide supercritique étant mise en évidence comme une alternative écologique prometteuse offrant une séparation et une protection exceptionnelle contre la dégradation des polyphénols instables.

**Mots clés :** Polyphénols, extraction, antioxydants, cancer, biodisponibilité, effets synergiques.

**Title : Methods of extraction and purification of polyphenols**

**Abstract**

As secondary plant metabolites, polyphenols represent a large and diverse group of substances found in abundance in the majority of fruits, herbs and vegetables. The protective role of polyphenols against reactive oxygen and nitrogen species, UV light, plant pathogens, pests and predators results in several beneficial biological activities giving rise to the prophylaxis or perhaps even to the cure of several prevalent human diseases, especially various types of cancer. Pervasiveness, specificity of response, and absence or low toxicity are crucial advantages of polyphenols as therapeutic agents. In this master's thesis in nutritional biology, a bibliographic review is carried out on polyphenols and on the different extraction methods, supercritical fluid extraction being highlighted as a promising ecological alternative offering exceptional separation and protection against the degradation of unstable polyphenols.

**Key words**: Polyphenols, extraction, antioxidants, cancer, biodisponibility, synergistic effect.

**Remerciements**

Nous remercions tout d’abord Dieu, le tout puissant et miséricordieux de nous avoir accordé la santé, le courage, la foi et la patience pour accomplir ce travail.

Nos vifs et sincères remerciements s’adressent à notre encadreur Mme MERZOUK Hafida, Professeur à l’Université de Tlemcen et Directrice du laboratoire PPABIONUT, Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition. Tout au long de ce mémoire, ses conseils pertinents, amabilité et patience ont permis à notre travail d’aboutir et de voir le jour, pour sa disponibilité, sa convivialité, son engagement, sa bienveillance, sa rigueur et sa qualité pédagogue, nous lui exprimons notre vive reconnaissance et notre profonde et respectueuse considération.

Nous souhaitons remercier les membres du jury qui nous ont fait l’immense honneur d’être juges de notre travail :

Nos vifs remerciements vont aussi à la présidente du jury, Mme medjoub amel MCA à l’université d’oran1, pour l’intérêt qu’elle a porté à notre recherche en acceptant d’examiner notre travail et de l’enrichir par ses propositions; et pour la qualité des enseignements fournis tout au long de la formation.

Nous remercions également Mme MERZOUK Amel Zoubida, MCB enseignante chercheur à l’université de Tlemcen , pour sa participation au groupe de notre jury. Qu’elle soit assurée de notre sincère reconnaissance pour l’attention qu’elle a porté a ce travail.

Je dédie ce modeste travail à ma mère AMINA, qui a œuvré pour ma réussite, mon soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l’expression de mes sentiments et de mon éternel amour. Mon père MOHAMMED, qui est fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de dévouement, pour m’aider à avancer dans la vie. Puisse dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit; Merci pour les valeurs nobles, l’éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes chers frères Sofiane et Mehdi, ma unique sœur Sarah, que j’aime beaucoup, pour leur présence, leur aide, leur soutien moral et pour leur encouragement indéfectible.

Ma grand-mère ; Mon grand-père ; A la mémoire de ma grand-mère allah yarhamha À toute ma famille : tantes et oncles, cousins et cousines de près ou de loin.

A ma chère binôme meriem, en témoignage de l’amitié qui nous unit et à tout sa famille,

A mes vraies amis particulièrement chiheb et walid et leurs familles. A tous ceux que J’aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur.

ABDELDJELLIL SID AHMED

Par la grâce de Dieu, j’ai pu achever cet humble travail.

Avec respect et gratitude, je tiens à exprimer ma gratitude et ma sympathie pour avoir consacré ce travail à:

Mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et leurs sacrifices tout au long de mes études, pour leur patience, pour avoir tendu les bras avec ferveur et pour se débarrasser des moments de doute.

Ma sœur Nadjet et mon frère Mohammed Ilyes pour la joie qu’ils m’ont donné et pour les efforts qu’ils m’ont fournis durant cette année.

A mes grands- parents , grands – mères , tantes et oncles ainsi qu’à toute la famille Berraho et Korso Feciane.

A Ma deuxième mère , tante Lamia et Chafika ; mon cousin Chiheb .

A mon partenaire Abdeldjellil sid ahmed , avec qui j’ai partagé tous les efforts et le travail .

A tous mes camarades et amis; j’ai passé avec eux une année merveilleuse, au cours de laquelle nous avons partagé des moments de joie et de malheur.

A tous mes professeurs qui m’ont formé et aidé par leurs exigences et leurs conseils , car sans eux je n’aurais pas atteint ce niveau .

BERRAHO MERIEM

Table des matières

Abréviations.............

**Liste des figures ............**

**Liste des tableaux .................**

[Introduction………………………………………………………………………………….10](#_TOC_250034)

[Revue bibliographique………………………………………………………………………..3](#_TOC_250033)

[Partie 1 : les polyphénols …………………………………………………………………12](#_TOC_250032)

* 1. [Biodisponibilité et rôles polyphenols……………………….……..14](#_TOC_250031)
  2. [classes de polyphénols……………………………………………….15](#_TOC_250030)
     1. -[principales classes de composés phénoliques et leurs sources 17](#_TOC_250029)
  3. [différents types de polyphénols 17](#_TOC_250028)
     1. [flavonoides ( flavonols ; flavones et les flavanones ) 17-18](#_TOC_250027)
     2. [catéchines 18](#_TOC_250026)

[Partie 2 :méthodes dextraction des polyphénols 18](#_TOC_250022)

* 1. [généralités 18-20](#_TOC_250021)
  2. [extraction des polyphénols 21](#_TOC_250020)
     1. –[extracyion par macération 21](#_TOC_250019)

[2.2.2 -extraction par décoction 21-22](#_TOC_250018)

* 1. [méthodes d’extraction et de séparation des composées phénoliques 22-23](#_TOC_250017)
     1. [méthodes conventionnelles 23-24](#_TOC_250016)

[2.3.2- techniques d’extraction modernes 25](#_TOC_250015)

3. [effets santé des polyphénols](#_TOC_250014) 27

**Conclusion**……………………………………………………………………………………30

**Références bibliographiques**………………………………………………………………..31

**Abréviations**

ABTS : 2 ;2’-azino-bis ( 3-ethylbenzothiozoline -6-sulphonic acid )

AKT : protein kinase B

AP-1 : activator protein 1

AR : androgen receptor

BAX : BCL -2 associated X protein

BCL-2 : B-cell lyphoma 2

C/EBP β : CCAAT / enhancer – binding protein beta

COX : cycloxygenase

DNMT : DNA methyltransferase

DPPH : 2 ;2 – diphenyl -1- picrylhydrazyl

EC : Epicatechin

ECG : Epicatechin -3- gallate

EGC : Epigallocatechin

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

EGCG : epigallocatechin -3- gallate

ER : estrogen receptor

FAS : fas cell surface deathreceptor

GC : gas chromatography

**Liste des Figures**

**Figure** 1. Classes polyphénoliques avec leur structure chimique de base et leurs représentants typiques…………………………………………………………………………………...…..16

**Figure 2**. Extraction Soxhlet à partir de matériel végétal broyé…………………….………..24

**Liste des Tableaux**

**Tableau 1.** Principales classes des composés phénoliques……………………….……..….20

**Introduction**

**Introduction**

De nos jours, la nutrition gagne en importance car les aliments de base sont transformés de manière à ce que les propriétés organoleptiques prévalent sur leur composition nutritionnelle. C'est la principale raison derrière le problème généralisé de l'obésité et aussi pour l'apparition de plusieurs maladies qui sévissent actuellement.

Des études ont montré que de bonnes habitudes alimentaires, y compris la consommation de fruits, de légumineuses et de céréales en abondance et variés, peuvent prévenir 10 à 70 % des décès par cancer [**Surh et al., 2003**]. Cependant, les substances contenues dans les aliments répertoriés qui contribuent principalement à la prévention et à la guérison des maladies n'ont été découvertes que récemment [**Fresco et al., 2010**]. Ces substances très importantes sont les polyphénols, dont certains exercent une action antioxydante encore plus élevée que les vitamines.

Les polyphénols représentent un grand groupe d'au moins 10 000 composés différents qui contiennent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles qui leur sont attachés [**Li et al., 2014**]. En tant que métabolites végétaux secondaires, ils sont abondants dans la majorité des fruits et légumes [**González-Vallinas et al., 2013**]. Les polyphénols alimentaires les plus courants sont les flavonoïdes et les acides phénoliques [**Araújo et al., 2011**]. Chez les plantes, les polyphénols sont généralement impliqués dans la défense contre différents types de stress [**Asensi et al., 2011**]. Ils offrent une protection contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, la lumière UV, les agents pathogènes, les parasites et les prédateurs des plantes. De plus, ils contribuent substantiellement aux propriétés organoleptiques des plantes, des aliments et des cosmétiques [**Dai et al., 2010**]. Les civilisations anciennes ont exploité leurs nombreux effets biologiques pour la promotion et l'amélioration de la santé pendant des siècles [**Konczak et al., 2004**]. En revanche, nos connaissances sur leurs propriétés étaient jusqu'à récemment très limitées [**Dai et al., 2010**]. Il n'y a pas si longtemps, les polyphénols étaient même traités comme des anti-nutriments non essentiels [**Lambert et al., 2005**]. De nos jours, il existe de nombreuses preuves provenant d'études abondantes de leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires et autres divers biologiques qui exercent dans la prévention de diverses pathologies, y compris les maladies cardiovasculaires et le cancer.

