

*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 Agro-alimentaire**



**Réf:.....**

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

**MASTER**

***Thème***

**Evaluation du potentiel antioxydant des anthocyanes  
extraites de *Smilax aspera* et l'étude de leur cinétique de  
dégradation durant le stockage**

**Présenté par :**

**IFFOUZAR Melyna et ZERROUK Khelidja**

**Soutenu le : 01/07/2025**

**Devant le jury composé de :**

**Mme. RAMDANI Souhila**  
**M. CHIKHOUNE Amirouche**  
**Mme MEDOUNI Sonia**

**MAB**  
**Pr**  
**MCA**

**Président**  
**Encadreur**  
**Examineur**

**Année universitaire : 2024 / 2025**

# Remerciements

*Tout d'abord, nous adressons nos louanges et nos remerciements à **Dieu** le Tout-Puissant, le Clément et le Miséricordieux, qui nous a accordé la force, la persévérance et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.*

*Nous exprimons notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements vont particulièrement à notre encadrant monsieur « **Chikhouné Amirouche** », pour la confiance accordée, l'accompagnement constant, les conseils judicieux et les remarques constructives qui ont enrichi ce travail du début jusqu'à la fin.*

*Nous remercions également les membres du jury pour le temps qu'ils ont bien voulu nous accorder, leur disponibilité et l'attention portée à notre travail. Leurs observations et suggestions nous sont précieuses.*

*Nos remerciements s'étendent également à l'ensemble du personnel de laboratoires physico-chimique P.C.A qui ont facilité la partie expérimentale de ce mémoire.*

*Enfin, nous adressons notre sincère gratitude à toutes les personnes — enseignants, famille, amis — qui nous ont soutenus moralement, encouragés ou apporté leur aide à un moment ou un autre de cette aventure académique.*

# *Dédicace*

*Au nom d'Allah, Le Tout-Miséricordieux, Le Très-Miséricordieux.  
C'est par Sa grâce que j'ai trouvé la force, la patience et la persévérance  
pour mener à bien ce travail. Qu'Il soit loué pour Ses bienfaits infinis.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents, pour leurs sacrifices, leurs encouragements et  
leur soutien. Vous m'avez guidée tout au long de mes études vers le  
chemin de la réussite. Qu'Allah vous protège et vous récompense.*

*À mes sœurs adorées : Nora, Kahina et Sabrina,  
Pour votre amour, votre soutien et votre présence apaisante.*

*À mes frères : Yacine, Hamza,*

*Merci pour votre confiance, vos encouragements et votre soutien discret  
mais si précieux. Je vous suis profondément reconnaissante.*

*À ma chère binôme Mylina,  
Pour ta précieuse présence tout au long de ce parcours. Travailler à tes  
côtés a été un réel plaisir, fait de confiance, de bienveillance et d'une  
belle complicité.*

***Z.Khelidja***

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail, fruit de patience et de persévérance, à toutes les personnes qui ont cru en moi.*

***À ma mère,***

*De tout mon cœur. Ta force, ton amour inépuisable et tes sacrifices silencieux ont été le moteur de chacun de mes pas. Ce travail est autant le tien que le mien.*

***À mon père,***

*Pour sa présence discrète mais essentielle et ses sacrifices*

***À mes très chères sœurs : Radia et Leticia et à mon frère : Fares***

*Compagnons de vie, de joies et de combats. Vous êtes mon refuge, ma force tranquille et mon plus beau lien au monde. Merci pour votre amour indéfectible.*

***À Ikram,***

*Ma meilleure amie, celle qui m'écoute, me soutient et m'inspire. Ta présence a été une lumière constante.*

***À Khelidja,***

*Mon binôme, bien plus qu'un simple duo de travail. Merci pour ta loyauté, ta patience, ton sérieux, et surtout pour cette belle complicité qui a rendu ce parcours plus humain et plus vrai.*

***À toute la promotion TAA2025,***

*Pour ces années intenses, pleines de défis, d'apprentissages et de souvenirs gravés à jamais.*

***Melyna***



# Table des matières

Remercîments

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## Partie Bibliographique

I. Généralité sur les pigments et les colorants alimentaires..... 2

    I.1. Définition d'un colorant ..... 2

    I.2. Rôle des colorants dans les aliments ..... 2

    I.3. Classification des colorants ..... 2

        I.3.1. Colorants naturels..... 2

        I.3.2. Colorants de synthèse ..... 3

    I.4. Législation..... 3

II. Les colorants naturels ..... 4

    II.1. Les anthocyanes ..... 4

        II.1.1. Introduction..... 4

        II.1.2. Action antioxydante ..... 4

        II.1.3. Biodisponibilité pour la santé..... 5

        II.1.5. Sources naturelles des anthocyanes ..... 7

    II.2. Les caroténoïdes..... 8

        II.2.1. Introduction..... 8

        II.2.2. Biodisponibilité pour la santé..... 8

III. Techniques d'extraction des pigments naturels..... 9

    III.1. Extraction solide/liquide ..... 9

    III.2. Extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons ..... 10

        III.2.1. Extraction assistée par micro-ondes ..... 10

        III.2.2. Extraction assistée par ultrasons ..... 10

    III.3. Eco-extraction..... 11

IV. Généralités sur la plante étudiée : *Smilax aspera* ..... 13

    IV.1 Description botanique..... 13

    IV.2 Classification botanique ..... 13

    IV.3 Distribution géographique ..... 14

    IV.4. Compositions chimiques ..... 14

        IV.4.1. Glycosides ..... 14

IV.4.2. Flavonoïdes .....	14
IV.4.3. Saponines .....	15
IV.4.4. Alcaloïdes.....	15
IV.5 Utilisation médicinale.....	16
IV.6. Utilisation alimentaire .....	16

## **Partie Pratique**

I. Matériel et Méthodes .....	17
1.1. Matériel végétal .....	17
1.2. Extraction du colorant par macération.....	18
1.3. Dosage des anthocyanes .....	19
1.4. Dosage des polyphénols totaux .....	20
1.5. Dosage des proanthocyanidines .....	20
II. Evaluation de l'Activité antioxydante .....	21
II.1. Test du DPPH .....	21
II.2. Test du Pouvoir réducteur .....	21
II.3. Test au phosphomolybdate.....	22

## **Résultats et discussion**

I. Teneur en anthocyanes totaux.....	24
II. Teneur en polyphénols totaux.....	25
III. Teneur en proanthocyanidines.....	26
IV. Evaluation de l'activité antioxydante .....	27
IV. 1. Test DPPH.....	27
IV. 2. Test du pouvoir réducteur.....	28
IV. 3. Test au phosphomolybdate .....	29
V. Suivi de la cinétique de dégradation des anthocyanes.....	30

<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>32</b>
--	-----------

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumé**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Schéma représentatif illustre l'effet de la cavitation lors de l'extraction assistée par ultrasons	11
<b>Figure 2</b>	Les six principes qui guident l'éco-extraction.	12
<b>Figure 3</b>	Photographies des feuilles(A), fleurs(B) et les fruits(C) de <i>Smilax aspera</i> .	13
<b>Figure 4</b>	Représente la structure de base des flavonoïdes	15
<b>Figure 5</b>	Représente la structure de base de coédine	15
<b>Figure 6</b>	Représente la structure de base de la morphine	15
<b>Figure 7</b>	Poudres de fruits préparées, séchage à l'étuve (A) et lyophilisée (B).	18
<b>Figure 8</b>	Tenure en anthocyanes totaux dans les deux poudres des baies de <i>Smilax aspera</i>	24
<b>Figure 9</b>	Tenure en polyphénols totaux dans les deux poudres des baies de <i>Smilax aspera</i>	25
<b>Figure 10</b>	Tenure en proanthocyanidines totaux dans les deux poudres des baies de <i>Smilax aspera</i>	26
<b>Figure 11</b>	Activité de piégeage du radical DPPH des fruits de <i>Smilax aspera</i>	27
<b>Figure 12</b>	Résultats du pouvoir réducteur des extraits des fruits de <i>Smilax aspera</i>	28
<b>Figure 13</b>	Résultats du test phosphomolybdate des extraits des fruits de <i>Smilax aspera</i> .	29
<b>Figure 14</b>	Courbe d'évolution de la teneur en anthocyanes (mg/g MS) selon la température de conservation.	30

## Liste des tableaux

Tableau I	La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes	7
Tableau II	Classification botanique de <i>Smilax Aspera</i> .	14



## Liste des abréviations

MS	Matière Sèche
PS	Poids Sec ou Poids Frais selon le contexte (souvent 100 g PS = 100 g Poids Sec)
TAC	Teneur en Anthocyanes Totales
C3GE	Cyanidine-3-glucoside équivalent
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (radical libre utilisé pour le test antioxydant)
EAG	Équivalent Acide Gallique
ECy	Équivalent Cyanidine
PCA	Physico-Chimique Alimentaire (nom du laboratoire dans votre cas)
UAE	Ultrasound Assisted Extraction (Extraction assistée par ultrasons)
MAE	Microwave Assisted Extraction (Extraction assistée par micro-ondes)
TCA	Acide Trichloracétique
FeSO <sub>4</sub>	Sulfate Ferreux
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de sodium
KCl	Chlorure de potassium
HCl	Acide chlorhydrique
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Ferricyanure de potassium
FeCl <sub>3</sub>	Chlorure ferrique
UV-Vis	Ultraviolet-Visible (spectrophotométrie)
nm	Nanomètre (longueur d'onde)

# Introduction

## Introduction

La couleur occupe une place fondamentale dans l'acceptabilité des aliments. En effet, elle influence directement la perception de fraîcheur, de qualité et d'attrait sensoriel des produits alimentaires par les consommateurs (**Landim Neves *et al.*, 2021**). Pour répondre aux attentes croissantes du marché, les industriels agroalimentaires font massivement appel à des colorants naturels ou synthétiques pour compenser les pertes de couleur lors des procédés, améliorer l'apparence visuelle ou homogénéiser les produits (**Delgado-Vargas *et al.*, 2000**).

Cependant, la majorité des colorants utilisés dans les aliments transformés sont des colorants de synthèse, fabriqués chimiquement au laboratoire. Bien que réglementés, plusieurs de ces additifs suscitent des inquiétudes en raison de leurs effets potentiels sur la santé humaine, notamment des risques allergiques, cancérigènes ou de troubles comportementaux chez l'enfant (**Hallagan *et al.*, 1995 ; Beutler, 2011**). Cette prise de conscience a favorisé l'émergence d'un intérêt grandissant pour des alternatives naturelles, perçues comme plus sûres, écologiques et bénéfiques pour la santé.

C'est dans ce contexte que se pose la problématique suivante : « Comment remplacer efficacement les colorants synthétiques par des colorants naturels végétaux, tout en préservant les propriétés technologiques et les effets antioxydants des produits alimentaires ? »

Afin de répondre à cette problématique, notre étude a pour objectif l'extraction et la valorisation de colorants naturels, notamment les anthocyanes, à partir des fruits de *Smilax aspera*, une plante réputée pour sa richesse en composés bioactifs. Ces pigments se distinguent non seulement par leur capacité à apporter une coloration vive aux produits alimentaires, mais également par leur rôle fonctionnel, lié à leurs propriétés antioxydantes reconnues, participant ainsi à la protection de l'organisme contre le stress oxydatif et certaines pathologies chroniques.