La prévention des maladies par les polyphénols est principalement due à leurs propriétés antioxydantes, cependant, l'inversion des changements épigénétiques peut également avoir des effets importants [**Wu et al., 2016**]. Il a été expérimentalement confirmé que les polyphénols préviennent non seulement diverses maladies, mais ont également un impact sur la propagation de la maladie, suppriment la progression et contribuent même au processus de guérison [**Ramos et al., 2008**]. De plus, certains polyphénols exercent des actions hormonales et des effets inhibiteurs sur la résorption osseuse [**Hendric et al., 2006**]. Par conséquent, les polyphénols représentent désormais la cible principale de la recherche sur le cancer car ils présentent un potentiel pour devenir des agents supérieurs pour prévenir et traiter diverses tumeurs malignes.

Dans ce mémoire de master en biologie de la nutrition, nous réalisons une étude bibliographique sur les différentes classes de polyphénols, sur leur biodisponibilité, sur leurs différents rôles et aussi sur les différentes méthodes d’extraction actuellement utilisées pour l'obtention de substances polyphénoliques.

**Les polyphénols**

**1. Les polyphénols**

**1.1. Biodisponibilité et Rôles des polyphénols**

Les polyphénols possèdent de nombreux effets santé incluant des effets, antioxydants, anti-inflammatoires et autres divers biologiques qui exercent dans la prévention de diverses pathologies, y compris les maladies cardiovasculaires, le diabète, l’hypertension et le cancer.

Les avantages des polyphénols en tant qu'agents anticancéreux sont leur grande accessibilité, leur faible toxicité, la spécificité de la réponse et divers effets biologiques. Une combinaison d'effets cytoprotecteurs vis-à-vis des cellules normales et d'effets cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses représente ainsi le principal avantage des polyphénols en tant qu'agents anticancéreux [**Ramos et al., 2008**]. Leur rôle dans la carcinogenèse réside dans la régulation des interactions facteur de croissance-récepteur et des cascades de signalisation cellulaire qui peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire et avoir un impact sur la survie cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses [**Tabrez et al., 2013**]. Les polyphénols induisent principalement l'apoptose par une action pro-oxydante qui s'exerce à la place de leur action anti-oxydante en fonction de leur concentration, de la ou des molécules cibles et des conditions environnementales [**Scalbert et al., 2005**]. Pour cette raison, elles peuvent interagir différemment selon le type de cellule : saine ou cancéreuse. De plus, les polyphénols aident à établir le système immunitaire du corps en inhibant l'angiogenèse nécessaire à la croissance tumorale et agissent comme des agents anti-inflammatoires [**Tabrez et al., 2013**]. Dans les derniers stades du cancer, les polyphénols atténuent l'adhésivité et l'envahissement des cellules réduisant ainsi leur potentiel métastatique [**Tabrez et al., 2013**]. Cependant, la biodisponibilité des polyphénols représente un obstacle majeur car ils n'atteignent les organes cibles qu'à de très faibles concentrations. Une solution de bon augure pour ce problème représente la nanoformulation de polyphénols qui a apporté des résultats prometteurs [**Tabrez et al., 2013**]. D'autre part, cela peut entraîner un problème de toxicité d'agents spécifiques lorsqu'ils sont administrés à fortes doses [**Fresco et al., 2010**]. Certains polyphénols extraits à fortes concentrations agissent même dans le sens inverse: au lieu de prévenir le cancer, ils peuvent contribuer à sa formation et à sa progression [**Khan et al., 2008**]. En revanche, certaines études ont montré que lorsqu'il est combiné avec d'autres polyphénols, un polyphénol individuel peut exercer des propriétés chimioprotectrices et d'autres propriétés favorables significativement améliorées à des concentrations considérablement plus faibles [**Khan et al., 2008**]. L'action synergique des mélanges polyphénoliques entraîne en outre un impact simultané sur différentes voies de la maladie, contribuant ainsi à une guérison plus rapide et plus efficace [**Khan et al., 2008**]. Les polyphénols peuvent également supprimer les effets secondaires de certaines thérapies déjà utilisées dans le traitement du cancer comme la chimiothérapie et la radiothérapie et renforcer leur action.

Les polyphénols alimentaires sont principalement présents sous des formes glycosylées avec un ou plusieurs résidus de sucre conjugués à un groupe hydroxyle ou au cycle aromatique (les flavanols sont une exception notable) [**Manach et al., 2004**]. Ceci représente la principale raison de leur faible absorption dans l'estomac car seuls les aglycones et certains glucosides peuvent être absorbés dans l'intestin grêle, le reste étant absorbé dans le côlon [**Manach et al., 2004**]. Contrairement à l'intestin, le côlon n'absorbe pas facilement les polyphénols. Cela conduit également à des temps d'absorption plus longs, qui peuvent aller jusqu'à 9 h [**Manach et al., 2004**]. L'efficacité des polyphénols absorbés par le côlon n'atteint que 15 à 20 % de la teneur totale en polyphénols absorbés dans l'intestin [**Manach et al., 2004**]. Les glucosides dans les sources alimentaires de polyphénols permettent ainsi une absorption plus rapide et plus efficace des polyphénols. Cependant, les aglycones de certaines isoflavones ont montré une absorption supérieure à leurs formes glucosylées [**Manach et al., 2004**]. Les isoflavones représentent les polyphénols les mieux absorbés avec l'acide gallique, suivis des catéchines, des flavanones et des glucosides de quercétine [**Manach et al., 2005**]. En revanche, les proanthocyanidines, les catéchines de thé galloylées et les anthocyanes sont les moins absorbées [**Manach et al., 2005**]. Conceptuellement, les polyphénols sont absorbés par diffusion passive.

Les polyphénols sont après ingestion soumis à trois principaux types de conjugaison : la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation [**Manach et al., 2004**]. La pertinence des réactions de conjugaison spécifiques n'est pas claire et dépend de la nature du substrat et de la dose ingérée [**Manach et al., 2004**]. Certaines de ces réactions métaboliques contribuent à leurs activités chimiopréventives. Les effets protecteurs contre le cancer de nombreux polyphénols dans différents modèles de cancer ont en effet été démontrés indépendamment de leurs différents mécanismes d'action [**Yang et al., 1999**]. Cependant, les facteurs cruciaux qui définissent le rôle d'un polyphénol spécifique dans les organes cibles restent la biodisponibilité et les niveaux tissulaires [**Yang et al., 2001**].

La lipophilie relative des polyphénols dépend du nombre de groupes hydroxyle contenus [**Hendric et al., 2006**]. Les interactions des polyphénols avec les lipides tels que les membranes cellulaires lipidiques sont limitées à la région polaire de la bicouche lipidique [**Hendric et al., 2006**]. Leur pénétration à travers la membrane lipidique dépend de leur structure, où la planéité est préférée [**Hendric et al., 2006**]. Les polyphénols sont généralement plus hydrophiles que lipophiles en raison de leur nature phénolique [**Tsao et al., 2010**]. Par conséquent, les polyphénols libres ainsi que les aglycones, les glycosides et les oligomères peuvent être facilement extraits par des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile et l'acétone, ou par leurs mélanges avec de l'eau.

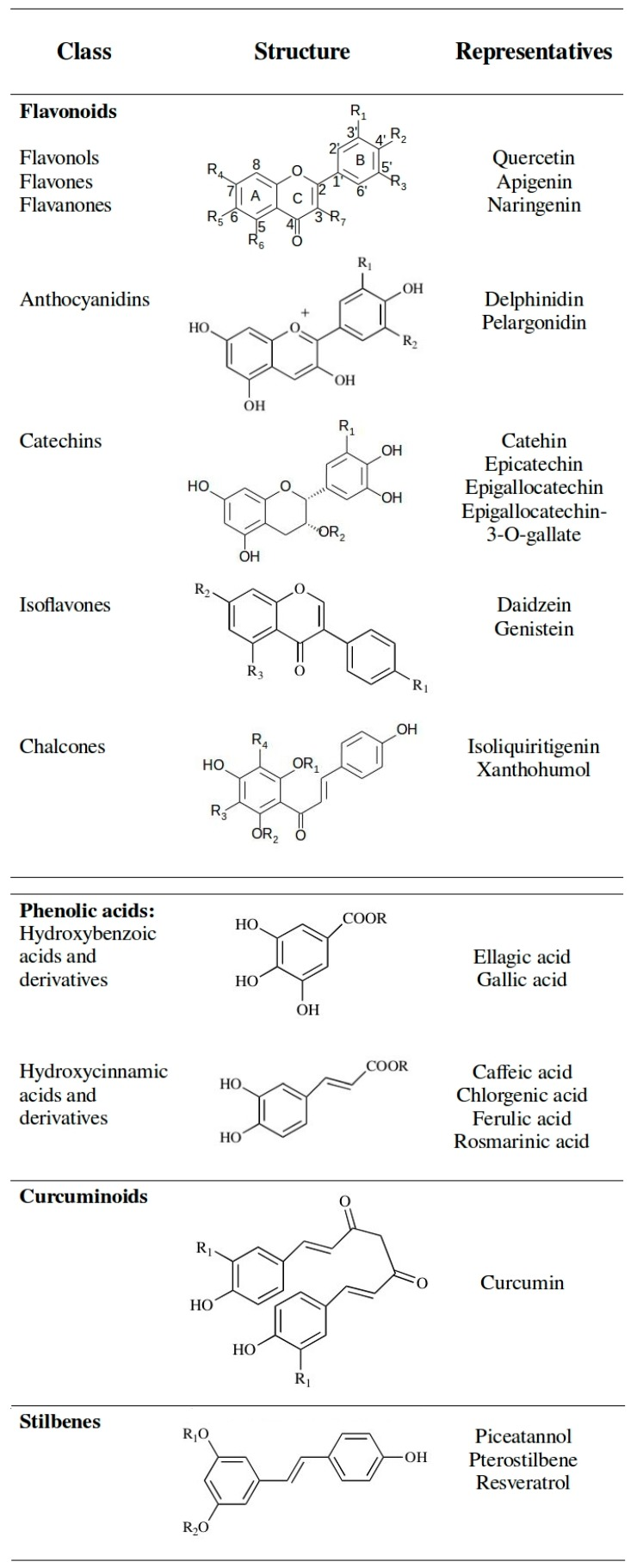
Les procédés impliquant l'utilisation de solvants organiques étant connus pour leur impact environnemental et biologique indésirable, des recherches intensives se concentrent sur de nouvelles méthodes durables de traitement des substances [**Brunner et al., 1994**]. L'extraction par fluides supercritiques (SCF) n'est pas nocive pour les composants alimentaires et est sans danger pour l'environnement, par conséquent, les applications de fluides supercritiques représentent une bonne alternative aux autres méthodes de traitement impliquant des solvants organiques dangereux et une forte demande énergétique. Les SCF peuvent ainsi représenter un substitut aux solvants conventionnels et/ou une aide à la séparation [**Brunner et al., 2004**].

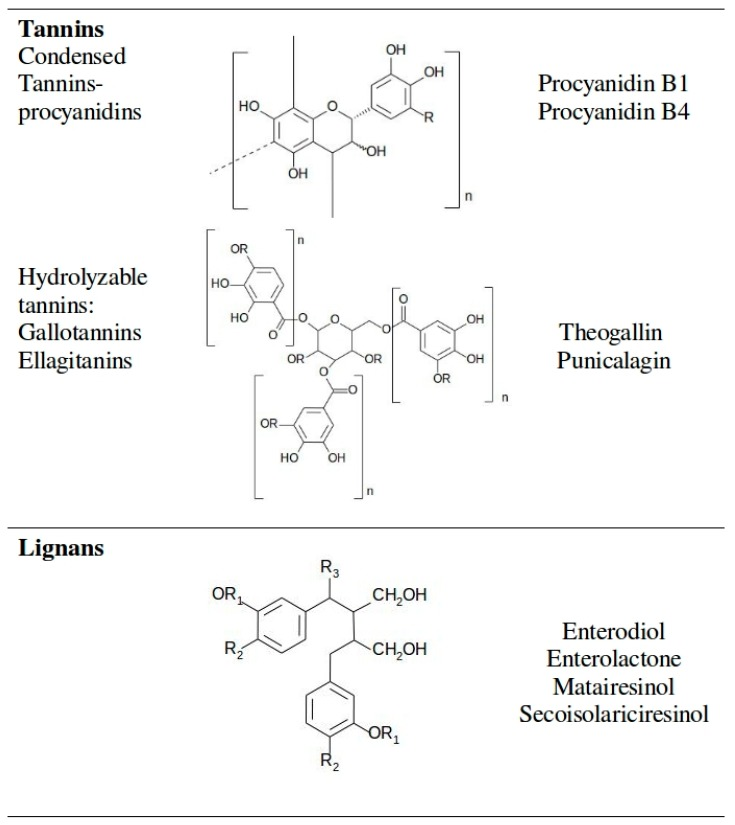
Les avantages pour la santé et la sécurité incluent le fait que les SCF les plus importants (SC CO2 et SC H2O) sont non cancérigènes, non toxiques, non mutagènes, ininflammables et thermodynamiquement stables. Le CO2 dense pourrait même être utilisé comme milieu de traitement «vert», en particulier lorsque les solvants organiques et les températures de traitement élevées doivent être évités [**Brunner et al., 2000** ].

**1.2. Classes de Polyphénols**

**1.2.1. Principales classes de composés phénoliques et leurs sources**

La variété des composés phénoliques reflète les fonctions biologiques très diverses exercées à l'intérieur d'un organisme. Les composés polyphénoliques vont des simples substances à un cycle benzénique aux molécules à plusieurs cycles benzéniques, une division en classes et sous-classes est donc essentielle [**Araújo et al., 2006**]. Parmi les scientifiques, la plus acceptée est une séparation en classes selon leur structure chimique. Les principales classes de polyphénols sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et les tanins [**Mocanu et al., 2015**]. Moins abondante dans les aliments, bien que d'une grande importance, est également la classe des curcuminoïdes [**Mocanu et al., 2015**]. Les structures chimiques de base et les représentants typiques des classes polyphénoliques les plus étudiées sont présentés à la figure 1.





**Figure 1.** Classes polyphénoliques avec leur structure chimique de base et leurs représentants typiques.

Les principales sources de polyphénols sont les fruits tels que les baies, les raisins, les agrumes, les abricots, les pommes, les prunes, les cerises, les pêches et les fruits tropicaux [**Li et al., 2004**]. D'autres sources importantes sont certaines boissons populaires telles que le thé vert et noir, les jus de fruits, le café, le vin rouge, le cacao et la bière ainsi que diverses graines, céréales et noix [**Mocanu et al., 2015**]. Parmi les légumes, les polyphénols peuvent être fréquemment trouvés dans les oignons, les épinards, le brocoli, le chou-fleur, l'artichaut, la tomate, les haricots, le soja, les carottes, les câpres et les olives [**Mocanu et al., 2015**]. Différentes épices et herbes telles que le clou de girofle, le curcuma, le céleri, le persil, la menthe, le romarin, le thym, la sauge, l'aneth, le curry et le gingembre contiennent également des niveaux élevés de polyphénols [**Mocanu et al., 2015**].

Certains polyphénols, par exemple la quercétine, se trouvent dans une pléthore de produits végétaux, tandis que d'autres ne peuvent être trouvés que dans des aliments spécifiques, comme les isoflavones dans les produits à base de soja [**Manach et al., 2004**]. Les plantes et produits végétaux comestibles contiennent principalement des mélanges complexes de divers polyphénols [**Manach et al., 2004**]. La teneur en polyphénols des végétaux est très variable car elle est fonction de plusieurs paramètres dont des facteurs génétiques [**Bravo et al., 1998**] (différences d'espèces [**Duthie et al., 2000**]), des facteurs environnementaux (climat, facteurs agronomiques), le mode de culture (biologique ou non), la maturité, stockage (réactions d'oxydation) et préparation culinaire [**Manach et al., 2004**]. L'apport quotidien estimé en polyphénols est d'environ 1 g, ce qui est nettement supérieur à l'apport de toutes les autres classes d'antioxydants alimentaires et est par exemple environ 100 fois supérieur à l'apport en vitamine E et en caroténoïdes **[Fresco et al., 2010**].

Les flavanones représentent un petit groupe de composés principalement présents dans les agrumes et les pruneaux [**Bravo et al., 1998**]. Les plus importantes parmi les formes aglycones des flavanones (qui sont absorbées plus rapidement) [**Manach et al., 2005**] sont la naringénine et l'hespérétine [**Tripoli et al., 2007**]. Néanmoins, des quantités importantes de flavanones sous forme aglycone sont rarement présentes dans les aliments naturels [**Manach et al., 2005**]. Les formes glycosidiques des flavanones sont classées en deux groupes : les néohespéridosides et les rutinosides. Le goût amer des jus de bergamote, de pamplemousse et d'orange amère provient principalement des néohespéridosides tels que la naringine, la néohespéridine et la néoériocitrine [**Tripoli et al., 2007**]. Les flavanones rutinosides hespéridine, narirutine et didymine sont par contre présentes dans les jus de bergamote, d'orange, de mandarine et de citron [**Tripoli et al., 2007**].

**1.3. Différents types de polyphénols**

**1.3.1. Flavonoïdes : flavonols, flavones et flavanones**

Les flavonoïdes représentent la plus grande partie des polyphénols alimentaires (jusqu'à 60 %) [**González-Vallinas et al., 2013**]. En raison de leur omniprésence et de leurs fonctions/activités biologiques impressionnantes, ils continuent d'être étudiés de manière approfondie en tant que médicaments potentiels ou compléments alimentaires. Les flavonoïdes sont constitués d'un squelette diphénylpropane-flavone avec le pont à trois carbones entre les groupes phényle, généralement cyclisé avec l'oxygène [**Lewandowska et al., 2015**]. La diversité des flavonoïdes appelle une division plus poussée en sous-classes. Les sous-classes les plus importantes comprennent les anthocyanes, les chalcones, les flavanols (catéchines), les flavanones, les flavones, les flavonols et les isoflavones [**González-Vallinas et al., 2013**]. Leurs principaux représentants sont rassemblés dans la figure 3. À l'exception des catéchines, les flavonoïdes des plantes sont liés aux sucres (glucose, galactose, rhamnose, xylose, rutinose, arabinopyranose et arabinofuranose) sous forme de ß-glycosides [**Lewandowska et al., 2015**]. Comme déjà mentionné, le résidu de sucre détermine leur absorption [**Lewandowska et al., 2015**]. Les glycosides flavonoïdes sont principalement situés dans les parties externes de la plante ; tandis que les racines et les tubercules contiennent de très faibles concentrations de flavonoïdes à quelques exceptions notables, comme les oignons et la réglisse [**Manach et al., 2004**].