Notre document est structuré en deux volets, le premier évoque une synthèse bibliographique sur les colorants alimentaires, en mettant l'accent sur les différences entre colorants synthétiques et naturels, ainsi que sur les propriétés des anthocyanes extraites de la plante *Smilax aspera*. Le deuxième volet présente la méthodologie expérimentale adoptée pour l'extraction des composés colorants, l'évaluation de leur activité antioxydante, ainsi que l'étude de leur stabilité au cours du stockage. Enfin, notre travail se conclut par une synthèse générale des résultats, accompagnée de recommandations et de perspectives pour de futures recherches dans ce domaine.

# *Synthèse bibliographique*

### **I. Généralité sur les pigments et les colorants alimentaires**

#### **I.1. Définition d'un colorant**

Les colorants alimentaires désignent toute substance, pigment ou composé conférant une teinte lorsqu'il est incorporé à un aliment ou à une boisson. Ils sont utilisés principalement pour restaurer, renforcer ou modifier l'aspect visuel des denrées alimentaires. Ils jouent un rôle important dans l'attractivité du produit final. Ces colorants peuvent se présenter sous différentes formes : liquides, gels, pâtes ou poudres, et sont employés aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que dans la préparation culinaire domestique (Kumudu *et al.*, 2015).

#### **I.2. Rôle des colorants dans les aliments**

Selon Delgado-Vargas *et al.* (2010), Lakshmi (2014) et Albuquerque *et al.* (2020), l'ajout de colorants dans les produits alimentaires vise principalement à :

- ✓ Redonner la couleur aux aliments après la transformation ou le stockage.
- ✓ Rendre les couleurs naturelles plus vives pour donner une impression de fraîcheur.
- ✓ Améliorer l'apparence visuelle des produits dont l'aspect brut est peu attrayant.
- ✓ Faciliter la reconnaissance et l'évaluation de la qualité des aliments par le consommateur.
- ✓ Rendre le produit plus attractif en améliorant son aspect global et en diversifiant l'offre visuelle sur le marché.

#### **I.3. Classification des colorants**

Les colorants alimentaires peuvent être classés selon plusieurs critères, en fonction de l'approche choisie. Une première classification s'appuie sur leur couleur. Une autre méthode repose sur leur structure chimique, permettant de distinguer notamment les colorants azotés, tels que les colorants azoïques, des colorants non azotés. Enfin, une classification largement utilisée dans les ouvrages scientifiques se fonde sur l'origine des colorants. Selon leur origine, les colorants alimentaires se divisent en deux grandes catégories :

##### **I.3.1. Colorants naturels**

Les colorants naturels proviennent de sources naturelles comme des végétaux, des minéraux, des animaux ou encore des bactéries. On les perçoit souvent comme étant plus

sains et plus écologiques que les colorants artificiels (**Beutler, 2011 ; Houdjedj, 2012**). Ils comprennent par exemple les anthocyanes, la chlorophylle ou la curcumine.

### **I.3.2. Colorants de synthèse**

Ils sont produits par l'industrie chimique. Ils se subdivisent en deux sous-groupes :

- a. Colorants identiques à ceux trouvés dans la nature** : possèdent une structure chimique exactement semblable à celle des colorants naturels, mais sont produits par synthèse en laboratoire, comme le bêta-carotène synthétique.
- b. Colorants artificiels** : sont des composés synthétiques, inexistant à l'état naturel. Ils sont fabriqués en laboratoire pour répondre à des besoins technologiques précis, comme la tartrazine ou le bleu brillant FCF.

### **I.4. Législation**

En Algérie, l'utilisation des colorants alimentaires est encadrée par un dispositif juridique composé de lois et de décrets exécutifs publiés au Journal officiel. La Loi n°09-03 du 25 février 2009, relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes (**JORA n°15 du 1er mars 2009**), modifiée par la Loi n°18-09 du 10 juin 2018 (**JORA n°35 du 13 juin 2018**), pose les principes fondamentaux en matière de sécurité, de salubrité et de transparence des denrées alimentaires.

Son article 8 autorise l'incorporation des additifs alimentaires, y compris les colorants, dans les produits destinés à la consommation humaine, dans les limites fixées par voie réglementaire. Ces conditions sont établies par le Décret exécutif n°12-214 du 15 mai 2012 (**JORA n°28 du 16 mai 2012**), qui détermine la liste des additifs autorisés, leurs fonctions technologiques (comme les colorants), ainsi que leurs limites maximales d'utilisation selon la nature des denrées alimentaires.

En complément, le Décret exécutif n°13-378 du 9 novembre 2013 (**JORA n°56 du 10 novembre 2013**) fixe les règles relatives à l'information du consommateur, en imposant un étiquetage clair et lisible indiquant notamment la présence des additifs, les conditions de conservation, la quantité nette, la date limite, le numéro de lot et toute autre information utile. Ces textes garantissent une utilisation contrôlée, transparente et sécurisée des colorants alimentaires dans le respect des normes sanitaires nationales.

En Union Européenne, la législation sur les additifs repose sur le principe des « listes positives », selon lequel un colorant ne peut être utilisé que s'il figure explicitement parmi

les substances autorisées. Cette réglementation, définie dans le Règlement (CE) n° 1333/2008, ne distingue pas formellement entre colorants naturels et synthétiques, tous étant soumis aux mêmes exigences d'évaluation de sécurité (*Journal officiel de l'Union européenne*, 2008).

## II. Les colorants naturels

### II.1. Les anthocyanes

#### II.1.1. Introduction

Le terme « anthocyane », dérivé des racines grecques *anthos* (fleur) et *cyanus* (bleu), désigne une classe de pigments hydrosolubles appartenant à la famille des flavonoïdes, largement distribués dans les plantes vasculaires. Ces composés possèdent la capacité d'absorber la lumière dans le spectre visible, ce qui permet de les identifier visuellement (**Kong *et al.*, 2003**). Ils jouent un rôle essentiel dans la coloration des organes reproducteurs et des fruits, conférant une large palette de teintes vives allant de l'orange au bleu, en passant par le rouge, le rose et le violet (**Turker *et al.*, 2004 ; Valls *et al.*, 2009**).

Les anthocyanes font partie intégrante d'une large classe de composés phénoliques connue sous le nom de flavonoïdes (**Smeriglio *et al.*, 2016**). Les flavonoïdes se caractérisent par une structure chimique de base comportant quinze atomes de carbone, organisée selon un agencement C6-C3-C6, constitué de deux cycles aromatiques liés par un hétérocycle central de type pyrane. Cette structure de base peut être modifiée par divers groupements fonctionnels, notamment les groupes hydroxyle, méthoxyle et O- $\beta$ -D-glucosyle, qui influencent leurs propriétés chimiques et biologiques (**Pascual-Teresa *et al.*, 2010 ; Routray et Orsat, 2019**).

#### II.1.2. Action antioxydante

Les composés qui s'oxydent facilement sont généralement de bons antioxydants, car ils ont la capacité de céder un électron ou un atome d'hydrogène pour neutraliser les radicaux libres, responsables du stress oxydatif. Les anthocyanes présentent une activité antioxydante principalement grâce à leurs aglycones. En tant que polyphénols, elles possèdent des groupes hydroxyles phénoliques capables de libérer des atomes d'hydrogène, ce qui leur permet d'inactiver efficacement les radicaux libres. Plusieurs études ont montré que la teneur en anthocyanes ainsi que leur pouvoir antioxydant contribuent aux effets protecteurs des fruits et légumes contre les maladies chroniques et dégénératives (**Nguyen, 2018**).

### II.1.3. Biodisponibilité pour la santé

Les anthocyanes sont valorisés pour leurs effets positifs sur la santé, principalement en raison de leurs capacités antioxydantes. Grâce à cette propriété, elles contribuent à la protection des tissus cellulaires contre les dommages induits par les radicaux libres, participant ainsi à la prévention de diverses maladies. La consommation d'aliments riches en anthocyanes est notamment liée à l'amélioration de la vision et à la diminution des risques de maladies cardiovasculaires. De plus, elles sont reconnues pour leurs propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires (Tsuda, 2012 ; Pojeret *et al.*, 2013).

Traditionnellement, la biodisponibilité des anthocyanes était perçue comme limitée, en raison des faibles concentrations détectées dans le sang et les urines comparativement aux quantités ingérées. Il était alors suggéré que leur action s'exerçait principalement de manière locale, en protégeant les muqueuses gastro-intestinales des effets néfastes des radicaux libres, ce qui pourrait freiner le développement de pathologies digestives telles que les cancers de l'estomac ou du côlon (Gee *et al.*, 2001 ; Prior, 2003). Cependant, des recherches plus récentes ont nuancé cette perspective. Bien que les anthocyanes soient peu absorbés sous leur forme native dans l'estomac et l'intestin grêle, entraînant des concentrations sanguines modérées, leurs métabolites sont identifiés dans les urines en quantités proportionnelles à l'apport (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010 ; Czanket *et al.*, 2013).

Cette transformation métabolique est facilitée par l'action d'enzymes dans l'intestin grêle et, de manière significative, par la flore bactérienne du côlon, aboutissant à la formation d'acides phénoliques et d'autres dérivés plus facilement assimilables par la circulation sanguine (Lin *et al.*, 2011 ; Bohn, 2014). En outre, les anthocyanes pourraient positivement influencer l'équilibre microbien du gros intestin, en favorisant la croissance de bactéries aux effets probiotiques (Del Rio *et al.*, 2010 ; Gasperottiet *et al.*, 2014).

### II.1.4. Stabilité des anthocyanes

Les anthocyanes sont des composés particulièrement instables et sensibles à la dégradation. Leur stabilité est optimale en milieu acide. Plusieurs facteurs peuvent influencer leur stabilité, notamment le pH, la température de stockage, la structure chimique, la lumière, l'oxygène, ainsi que la présence d'enzymes (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

### a. Effet du pH

Les anthocyanes se comportent en milieu aqueux comme de véritables indicateurs de pH, en changeant de couleur selon l'acidité du milieu (**Malien-Aubert *et al.*, 2001**). À pH acide, elles apparaissent rouges, à pH intermédiaire, elles deviennent bleues, et à pH élevé, elles deviennent incolores. Ces variations résultent d'un équilibre entre différentes formes structurales, directement influencé par le pH.

- À des **pH inférieurs à 2**, la forme prédominante est le cation flavylium, responsable des teintes rouges et pourpres. C'est dans ces conditions que les anthocyanes sont les plus stables.
- A **Ph= 4**, les anthocyanes se transforment en formes quinoïdales bleues.
- À des **pH compris entre 5 et 6**, deux formes apparaissent : la pseudo-base carbinol (incolore) et la chalcone (jaune clair).
- Au-delà de **pH 7**, les anthocyanes se dégradent progressivement, en fonction de la nature de leurs groupes substituants (**Neill, 2002 ; Cavalcantiet *al.*, 2011**).

### b. Effet de la température

La température est un facteur déterminant dans la stabilité des anthocyanes. Plus la température augmente, que ce soit durant le traitement thermique ou le stockage, plus le taux de dégradation des anthocyanes s'accélère. Dans un environnement légèrement acide (pH 2 à 4), l'élévation de la température provoque l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, entraînant la rupture des chaînes glycosyliques. Cette réaction libère les aglycones, des formes instables et moins colorées que les anthocyanes glycosylés, ce qui provoque une perte visible de couleur, la dégradation thermique débute généralement par la formation d'une chalcone, une structure incolore. Cette transformation initiale est suivie par la production de composés brunâtres, en particulier en présence d'oxygène, accentuant ainsi la perte de qualité des anthocyanes (**Rein, 2005**).