Certains des flavonoïdes les plus courants sont la quercétine flavonol, abondante dans l'oignon, le brocoli, le thé et les pommes; la catéchine de flavanol présente dans le thé et divers fruits ; la naringénine flavanone présente dans les agrumes ; cyanidine et anthocyane donnant de la couleur à de nombreux fruits/baies rouges (cassis, framboise, fraise, myrtille, raisin etc.) ; la daidzéine et la génistéine, les principales isoflavones du soja [**Scalbert et al., 2005].**

Apigénine L'apigénine est une flavone végétale naturelle abondante dans les fruits et légumes courants tels que les pamplemousses, les boissons d'origine végétale, le persil, les oignons, la camomille, les oranges, le thé et les germes de blé [**Lall et al., 2015**]. La source la plus fréquente d'apigénine consommée est la camomille sous forme de tisane.

**1.3.2. Catéchines**

Les catéchines, un groupe de flavan-3-ols, ont été largement étudiées car leurs représentants forment les principaux composants du thé [**Chen et al., 2011**]. Les catéchines contiennent un squelette benzopyrane avec un groupe phényle lié à la position 2 et un groupe hydroxyle à la position 3 [**Chen et al., 2011**]. Ils existent sous des formes monomères, oligomères et polymères et ne sont pas glycosylés [**Fantini et al., 2015**]. Les principales sources de catéchines sont les fruits, les baies, les céréales, les noix, le chocolat, le vin rouge et le thé ; l'apport alimentaire estimé est donc très élevé (12–189,2 mg/jour). Dans le raisin et le cacao, on trouve principalement la (+)-catéchine et la (−)-épicatéchine (EC), alors que dans le thé, on trouve principalement des esters galloyliques de catéchines (gallocatéchines) [**Yang et al., 2001**]. Les représentants des deux groupes sont de puissants antioxydants [**Lambert et al., 2005].**

**Méthodes déxtraction des polyphénols**

**2. Méthodes d’extraction des polyphénols**

**2.1. Généralités**

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contres les agressions environnementales [**Gee et Johnson, 2001**].

Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d’une sous-classe des flavonoïdes [**El Gharras, 2009**].

De nombreuses études sont en faveur d’un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer [**Brown et al., 1998**], les maladies dégénératives et cardio-vasculaires [**Paganga et al., 1999].**

Un encouragement à la consommation d’aliments d’origine végétale riches en composés phénoliques constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les composés phénoliques apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l’organisme [**Gee et Johnson, 2001**].

L’élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d’au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside…) [**Bruneton, 1999].**

Une revue complète de la littérature a montré qu'il existe une variété de méthodes et de stratégies employées pour l'extraction d'une classe particulière de flavonoïdes [**Calderon-Montaño et al., 2011**].

Le principal problème de l'extraction des flavonoïdes (en particulier des glycosides) est qu'ils peuvent être facilement dégradés par action enzymatique lorsque le matériel végétal collecté est frais ou non séché. Il est donc fortement conseillé de prétraiter le matériel végétal afin d'obtenir des échantillons secs, lyophilisés ou congelés. Une autre caractéristique importante est leur polarité qui influence considérablement le choix de la méthode d'extraction. Les isoflavones, les flavanones, les flavones méthylées et les flavonols en tant que flavonoïdes moins polaires sont extraits avec des composés organiques comme le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther diéthylique ou l'acétate d'éthyle. Les glycosides de flavonoïdes et les aglycones plus polaires sont extraits à l'aide d'alcools ou de mélanges alcool-eau [**Wei et al., 2012**].

Après prétraitement avec de l'hexane pour éliminer les lipides, le matériel végétal broyé peut être extrait dans un appareil Soxhlet en utilisant de l'acétate d'éthyle ou de l'éthanol pour obtenir des flavonoïdes. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans la température d'extraction élevée, cette approche n'est donc pas adaptée aux composés thermosensibles. L'extraction séquentielle par solvant est de plus en plus utilisée ; le matériau est d'abord extrait avec du dichlorométhane. Cette étape comprend l'isolement des aglycones flavonoïdes et d'autres composants de polarité inférieure. Dans l'étape suivante, les glycosides flavonoïdes et les constituants polaires sont extraits à l'aide d'un alcool approprié. La solubilité des flavanones est fortement fonction du pH des solutions contenant de l'eau. Les catéchines, les proanthocyanidines et les tanins condensés, qui sont les principaux représentants des flavan-3-ols, peuvent souvent être extraits directement avec de l'eau [**Feng et al., 2015**].

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d’atomes de carbone dans le squelette de base [**Dacosta, 2003**]. Les différentes classes sont données dans Tableau 1.

**Tableau 1:** Principales classes des composés phénoliques.

|  |  |
| --- | --- |
| **Squelette carboné** | **Classe** |
| C6- | C6 Phénols simples |
| C6-C1 | Acides hydroxybenzoïques |
| C6- C3 | Acides hydroxycinnamique coumarines |
| C6-C4 | Naphtoquinones |
| C6-C2-C6 | Stilbènes |
| C6-C3-C6 | Flavonoïdes |
| (C6-C3)2 | Lignanes |
| (C6-C3)n | Lignines |
| (C6-C3-C6)n | Tanins condensés |

L’extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d’intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d’extraction sur les rendements d’extraction de composés phénoliques de source végétale [**Fresco et al., 2010**]. La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins [**Hendric et al., 2006**]. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols [**Li et al., 2014**]. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante.

**2.2. Extraction des polyphénols**

Un certain nombre de méthodes d'extraction ont été développées ces dernières années telles que les micro-ondes, les extractions assistées par ultrasons et les techniques basées sur l'utilisation de fluides comprimés comme agents d'extraction, telles que l'extraction à l'eau sous-critique, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par fluide sous pression ou l'extraction accélérée par solvant. La technique de macération conventionnelle, l'extraction par micro-ondes et ultrasons en combinaison avec un solvant alcoolique étaient les techniques d'extraction les plus efficaces [**Dai et al., 2010**].

**2.2.1. Extraction par macération**

Pour extraire les polyphénols de différentes parties de végétaux par macération, plusieurs auteurs optent pour le protocole décrit par Romani et al. [**González-Vallinas et al., 2013**] en y apportant quelques modifications. Comme par exemple, 10 à 30 g de la poudre végétale sont macérés à température ambiante pendant 2,5 h (deux fois) avec 100 ml de solutions aqueuses des solvants : éthanol, acétone, méthanol à 70 % v/v et eau. Après filtration sur un tissu mousseline, les filtrats sont centrifugés pendant 20 min à 4000 t/min à température ambiante, filtrés sur papier filtre N° 1 et conservés à 4 °C jusqu’à utilisation.

**2.2.2. Extraction par décoction**

L’extraction des polyphénols par décoction a été effectuée selon le protocole décrit par Chavane et al. [**Lambert et al., 2010**] : 1 à 2 g de la poudre végétale sont ajoutés à 40 ml de solvant d’extraction (éthanol, acétone et méthanol à 70 % v/v dans l’eau et eau). Chaque mélange est porté à ébullition dans un bain Marie durant 30 min puis filtré sur un tissu mousseline. Les marcs sont extraits de la même manière que précédemment et les filtrats sont réunis, centrifugés à 4000 tr/min pendant 20 min et conservés à 4 °C jusqu’à utilisation. Le rendement d’extraction est calculé par la formule donnée par Falleh et al. [**Khan et al., 2008**]: R (%) = 100 Mext/Méch. Où : R est le rendement en %; Mext est la masse de l’extrait après évaporation du solvant en mg et Méch est la masse sèche de l’échantillon végétal en mg.

Les auteurs après extraction procèdent au dosage des polyphénols totaux. Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) [**Fantini et al., 2015]** : 100 µl d’extrait polyphénolique sont mélangés avec 500 µl du réactif FC et 400 µl de Na2CO3 à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l’obscurité et à température ambiante pendant dix minutes et l’absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d’étalonnage de l’acide gallique.

Certains auteurs dosent aussi les flavonoïdes après extraction. La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par Dehpeur et al. [**De Kok et al., 2008**] : 500 µl de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 µl de méthanol à 95 %, 100 µl de AlCl3 à 10 % (m/v), 100 µl d’acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d’eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à l’obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l’extrait par du méthanol à 95 % et l’absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d’étalonnage de la quercétine.

D’autres dosages sont aussi réalisés après méthode d’extraction. Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Ba et al. [**Manach et al., 2004]** : Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage. 200 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 1 000 µl de réactif de vanilline ; le mélange a été agité puis incubé à l’obscurité à 30 °C pendant 20 min. L’absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer) contre un blanc constitué d’un mélange de méthanol (37 %) et de HCl (8%) à volume égal.

**2.3. Méthodes d'extraction et de séparation des composés phénoliques**

De nombreuses publications sur l'isolement et le fractionnement des composés phénoliques sont apparues au cours des deux dernières décennies. Les méthodes traditionnelles de préparation, de séparation, de détection et d'identification des échantillons sont de plus en plus fréquemment remplacées par des techniques avancées [**Knez et al., 2016**].

Dans la première étape, la procédure d'extraction appropriée doit être envisagée. La décision sur la méthode d'extraction à utiliser est influencée par la nature chimique de la substance, la taille des particules de l'échantillon, ainsi que par la présence de substances interférentes. Le temps d'extraction, la température, le rapport solvant/alimentation, le nombre d'extractions répétées de l'échantillon, ainsi que le choix des solvants d'extraction sont les paramètres cruciaux affectant le rendement d'extraction. La solubilité est influencée à la fois par le temps d'extraction et la température. Une température plus élevée augmente simultanément la solubilité et les vitesses de transfert de masse ainsi que diminue la viscosité et la tension superficielle des solvants contribuant à un taux d'extraction plus élevé **[Brunner et al., 2005**]. Pour l'élimination des composés indésirables tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles, des étapes supplémentaires peuvent être introduites [**Martinez et al., 2007**].

Les composés phénoliques peuvent être extraits d'échantillons de plantes fraîches, congelées ou séchées. Avant l'extraction, le matériau est prétraité par broyage, broyage, séchage et homogénéisation. La sélection de la procédure de séchage a un impact sur la teneur totale en composés phénoliques. La lyophilisation conserve des niveaux de contenu phénolique plus élevés dans les échantillons de plantes que le séchage à l'air [**Abascal et al., 2005**]. Des extraits phénoliques à haute teneur en anthocyanes peuvent également être obtenus en utilisant un solvant organique acidifié tel que le méthanol ou l'éthanol. Le but est de sélectionner un solvant de faible viscosité afin d'accélérer le transfert de masse.

**2.3.1. Méthodes conventionnelles**

Malgré plusieurs inconvénients, l'extraction liquide-liquide et solide-liquide sont encore les procédures d'extraction les plus couramment utilisées. Pendant de nombreuses années, les techniques conventionnelles ont été largement acceptées, principalement en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité et de leur large applicabilité [**Stalikas et al., 2007**].

De tels procédés impliquent l'utilisation de solvants conventionnels comme les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle, souvent mélangés avec différentes proportions d'eau. L'utilisation de ces solvants présente plusieurs inconvénients : outre un éventuel effet dangereux sur la santé humaine, les résidus des solvants peuvent également rester dans les produits finaux. Cela nécessite des étapes de purification supplémentaires qui prennent du temps et influencent le coût total du procédé. De plus, en utilisant des solvants organiques purs, les acides phénoliques très polaires (acides benzoïque, cinnamique) ne peuvent pas être extraits complètement. Dans de tels cas, des mélanges alcool-eau ou acétone-eau sont suggérés. Les cires, les huiles, les stérols, la chlorophylle sont des composés hautement non polaires et peuvent être extraits du matériau par des solvants moins polaires comme le dichlorométhane, le chloroforme, l'hexane et le benzène [**Stalika et al., 2007**].

Le rendement et le taux d'extraction polyphénolique sont liés aux caractéristiques du solvant. Il a été observé que le méthanol est plus efficace dans l'extraction des polyphénols de poids moléculaire inférieur tandis que l'acétone aqueuse est un solvant approprié pour l'extraction des flavanols de poids moléculaire supérieur [**Guyot et al., 2001**].

Cependant, de nombreux composés phénoliques sont sujets à dégradation ou subissent une oxydation indésirable. Le rendement phénolique dans les extraits est donc significativement diminué. Des températures de traitement élevées doivent donc être évitées. L'extraction conventionnelle est généralement effectuée à des températures allant de 20 °C à 50 °C. Des températures supérieures à 70 °C sont indésirables et entraînent une dégradation rapide des anthocyanes. Les longues durées d'extraction sont encore un autre problème auquel sont confrontées les procédures d'extraction conventionnelles. De plus, les méthodes d'extraction conventionnelles typiques et les plus largement utilisées, la macération et l'extraction Soxhlet, sont connues pour leur faible efficacité et leurs risques environnementaux potentiels en raison de la forte demande de solvants organiques. Dans la figure 2, l'extraction Soxhlet à partir de matériel végétal broyé peut être vue.

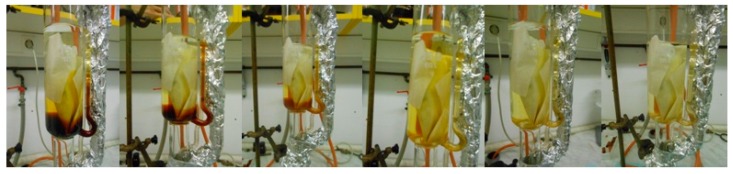


Figure 2 : Extraction Soxhlet à partir de matériel végétal broyé

Les paramètres supplémentaires contrôlant la cinétique d'extraction sont la matrice de l'échantillon et la taille des particules. Les phénols peuvent se lier à d'autres constituants de l'échantillon tels que les glucides et les protéines [**Pinelo et al., 2008**]. Dans les étapes suivantes, ces liaisons peuvent être hydrolysées par l'ajout d'enzymes, conduisant à la libération de phénols liés.

Globalement, la stabilité phénolique de l'extrait est influencée par l'hydrolyse acide et alcaline et donc par le pH de l'échantillon ainsi que par le pH et la polarité des éluants. Ainsi, un pH de 4 à 5 était associé à une stabilité accrue des catéchines et de leurs isomères par rapport aux conditions alcalines et plus acides.

**2.3.2. Techniques d'extraction modernes**

En raison des problèmes associés aux températures de traitement élevées et aux longs temps de traitement dans les procédures d'extraction conventionnelles, il existe un besoin essentiel de promouvoir le développement et l'application de techniques d'extraction alternatives pour les composés phénoliques. Les alternatives possibles représentent l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons-micro-ondes, l'extraction de fluide supercritique et l'extraction d'eau sous-critique qui ont récemment suscité un grand intérêt [**Solanaa et al., 2015**] en raison de leur simplicité, des temps d'extraction plus courts et une consommation de solvant organique réduite.

Les technologies de fluides supercritiques ont été largement étudiées pour l'isolement sélectif des antioxydants à partir de matériaux naturels puisque les conditions douces évitent l'oxydation et/ou la dégradation des composés labiles [**King et al., 1993**]. Récemment, les limitations légales pour les résidus de solvants et les restrictions sur l'utilisation de solvants organiques conventionnels deviennent de plus en plus rigoureuses, en particulier dans les domaines de l'industrie alimentaire et pharmaceutique. L'isolement/fractionnement de composants spéciaux à l'aide de technologies de production conventionnelles (industrie des huiles et des graisses) est généralement remplacé par des technologies de production alternatives, réalisées par des procédés ayant un impact environnemental minimal et des déchets peu toxiques. Les sous-produits sont utilisés efficacement pendant le processus lui-même ou dans d'autres industries et, comme caractéristique la plus importante, des produits de meilleure qualité et des nutriments plus sains sont obtenus. Il existe une grande quantité d'articles traitant de la recherche sur l'extraction supercritique à partir de différents matériaux; détermination et quantification de composés individuels, ce qui montre l'actualité du sujet, en particulier en ce qui concerne les applications potentielles de composés naturels en tant qu'additifs.

Étant donné que la solubilité élevée du composé d'intérêt dans le solvant supercritique est essentielle pour l'économie du processus d'extraction, des analyses pratiques doivent vérifier si l'extraction à l'aide de fluides supercritiques est une technique appropriée pour l'isolement des composés cibles [**Lack et al., 2000**]. Plusieurs paramètres influençant la solubilité, le transfert de masse des composés cibles dans le fluide supercritique et le rendement résultant doivent être pris en compte [**Kikic et al., 1997**]. La qualité de l'extrait dépend fortement de la pression et de la température appliquées qui peuvent influencer de manière significative la composition des extraits finaux. De plus, tout effet de perte de charge doit être évalué et pris en compte lors de l'optimisation des paramètres afin d'obtenir le meilleur rapport entre le rendement, la quantité de solvant et le temps d'extraction. Cependant, avant le début de l'extraction en tant qu'étape principale pour la récupération et l'isolement des polyphénols bioactifs de la matière végétale, les procédures appropriées de manipulation des échantillons doivent être effectuées. Les premières étapes impliquent le broyage, le broyage et l'homogénéisation.

Compte tenu du fait que les solvants fluides supercritiques représentent des intermédiaires entre les liquides et les gaz, en augmentant la densité du fluide, une solubilité accrue est souvent également obtenue. La viscosité, qui est similaire à la viscosité des gaz, permet de meilleures propriétés de transport. Le principal avantage des fluides supercritiques est la possibilité de modifier radicalement les caractéristiques des solvants près de leur point critique. De plus, la sélectivité du solvant représente une caractéristique importante du solvant. Elle varie considérablement avec la pression et/ou la température. On observe souvent qu'un système à fort pouvoir de solubilité possède une faible sélectivité en solvant. Ce dernier peut être augmenté en ajoutant un co-solvant.