### c. Effet de l'oxygène

L'oxygène intervient de manière significative dans les mécanismes de dégradation des anthocyanes. Il peut agir soit par oxydation directe, soit en activant des enzymes oxydatives qui interagissent avec les anthocyanes, entraînant la formation de composés incolores ou brunâtres (**Cavalcantiet *al.*, 2011**).

D'après les travaux de Cavalcanti et ses collaborateurs, une concentration élevée en oxygène (entre 60 % et 100 %) stimule initialement l'accumulation des anthocyanes et des composés phénoliques au cours des premiers jours de stockage à froid (de 0 à 7 jours). Cependant, cet effet bénéfique diminue progressivement avec la prolongation de la durée de conservation.

### II.1.5. Sources naturelles des anthocyanes

Les principales sources alimentaires d'anthocyanes sont les fruits et légumes présentant des teintes rouges, violettes ou bleutées. On les retrouve en abondance dans les baies (telles que les bleuets, fraises, mûres, framboises et canneberges), les raisins à peau rouge, ainsi que dans certains fruits comme les pommes et les poires. Des légumes pigmentés tels que les carottes pourpres, les pommes de terre rouges, les radis et les choux rouges constituent également d'importantes sources. Il convient toutefois de noter certaines exceptions : par exemple, la couleur rouge des tomates provient du lycopène, tandis que celle des betteraves est due aux bétalaines, et non aux anthocyanes (**Burton-Freeman et al., 2016**).

La composition en anthocyanes des aliments varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment le cultivar ou la variété, le stade de maturité, la région de culture, les conditions climatiques ou saisonnières, ainsi que les procédés de transformation et les conditions de stockage (**Rodriguez-Amaya, 2019 ; Amarowicz et al., 2009**). Le tableau I représente la teneur en anthocyanes dans quelques fruits et légume

**Tableau I :** La teneur en anthocyanes de quelques fruits et légumes (**Willig, 2009**).

Sources (Fruits et Légumes)	Nom scientifique	Concentration en anthocyanes (mg / 100g)
Pomme	<i>Malus pumila</i> Mill.	1-17
Myrtille	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	300-808
Raisin	<i>Vitis vinifera</i> L.	27-120
Oignon rouge	<i>Allium cepa</i> L.	~49
Carotte pourpre	<i>Daucus carota</i> L.	38-98
Radis rouge	<i>Raphanus sativus</i> L.	11-60
Maïs pourpre	<i>Zea mays</i> L.	~1640
Chou rouge	<i>Brassica oleracea</i> L.	~322
Fraise	<i>Fragaria ananassa</i> D.	13~55

### II.2. Les caroténoïdes

#### II.2.1. Introduction

Les caroténoïdes sont des pigments naturels liposolubles, largement répandus dans le règne végétal. Ils sont responsables des teintes jaune, orange et rouge observées dans de nombreux fruits, légumes et fleurs, et jouent un rôle essentiel dans l'attractivité visuelle des aliments (**Faure *et al.*, 1999 ; Alquezar *et al.*, 2008**). On les retrouve principalement dans les plantes, les algues, les champignons, et certaines bactéries comme les cyanobactéries. En revanche, les animaux ne peuvent pas les synthétiser, ils les acquièrent exclusivement par leur alimentation (**Stahl *et al.*, 2003 ; Tapiero *et al.*, 2004 ; Mueller *et al.*, 2011 ; Stephenson *et al.*, 2021**).

Grâce à leurs propriétés antioxydantes et leur rôle de précurseurs de la vitamine A, les caroténoïdes sont couramment utilisés comme additifs dans les secteurs de l'alimentation et de la pharmacie (**Nicol et Maudet, 2000**).

#### II.2.2. Biodisponibilité pour la santé

Les caroténoïdes occupent une place essentielle dans le maintien de la santé humaine. En tant que sources naturelles de vitamine A et puissants antioxydants, ils jouent un rôle clé dans la protection des cellules et le bon fonctionnement du système immunitaire (**Stahl *et al.*, 1996 ; Olson, 1989**).

Leur présence dans l'organisme contribue à la prévention de diverses maladies chroniques, notamment les troubles cardiovasculaires, le vieillissement de la peau ainsi que certains types de cancer (**Block *et al.*, 2002 ; Schagen, 2012**). Cependant, leur biodisponibilité varie fortement selon plusieurs facteurs : l'âge, le sexe, les besoins de l'organisme, ainsi que la forme chimique du caroténoïde. Leur absorption intestinale dépend aussi de la présence de lipides dans l'alimentation (**van het Hof *et al.*, 2000**).

#### II.2.3. Stabilité des caroténoïdes

Les caroténoïdes présentent une stabilité limitée. Ils sont particulièrement sensibles à la lumière, à l'oxygène, à la chaleur et aux variations de pH. Ces facteurs peuvent entraîner leur dégradation ou leur isomérisation, provoquant ainsi une perte de couleur et une diminution de leur activité biologique (**Wahyuni et Widjanarko, 2015**).

### II.2.4. Sources naturelles des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles produits par les plantes, les algues, les champignons et certaines bactéries comme les cyanobactéries. Les animaux ne peuvent pas les synthétiser, ils les obtiennent donc par l'alimentation, ce qui influence leur coloration (Mueller *et al.*, 2011 ; Stephenson *et al.*, 2021).