L'extraction de matières végétales (comme les constituants du houblon, la décaféination du thé et du café avec du CO2 supercritique) constituent des procédés qui représentent quelques-unes des premières applications des fluides supercritiques et sont déjà bien établis dans le secteur alimentaire. Les substances naturelles pour l'application dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique sont également souvent obtenues à l'aide d'outils à haute pression. La technologie d'extraction par fluide supercritique a énormément progressé depuis sa création et représente la méthode de choix dans de nombreuses industries de transformation des aliments. Puisqu'il a été largement accepté comme une technique de traitement «verte» propre et respectueuse de l'environnement, il peut être utilisé comme alternative à l'extraction à base de solvant organique des composés phénoliques. Des composés phénoliques typiquement stérilisés et exempts de contamination restant dans leur état chimiquement naturel peuvent être obtenus. Les composants nocifs des produits nutraceutiques peuvent être éliminés et une résolution énantiomérique est possible. L'élimination des graisses des aliments, l'enrichissement de la vitamine E à partir de sources naturelles, l'élimination de l'alcool du vin et de la bière, l'extraction et la caractérisation des composés fonctionnels en raison de l'intérêt croissant pour les aliments dits fonctionnels représentent quelques-unes des applications possibles des supercritiques.

**Extraction de CO2** : Très majoritairement, le CO2 supercritique représente le solvant de choix en raison de sa facilité de pénétration à l'intérieur des matières végétales et de son fort pouvoir solvant. Récemment, outre le CO2, plusieurs fluides supercritiques alternatifs ont été proposés pour des applications extractives. Par exemple, dans le cas du traitement de composés de faible polarité et de faible poids moléculaire, l'introduction de co-solvants et d'autres fluides supercritiques tels que le propane, l'argon et le SF6 est effectuée. Même l'eau a fait l'objet de discussions intenses, mais sa température et sa pression critique élevée, liées à la forte consommation d'énergie, ainsi que la nature hautement corrosive de H2O à l'état supercritique, ont limité ses applications pratiques [**Dai et al., 2010**]. L'extraction à l'eau sous-critique est devenue une technologie alternative de plus en plus populaire dans l'extraction des composés phénoliques. Dans certains cas, de l'eau est également ajoutée au système en tant que co-solvant pour l'extraction de composés plus polaires à partir de plantes aromatiques. La constante diélectrique de l'eau est une fonction forte de la pression et de la température. Au voisinage du point critique, la constante diélectrique et la polarité peuvent être facilement ajustées par un petit changement de pression. En raison de la rupture des liaisons hydrogène intermoléculaires, sa polarité diminue dans des conditions sous-critiques. Par exemple, l'eau a une polarité élevée et une constante diélectrique proche de 80 à température ambiante. En augmentant la pression à la température de 250 °C, la constante diélectrique diminue significativement et devient similaire à celle de l'éthanol [**Fernandez et al., 1997**]. Cela signifie que le même solvant peut être utilisé pour extraire les composants inorganiques et organiques, respectivement.

Le principal avantage est que les produits fabriqués de cette manière sont sans solvant, sans la présence de co-produits et que la température de fonctionnement est basse [**Lack et al., 2000**]. L'utilisation de fluides supercritiques pour l'extraction de composés naturels à des pressions encore plus élevées (plus de 70 MPa) que dans l'extraction supercritique conventionnelle donnera de nouveaux produits à partir de matières végétales connues telles que l'isolement de substances moins solubles. Les principaux avantages de l'extraction supercritique par rapport aux méthodes conventionnelles sont sa simplicité, la haute qualité de l'extrait, le faible temps d'extraction et le respect de l'environnement en raison de l'eau utilisée comme solvant.

**3. Effets santé des polyphénols**

Les flavonoïdes exercent leur activité antioxydante en piégeant efficacement divers radicaux libres (comme l'anion superoxyde et le peroxynitrite), en régulant l'activité enzymatique médiée par le stress oxydatif [**Ramos et al., 2008**] et par chélation des métaux de transition impliqués dans les processus de formation de radicaux [**Biesaga et al., 2011**]. D'autres propriétés anticancéreuses incluent la régulation des voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse, l'interaction avec les protéines qui contrôlent la progression du cycle cellulaire et la modulation efficace des voies de signalisation du site d'intégration lié aux ailes (Wnt) dans lesquelles la plupart des thérapies conventionnelles sont inefficaces [**Ramos et al., 2008**]. Les flavonoïdes peuvent interférer avec les trois stades du cancer : l'initiation, le développement et la progression en modulant la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse ainsi que les métastases [**Kris-Etherton et al., 2002**]. De plus, l'effet chimiopréventif des flavonoïdes alimentaires est assez spécifique car les cellules cancéreuses se sont révélées plus sensibles aux actions des polyphénols que les cellules normales [**Lewandowska et al., 2015**]. De plus, les flavonoïdes présentent des actions antibactériennes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-thrombotiques [**Biesaga et al., 2011**].

L'association inverse de l'incidence du cancer, tous sites confondus, avec l'apport alimentaire en flavonoïdes a été observée dans une étude sur des hommes finlandais [**Yang et al., 2001**]. Une autre étude épidémiologique a montré une diminution du risque de cancer dans la cavité buccale, le pharynx, le larynx et l'œsophage [**Lewandowska et al., 2015**]. Cependant, il existe également des études qui n'ont trouvé aucune relation entre l'apport en flavonoïdes et la réduction du risque de cancer [**Lewandowska et al., 2015**].

Flavonols, flavones, flavanones Bien que les flavonols, les flavones et les flavanones représentent des sous-classes relativement diverses de flavonoïdes, ils partagent certaines activités biologiques communes. Par exemple, plusieurs flavones comme l'apigénine, la baicaléine, la lutéoline et la rutine, des flavonols comme la quercétine et le kaempférol ainsi que des flavanones comme l'hespéridine et la naringine exercent des effets inhibiteurs de croissance dans différents cancers : côlon, prostate, foie, estomac, col de l'utérus, pancréas , du sein et des leucémies [**Kampa et al., 2007**].

Les catéchines : Les représentants des deux groupes sont de puissants antioxydants [**Lambert et al., 2005**]. Ils peuvent également agir comme pro-oxydants induisant la formation de H2O2 afin de provoquer le processus apoptotique dans les cellules cancéreuses [**Ramos et al., 2008**]. Cependant, l'action pro-oxydante peut induire la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et avoir des effets délétères sur les cellules non malignes [**Lee et al., 2006**]. Leur mode d'action anti-/pro-oxydant dépend donc du type cellulaire, de la dose et du temps de traitement/exposition [**Ramos et al., 2008**]. En inhibant l'activation des enzymes métalloprotéinases matricielles (MMP) MMP-2 et MMP-9, les catéchines de type ester à groupement galloyle inhibent l'invasion des cellules cancéreuses [**Lee et al., 2006**]. Inhibition de l'activité de la lysyl oxydase (LOX) et de la cyclooxygénase (COX) par l'épigallocatéchine-3-gallate (en abrégé EGCG), l'épigallocatéchine (EGC en abrégé) et l'épicatéchine-3-gallate (ECG), en plus de la modulation du métabolisme de l'acide arachidonique, qui impacte la croissance cellulaire, la prolifération, l'invasion tumorale et l'inflammation [**Kampa et al., 2007].**

En plus des effets anticancéreux et antioxydants, les catéchines modulent la peroxydation lipidique [**Lee et al., 2006**] qui affecte la prise de poids et peut endommager la couche lipidique des cellules et par conséquent influencer des maladies telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer [**Park et al., 2015**]. Les catéchines du thé exercent également des effets neuroprotecteurs [**Kampa et al., 2007**]. Les catéchines telles que l'EGCG et l'ECG montrent la capacité de moduler l'activité des œstrogènes en influençant l'expression génique médiée par le récepteur des œstrogènes (RE) en se liant à ERα et ERβ. Les concentrations plasmatiques maximales mesurées d'EGCG, d'EGC et d'EC (libres et conjuguées) étaient d'environ 2 à 3 μM ou moins **[Yang et al., 2001**]. Par conséquent, lors de l'extrapolation des résultats des études in vitro chez l'animal à l'homme, la prudence s'impose car, dans la majorité des études in vitro, des concentrations de polyphénols nettement plus élevées sont utilisées que celles pouvant être atteintes in vivo.

Le polyphénol de thé le plus répandu, l'EGCG, est présumé exercer le potentiel chimiopréventif le plus élevé parmi les catéchines antioxydantes [**Khan et al., 2008**]. L'EGCG présente jusqu'à environ 10 % à 50 % de la teneur totale en catéchine [**Khan et al., 2008**]. Il affecte les trois stades de développement du cancer, principalement en inhibant un large éventail de voies critiques de transduction du signal et en activant les facteurs de transcription sensibles à l'oxydoréduction [**Tabrez et al., 2013**]. Les voies de transduction de signal inhibées connues comprennent Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), les phosphatidylinositol-3-kinases/protéine kinase B (PI3K/Akt), Wnt et Notch [**Tabrez et al., 2013**]. L'EGCG stimule également la fragmentation des télomères en inhibant l'activité de la télomérase [**Tabrez et al., 2013**]. Les effets antiangiogéniques, l'activité antimétastatique et la suppression de l'invasion et de la prolifération des cellules cancéreuses par l'EGCG peuvent être le résultat d'une régulation à la baisse de l'activité des MMP [**Tabrez et al., 2013**]. De plus, l'EGCG est capable de supprimer la cancérogenèse par une action anti-inflammatoire en régulant négativement le récepteur de l'interleukine 1 de type I (IL-1RI), par l'inhibition de (NF)-κB [**Tabrez et al., 2013**] et en bloquant l'inhibition de la communication intracellulaire Gap-junction (GJIC) [**Lee et al., 2006**]. Comme déjà mentionné, l'EGCG est également un puissant inhibiteur de la peroxydation lipidique [**Lee et al., 2006**].

On suppose que la capacité à moduler/inverser les changements épigénétiques est à l'origine de la majorité des effets biologiques des polyphénols [**Wu et al., 2016**]. Comme le cancer peut être perçu comme une manifestation de changements épigénétiques et de prédispositions génétiques, l'inversion des modifications épigénétiques par les polyphénols alimentaires peut prévenir, supprimer et même inverser la carcinogenèse [**Link et al., 2010**]. L'EGCG possède évidemment la capacité de moduler/inverser tous les changements épigénétiques : hyperméthylation, modifications des histones et changements dans l'expression des microARN (miARN) [**Link et al., 2010**]. Il inverse l'hyperméthylation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs connus tels que p16, le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), l'O6-méthylguanine ADN méthyltransférase (MGMT) et l'homologue MutL 1 (MLH1) en fonction de la concentration et du temps ; c'est le modulateur le plus prometteur et le plus puissant des marqueurs d'histone dans les cellules cancéreuses ; et il modifie les expressions de 61 miARN [**Link et al., 2010**]. Dans les cellules de carcinome épidermoïde humain A431, le traitement à l'EGCG (5–20 μM) a diminué les niveaux globaux de méthylation de l'ADN [**Lewandowska et al., 2015**].

**conclusion**

**Conclusion**

Les polyphénols sont des molécules présentes dans les végétaux et sont d’un grand intérêt thérapeutique. En effet, ces molécules actives possèdent de nombreux effets santé notamment un effet antioxydant pouvant être exploité dans la prévention et même le traitement de nombreuses pathologies. Plusieurs méthodes d’extraction des polyphénols sont donc développées afin de pouvoir les extraire et les purifier. Ces méthodes sont nombreuses et utilisent différents solvants qui peuvent être toxiques ou qui peuvent altérer ces polyphénols. Le choix de la technique d’extraction reste donc un sujet d’actualité. De cette étude, il ressort que la macération par l’éthanol et par l’acétone sont les meilleures techniques d’extraction des flavonoïdes alors que la décoration aqueuse est préférable pour l’extraction des tanins condensés. Cependant, les rendements restent faibles.

En raison des problèmes associés aux méthodes d'extraction conventionnelles, la promotion et le développement de techniques d'extraction alternatives pour les composés phénoliques prend de l’ampleur. Les méthodes alternatives représentent l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons-micro-ondes, l'extraction de fluide supercritique et l'extraction d'eau sous-critique qui ont suscité un grand intérêt en raison de leur simplicité, rapidité et une consommation de solvant organique réduite. Les technologies de fluides supercritiques ont été aussi étudiées pour l'isolement sélectif des polyphénols évitant l'oxydation et/ou la dégradation des composés phénoliques.

**Références Bibliographiques**

Abascal K., Ganora L., Yarnell E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: A review. *Phytother. Res.*2005;19:655–660. doi: 10.1002/ptr.1651.

Ajila C.M., Brar S.K., Verma M. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.*2011;31:227–249. doi: 10.3109/07388551.2010.513677.

Araújo J.R., Gonçalves P., Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr. Res.*2011;31:77–87. doi: 10.1016/j.nutres.2011.01.006.

Asensi M., Ortega A., Mena S., Feddi F., Estrela J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*2011; 48:197–216. doi: 10.3109/10408363.2011.631268.

Beltz L.A., Bayer D.K., Moss A.L., Simet I.M. Mechanisms of Cancer Prevention by Green and Black Tea Polyphenols. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*2006; 6:389–406. doi: 10.2174/187152006778226468.

Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J. Chromatogr. A.*2011;1218:2505–2512. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.059.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.*1998;56:317–333. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.

Brunner G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *J. Food Eng.*2005;67:21–33. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060.

Brunner G. *Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes.* Steinkopff; Darmstadt, Germany: Springer; New York, NY, USA: 1994.

Calderon-Montaño J.M., Burgos-Moron E., Perez-Guerrero C., Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.*2011;11:298–344. doi: 10.2174/138955711795305335.  76. Babova O., Occhipintia A., Capuzzo A., Maffei M.E. Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO2 and ethanol as co-solvent. *J. Supercrit. Fluids.*2016;107:358–363. doi: 10.1016/j.supflu.2015.09.029.

Capriotti A.L., Cavaliere C., Foglia P., Piovesana S., Ventura S. Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry Detection for the Determination of Phenolic Acids in Plants and Fruits. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*2015;38:353–370. doi: 10.1080/10826076.2014.941263.

Chen D., Wan S.B., Yang H., Yuan J., Chan T.H., Dou Q.P. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv. Clin. Chem.*2011;53:155–177.

Chen Y.C., Sugiyama Y., Abe N., Kuruto-Nima R., Nozawa R., Hirota A. DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*2005;69:999–1006. doi: 10.1271/bbb.69.999.

ClinicalTrials.gov: A Service of the U.S. National Institutes of Health. 21 March 2016)]; Available online:

Dai J., Mumper J.R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.*2010;15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

De Kok T.M., van Breda S.G., Manson M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *Eur. J. Nutr.*2008; 47(Suppl. S2):51–59. doi: 10.1007/s00394-008-2006-y.

Delpino-Rius A., Eras J., Vilaró F., Cubero M.A., Balcells M., Canela-Garayo R. Characterisation of phenolic compounds in processed fibers from the juice industry. *Food Chem.*2015;172:575–584. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.071.

Diaz-Reinoso B., Moure A., Dominguez H., Parajó J.C. Supercritical CO2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*2006;54:2441–2469. doi: 10.1021/jf052858j.

doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.006

Duthie G.G., Duthie S.J., Kyle J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.*2000;13:79–106. doi: 10.1079/095442200108729016.

Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese G.V., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*2015; 16:9236–9282. doi: 10.3390/ijms16059236.

Feng R.-Z., Wang Q., Tong W.-Z., Xiong J., Wei Q., Zhou W.-H., Yin Z.-Q., Yin X.-Y., Wang L.-Y., Chen Y.-Q., et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of Morus nigra. *Int. J. Clin. Exp. Med.*2015;8:22328–22336.

Fernandez D.P., Goodwin A.R.H., Lemmon E.W., Levelt-Sengers J.M.H., Williams R.C. A formulation for the static permittivity of water and steam at temperatures features from 238 K to 873 K at pressures up to 1200 MPa, Including derivatives and Debye-Hückel coefficients. *J. Phys. Chem.*1997;26:1126–1166.

Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M.P.M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Med. Res. Rev.*2006;26:747–766. doi: 10.1002/med.20060.

Fresco P., Borges F., Marques M.P.M., Diniz C. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Curr. Pharm. Des.*2010; 16:114–134. doi: 10.2174/138161210789941856.

González-Vallinas M., González-Castejón M., Rodríguez-Casado A., Ramírez de Molina A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy; a complementary approach with promising perspectives. *Nutr. Rev.*2013;71:585–599. doi: 10.1111/nure.12051.

Grace M.H., Yousef G.G., Esposito D., Raskin I., Lila M.A. Bioactive Capacity, Sensory Properties, and Nutritional Analysis of a Shelf Stable Protein-rich Functional Ingredient with Concentrated Fruit and Vegetable Phytoactives. *Plant Foods Hum. Nutr.*2014;69:372–378. doi: 10.1007/s11130-014-0444-7.

Grace M.H., Yousef G.G., Gustafson S.J., Truong V.D., Yencho G.C., Lila M.A. Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid, and carotenoids associated with sweet potato storage and impacts on bioactive properties. *Food Chem.*2014;145:717–724. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.107.

Gülçin I., Huyut Z., Elmastaş M., Aboul-Enein H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab. J. Chem.*2010;3:43–53. doi: 10.1016/j.arabjc.2009.12.008.

Guyot S., Marnet N., Drilleau J. Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *J. Agric. Food Chem.*2001;49:14–20. doi: 10.1021/jf000814z.

Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*2002;96:67–202. doi: 10.1016/S0163-7258(02)00298-X.

Hendric A.B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol. Sin.*2006;27:27–40. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x.

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=EGCG+and+cancer&Search=Search>

Kalin P., Gülçin I., Gören A.C. Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) *Rec. Nat. Prod.*2015;9:496–502.

Kampa M., Nifli A.-P., Notas G., Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*2007;159:79–113.

Kefalas P., Kllithraka S., Parejo I., Makris D.P. A Comparative Study on the in Vitro Antiradical Activity and Hydroxyl Free Radical Scavenging Activity in Aged Red Wines. *Food Sci. Technol. Int.*2003;9:383–387. doi: 10.1177/1082013203040080.

Khan N., Afaw F., Mukhtar H. Cancer Chemoprevention through Dietary Antioxidants: Progress and Promise. *Antioxid. Redox Signal.*2008;10 doi: 10.1089/ars.2007.1740.

Khan N., Bharali D.J., Adhami V.M., Siddiqui I.A., Cui H., Shabana S.M., Mousa S.A., Mukhtar H. Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model. *Carcinogenesis.*2014;35:415–423. doi: 10.1093/carcin/bgt321.