On les retrouve dans de nombreux aliments, avec des teintes allant du jaune au rouge vif. Le lycopène, responsable des couleurs rouges, est présent dans la tomate, la carotte, la pastèque, le pamplemousse rose et le melon d'eau. Les caroténoïdes jaunes comme la lutéine et la zéaxanthine se trouvent dans des fruits, légumes à feuilles vertes (épinards, brocolis), dans le maïs, les jaunes d'œufs et les produits laitiers. Le bêta-carotène, très abondant dans la spiruline, peut aussi être extrait d'autres sources naturelles ou synthétisé. Quant au bêta-8-apocaroténal, il est naturellement produit par certaines plantes comme les agrumes et les herbes (Andriniaina, 2007). En résumé, les caroténoïdes, majoritairement d'origine végétale, jouent un rôle essentiel dans la coloration des aliments et présentent des bénéfices pour la santé humaine.

## III. Techniques d'extraction des pigments naturels

### III.1. Extraction solide/liquide

L'isolement des principes actifs tels que les composés phénoliques et les colorants est généralement réalisé par extraction solide-liquide. Parmi les différentes méthodes existantes, l'extraction par solvant est la plus ancienne et demeure la plus utilisée (Eldarra, 2013). Elle consiste à mettre en contact un matériau solide (comme une matrice végétale) avec un liquide appelé « solvant », afin d'extraire les composés solubles présents dans le solide.

Bien que les anthocyanes soient hydrosolubles, leur extraction est optimisée par l'utilisation de solvants organiques comme le méthanol ou l'éthanol, combinés à de l'eau. Cette combinaison améliore non seulement le rendement d'extraction, mais contribue également à la stabilité des composés ciblés (Abdel-Aal *et al.*, 2018 ; Hong *et al.*, 2020). De plus, l'acidification du solvant est fréquemment utilisée pour stabiliser les anthocyanes, car le cation flavylium est plus stable à pH acide (Brooks et Celli, 2019). Des acides faibles et peu corrosifs, tels que l'acide malique ou l'acide tartrique à 1,25 % (Todaro *et al.*, 2009), ainsi que des solutions contenant 0,2 % d'acide formique (Boulekbache-Makhlouf *et al.*,

2013) ou jusqu'à 5 % d'acide phosphorique (Trikas *et al.*, 2016), ont été identifiés comme efficaces pour l'extraction des anthocyanes.

### **III.2. Extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons**

#### **III.2.1. Extraction assistée par micro-ondes**

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques caractérisées par la présence simultanée d'un champ électrique et d'un champ magnétique, orientés perpendiculairement entre eux et à la direction de propagation. Elles se déplacent dans le vide avec des fréquences comprises entre 300 MHz et 300 GHz. Toutefois, pour éviter les interférences avec les systèmes de radiocommunication et les radars, les micro-ondes utilisées dans les domaines domestique et industriel sont généralement fixées à une fréquence de 2,45 GHz (Camel, 2001).

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique simple et performante, permettant de réduire le temps d'extraction ainsi que la quantité de solvant utilisée. Toutefois, cette méthode présente certaines limites, notamment un rendement moins élevé lorsque les solvants ou les composés à extraire sont apolaires, ainsi qu'une température de fonctionnement relativement élevée pouvant affecter les substances sensibles à la chaleur (Michel, 2011).

Son principe consiste à transmettre, de manière ciblée, une grande quantité d'énergie à l'intérieur des cellules végétales ou biologiques afin de provoquer leur rupture, tout en préservant l'intégrité des composés extraits. L'eau naturellement présente dans la matrice absorbe l'énergie des micro-ondes, ce qui entraîne une élévation rapide de la température et de la pression interne. Ce phénomène favorise l'éclatement des cellules et facilite ainsi la libération des substances chimiques, améliorant leur extraction (Eldarra, 2013).

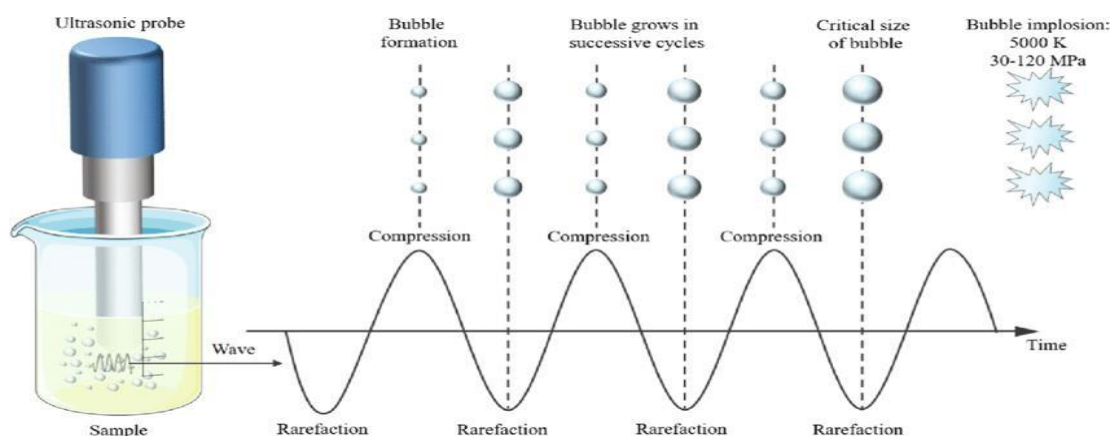
#### **III.2.2. Extraction assistée par ultrasons**

L'énergie ultrasonore se compose d'ondes mécaniques vibratoires dont les fréquences sont supérieures à celles perceptibles par l'oreille humaine, typiquement au-delà de 20 kHz (Kumar *et al.*, 2021). Cette forme d'énergie est particulièrement polyvalente et trouve de nombreuses applications, notamment dans le secteur industriel. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une méthode moderne, facile à mettre en œuvre, efficace et économique, présente des avantages significatifs, notamment une réduction drastique du

temps d'extraction, souvent limitée à quelques minutes, et une grande reproductibilité des résultats (**Chemat *et al.*, 2011**).