Kikic I., Lora M., Bertucco A. A Thermodynamic Analysis of Three-Phase Equilibria in Binary and Ternary Systems for Applications in Rapid Expansion of a Supercritical Solution (RESS), Particles from Gas-Saturated Solutions (PGSS), and Supercritical Antisolvent (SAS) *Ind. Eng. Chem. Res.*1997;36:5507–5515. doi: 10.1021/ie970376u.

King J.W., Srinivas K. Multiple unit processing using sub- and supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids.*2009;47:598–610. doi: 10.1016/j.supflu.2008.08.010.

King M.B., Bott T.R. *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents.* Chapman & Hall; Glasgow, UK: 1993. pp. 84–100.

Knez Hrnčič M. *Ph.D. Thesis.* University of Maribor; Maribor, Slovenia: 2014. Thermodynamic and Physical Properties for High Pressure Process Design.

Knez Hrnčič M., Škerget M., Knez Ž. Argon as a potential solvent to substitute conventional supercritical fluids; Proceedings of the 21st International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2014) and 17th Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction (PRES 2014); Prague, Czech Republic. 23–27 August 2014; Prague, Czech Republic: Conference PRES; 2014.

Knez Ž. Food processing using supercritical fluids. In: Nedović V., Raspor P., Lević J., Tumbas Šaponjac V., Barbosa-Cánovas G.V., editors. *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food.* Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2016. pp. 413–442. (Food Engineering Series, 1571-0297).

Konczak I., Zhang W. Anthocyanins—More Than Nature’s Colours. *J. Biomed. Biotechnol.*2004; 5:239–240. doi: 10.1155/S1110724304407013.

Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *Am. J. Med.*2002;113:71S–88S. doi: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0.

Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M., Moutounet M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*1999;47:2719–2723. doi: 10.1021/jf990029q.

Lack E., Gamse T., Marr R. High Pressure technology: Fundamentals and application. In: Bertucco A., Vetter G., editors. *Industrial Chemistry Library.* Volume 9. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2000. p. 383.

Lack E., Simandy B. High Pressure technology: Fundamentals and application. In: Bertucco A., Vetter G., editors. *Industrial Chemistry Library.* Volume 9. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2000. pp. 537–575.

Lall R.K., Syed D.N., Adhami V.M., Khan M.I., Mukhtar H. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*2015;16:3350–3376. doi: 10.3390/ijms16023350.

Lambert J.D., Elias R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.*2010; 501:65–72. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.013.

Lambert J.D., Hong J., Yang G., Liao J., Yang C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.*2005;81(Suppl. S1):284S–291S.

Lee K.W., Lee H.J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors.*2006;26:105–121. doi: 10.1002/biof.5520260202.

Lewandowska H., Kalinowska M., Lewandowski W., Stępkowski T.M., Brzóska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J. Nutr. Biochem.*2015;32:1–19. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.11.006.

Li A.-N., Li S., Zhang Y.-J., Xu X.-R., Chen Y.-M., Li H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients.*2014; 6:6020–6047. doi: 10.3390/nu6126020.

Link A., Balaguer F., Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.*2010;80:1771–1792. doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.036.

López-Alarcón C., Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta.*2013;76:1–10. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.051.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*2004;79:727–747.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*2005;81(Suppl. S1):230S–242S.

Manson M.M. Cancer prevention—The potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol. Med.*2003;9:11–18. doi: 10.1016/S1471-4914(02)00002-3.

Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K. Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation. *Curr. Med. Chem.*2001;8:135–153. doi: 10.2174/0929867013373723.

Martinez J.L. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds.* CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 2007. pp. 275–304.

McHugh M.A., Krukonis V.J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice.*Butterworths; Stoneham, MA, USA: 1986.

Metivier R.P., Francis F.J., Clydesdale F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *J. Food Sci.*1980;45:1099–1100. doi: 10.1111/j.1365-2621.1980.tb07534.x.

Middleton E. Biological properties of plant flavonoids: An overview. *Int. J. Pharmacogn.*1996;34:344–348. doi: 10.1076/phbi.34.5.344.13245.

Miller D.J., Hawthorne S.B. Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 to 473 K. *J. Chem. Eng. Data.*2000;45:315–318. doi: 10.1021/je990278a.

Mocanu M.-M., Nagy P., Szöllősi J. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. *Molecules.*2015; 20:22578–22620. doi: 10.3390/molecules201219864.

Nardini M., Cirillo E., Natella F., Mencarelli D., Comisso A., Scaccini C. Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chem.*2002;79:119–124. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00213-3.

Oki T., Masuda M., Furuta S., Nishiba Y., Terahara N., Suda I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J. Food Sci.*2002;67:1752–1756. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08718.x.

Ong T.P., Moreno F.S., Ross S.A. Targeting the Epigenome with Bioactive Food Components for Cancer Prevention. *J. Nutrigenet. Nutrigenom.*2011;4:275–292. doi: 10.1159/000334585.

Park E.-J., Pezzuto J.M. The Pharmacology of Resveratrol in Animals and Humans. *Biochim. Biophys. Acta.*2015;1852:1071–113. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.014.  84. Khan N., Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett.*2008;269:269–280. doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.014.

Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.*2010;64:S112–S120. doi: 10.1038/ejcn.2010.221.

Pinelo M., Zornoza B., Meyer A.S. Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Sep. Purif. Technol.*2008;63:620–627. doi: 10.1016/j.seppur.2008.07.007.

Prior R.L., Lazarus S.A., Cao G., Muccitelli H., Hammerstone J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using highperformance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*2001;49:1270–1276. doi: 10.1021/jf001211q.

Pyrzynska K., Sentkowska A. Recent Developments in the HPLC Separation of Phenolic Food Compounds. *Crit. Rev. Anal. Chem.*2015;45:41–51. doi: 10.1080/10408347.2013.870027.

Qiu Y., Liu Q., Beta T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chem.*2010;121:140–147. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.021.

Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.*2008; 52:507–526. doi: 10.1002/mnfr.200700326.

Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.*2007;18:427–442. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.11.004.

Ruhul Amin A.R.M., Kucuk O., Khuri F.R., Shin D.M. Perspectives for Cancer Prevention with Natural Compounds. *J. Clin. Oncol.*2009;27:2712–2725. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6235.

Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*2005; 81(Suppl. S1):215S–217S.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*2005;45:287–306. doi: 10.1080/1040869059096.

Shahidi F., Janitha P.K., Wanasundara P.D. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.*1995;28:25–30.

Sharmila G., Bhat F.A., Arunkumar R., Elumalai P., Singh P.R., Senthilkumar K., Arunakaran J. Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *Clin. Nutr.*2014;33:718–726. doi: 10.1016/j.clnu.2013.08.011.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.*1999;299:152–178.

Solanaa M., Boschiero I., Dall’Acquab S., Bertucco A. A comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods for obtaining phenolic compounds from *Asparagus Officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids.*2015;100:201–208. doi: 10.1016/j.supflu.2015.02.014.

Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*2007;30:3268–3295. doi: 10.1002/jssc.200700261.

Su Y. *Ph.D. Thesis.* University of Arkansas for Medical Sciences; Little Rock, AR, USA: Dec 4, 2008. Molecular Regulation of Breast Cancer Susceptibility by Dietary Factors.

Surh Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.*2003; 3:768–780. doi: 10.1038/nrc1189.

Tabrez S., Priyadarshini M., Urooj M., Shakil S., Ashraf G.M., Khan M.S., Kamal M.A., Alam Q., Jabir N.R., Abuzenadah A.M., et al. Cancer Chemoprevention by Polyphenols and Their Potential Application as Nanomedicine. *J. Environ. Sci. Health.*2013;31:67–98. doi: 10.1080/10590501.2013.763577.

Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., di Majo D., Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.*2007;104:466–479. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.054.

Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.*2010;2:1231–1246. doi: 10.3390/nu2121231.

Turrini E., Ferruzzi L., Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*2015;2015:938475. doi: 10.1155/2015/938475.

Wang X.L., Hur H.G., Lee J.H., Kim K.T., Kim S.I. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*2005;71:214–219. doi: 10.1128/AEM.71.1.214-219.2005.

Wei Y.D., Sun T.T., Liu H.H., Pei Z.-L., Jiang L.-F., Li R., Huang S.-Y. The Total Flavanone of Movus Aalba Extraction and the Identification by Ultrasonic Wave. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.*2012;23:2811–2812.

Weichselbaum E., Buttriss J.L. Polyphenols in the diet. *Nutr. Bull.*2010;35:157–164. doi: 10.1111/j.1467-3010.2010.01821.x.

Wu J.-C., Lai C.-S., Lee P.-S., Ho C.-T., Liou W.-S., Wang Y.-J., Pan M.-H. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications. *Curr. Opin. Food Sci.*2016; 8:1–7. doi: 10.1016/j.cofs.2016.01.009.

Xiao J.B., Muzashvili T.S., Georgiev M.I. Advance on biotechnology for glycosylation of high-value flavonoids. *Biotechnol. Adv.*2014;32:1145–1156.

Yang C.S., Kim S., Yang G.-Y., Lee M.-J., Liao J., Chung J.Y., Ho C.-T. Inhibition of Carcinogenesis by Tea: Bioavailability of Tea Polyphenols and Mechanisms of Actions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*1999;220:213–217. doi: 10.3181/00379727-220-44368.

Yang C.S., Landau J.M., Huang M.-T., Newmark H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary Polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*2001; 21:381–406. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.381.