Le principe de cette méthode repose sur la propagation d'ondes sonores à haute fréquence dans un milieu. Lorsqu'elles traversent un matériau, ces ondes créent des cycles successifs de compression et de décompression. Cette alternance entraîne la formation de bulles microscopiques dans le fluide, qui se dilatent puis se contractent. À proximité d'une surface solide, l'effondrement irrégulier de ces cavités engendre des micro jets de liquide à grande vitesse, un phénomène connu sous le nom de cavitation acoustique (**Benamor, 2008**) (figure1).

Ce phénomène physique induit une perturbation des membranes cellulaires, facilitant leur rupture et la libération des composés intracellulaires (**Bourgou *et al.*, 2016**). De cette manière, l'action mécanique des ultrasons améliore la pénétration du solvant à l'intérieur des cellules et favorise le transfert de matière. La lyse cellulaire et l'efficacité du transfert sont ainsi considérées comme les deux mécanismes majeurs qui expliquent les bonnes performances de cette méthode d'extraction (**Ghitescu *et al.*, 2015**).



**Figure 1** : Schéma représentatif illustre l'effet de la cavitation lors de l'extraction assistée par ultrasons (**Rahman et Lamsal, 2021**)

### III.3. Eco-extraction

L'éco-extraction, également connu sous le nom d'extraction verte regroupe un ensemble de méthodes innovantes et respectueuses de l'environnement permettant d'extraire des composés actifs à partir de matrices végétales. Elle s'inscrit pleinement dans une démarche de développement durable, avec pour objectifs de réduire la consommation énergétique, de remplacer les solvants polluants par des alternatives plus sûres, et de valoriser les ressources naturelles renouvelables (**Chemat *et al.*, 2012**).

Un des éléments clés de cette approche repose sur le choix du solvant, qui influence non seulement le rendement de l'extraction, mais aussi la pureté des extraits, leur innocuité et l'empreinte écologique du procédé. Contrairement aux solvants conventionnels d'origine pétrochimique, les solvants verts, comme l'eau, l'éthanol biosourcé ou encore le CO<sub>2</sub> supercritique, sont préférés pour leur biodégradabilité, faible toxicité et caractère renouvelable (Galanakis, 2013 ; Chemat et Vian, 2014).

Ce choix judicieux du solvant est d'ailleurs intrinsèquement lié aux principes fondamentaux qui guident l'éco-extraction. Ces principes, essentiels pour garantir un procédé respectueux de l'environnement tout en assurant la qualité et la sécurité des extraits, englobent non seulement l'utilisation de ces solvants alternatifs, mais aussi une vision holistique de l'extraction, de la ressource initiale au produit final. La figure 2 illustre les six piliers de l'éco-extraction.

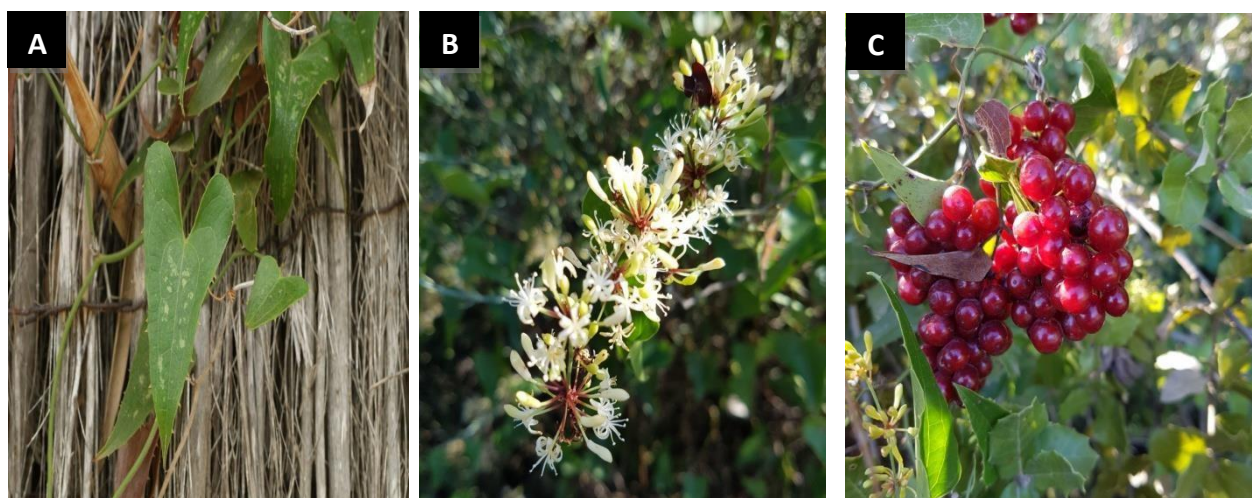


**Figure 2 :** Les six principes qui guident l'éco-extraction.

## IV. Généralités sur la plante étudiée : *Smilax aspera*

### IV.1 Description botanique

La salsepareille d'Europe est une plante grimpante vivace qui peut atteindre, voire dépasser un mètre de hauteur, et parfois s'élever jusqu'à six mètres (Figure3). Elle adopte un port rampant ou grimpant et présente une forte ramification. Sa propagation se fait principalement par ses rhizomes, ce qui lui confère une grande résistance : même après une coupe ou un incendie, elle est capable de repousser à partir de ces structures souterraines (Ghédira et Goetz, 2016).



**Figure 3** : Photographies des feuilles (A), fleurs (B) et les fruits(C) de *Smilax aspera*.

### IV.2 Classification botanique

Selon les règles de la nomenclature botanique, *Smilax aspera* est classée de la manière décrite dans le tableau II :

**Tableau II : Classification botanique de *Smilax Aspera*.**

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	Liliales
Famille	Smilacaceae
Genre	Smilax

### IV.3 Distribution géographique

*Smilax aspera* est une plante grimpante largement répandue dans les régions méditerranéennes, notamment en Afrique du Nord, en Europe du Sud, au Proche-Orient et dans certaines zones d'Asie comme l'Inde et la Chine du Sud-ouest (**Powo, 2024**). Elle pousse généralement dans les maquis, les forêts claires, les haies, les zones ombragées et humides, souvent sur des sols calcaires.

### IV.4. Compositions chimiques

#### IV.4.1. Glycosides

Les glycosides sont des substances très présentes dans les plantes. Leur structure comprend une partie sucrée (glycone) et une partie non sucrée (aglycone). Ils sont connus pour leurs effets biologiques et sont largement utilisés en pharmacognosie (**Bartnik et Facey, 2024**).

#### IV.4.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles présentes dans de nombreuses plantes. Ils apportent la couleur à certains fruits, fleurs et feuilles (**Morgane, 2020**). Ils protègent la plante contre les agressions extérieures. Chez l'être humain, ils sont appréciés pour leurs propriétés antioxydantes et leur rôle protecteur contre le stress oxydatif et certaines infections (**Pourcel et al., 2007**). La figure ci-dessous illustre la structure chimique de base des flavonoïdes, caractérisée par un squelette de type **C6-C3-C6**, composé de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un pont à trois carbones formant le cycle central (C).

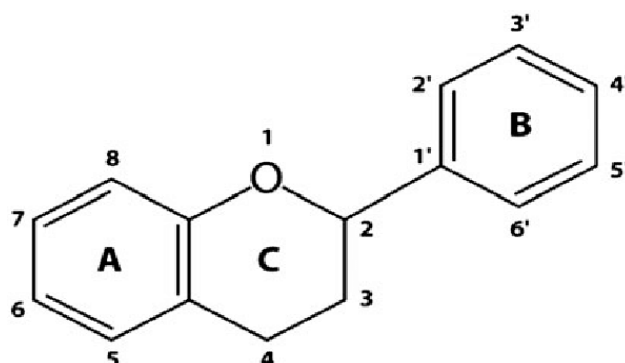


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Pietta, 2000).

#### IV.4.3. Saponines

Les saponines sont des substances naturelles présentes dans de nombreuses plantes. Leur nom vient du mot latin *sapo* (savon), car elles forment de la mousse dans l'eau (Bruneton, 1999). Elles sont composées d'une partie sucrée (hydrophile) et d'une partie grasse (aglycone), de type stéroïdique ou triterpénique (Estrada *et al.*, 2000 ; Chaieb, 2010). Elles protègent la plante contre les microbes et les insectes, et chez l'homme, elles ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anticancéreux et antibactériens (Sparg *et al.*, 2004 ; Faizal et Geelen, 2013).

#### IV.4.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés naturels présents dans les plantes. Ils contiennent de l'azote et viennent souvent des acides aminés (Bush et Fannin, 2009). Certains, comme la codéine (figure 5) et la morphine (Figure 6), sont utilisés en médecine pour soulager la douleur (Gutierrez-Grijalva *et al.*, 2020). Dans *Smilax aspera*, ils apportent des effets anti-inflammatoires et antiseptiques.

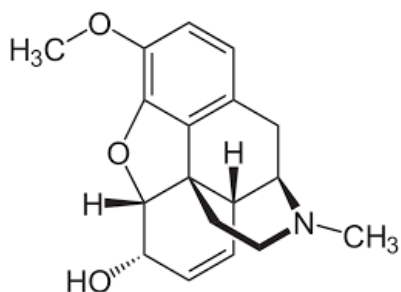


Figure 5 : Structure chimique de codéine.

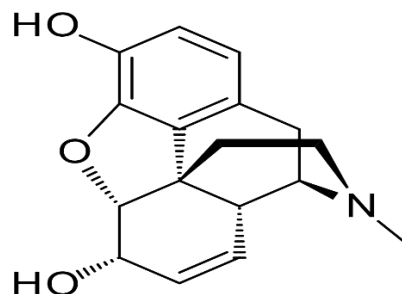


Figure 6 : Structure chimique de morphine

### IV.5 Utilisation médicinale

Les salsepareilles sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies comme le diabète, le rhumatisme, l'anémie et même les piqûres de serpent (**Harb et al., 2009**). Des recherches montrent que leurs rhizomes ont plusieurs effets bénéfiques : antimicrobiens (**Hirota et al., 2016**), anti-inflammatoires et immunomodulateurs (**Shu et al., 2006**), ainsi qu'un effet hypoglycémiant (**Romo-Pérez et al. 2019**).

### IV.6. Utilisation alimentaire

En dehors de ses propriétés médicinales, *Smilax aspera* présente également un intérêt alimentaire, notamment dans certaines régions méditerranéennes où ses jeunes pousses sont consommées comme légumes sauvages. Elles sont préparées par cuisson et intégrées dans des plats traditionnels (**Tardio et al., 2006**).

De plus, les fruits de *Smilax aspera*, riches en anthocyanes, offrent un potentiel prometteur comme colorant naturel dans l'industrie agroalimentaire. En plus de leur fonction colorante, ces composés apportent une valeur antioxydante intéressante, ce qui renforce leur utilisation possible dans les aliments fonctionnels et sains (**Kong et al., 2003**).

# *Partie pratique*

### I. Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire physico-chimique P.C.A de l'université Bejaia durant la période d'avril et mai 2025. Elle a pour objectif d'extraire des colorants naturels à partir d'une matrice végétale, puis d'évaluer leur activité antioxydante. L'idée est de valoriser ces pigments, en particulier les anthocyanes, non seulement pour leurs propriétés colorantes mais aussi pour leur intérêt potentiel en tant qu'agent antioxydant.

#### 1.1. Matériel végétal

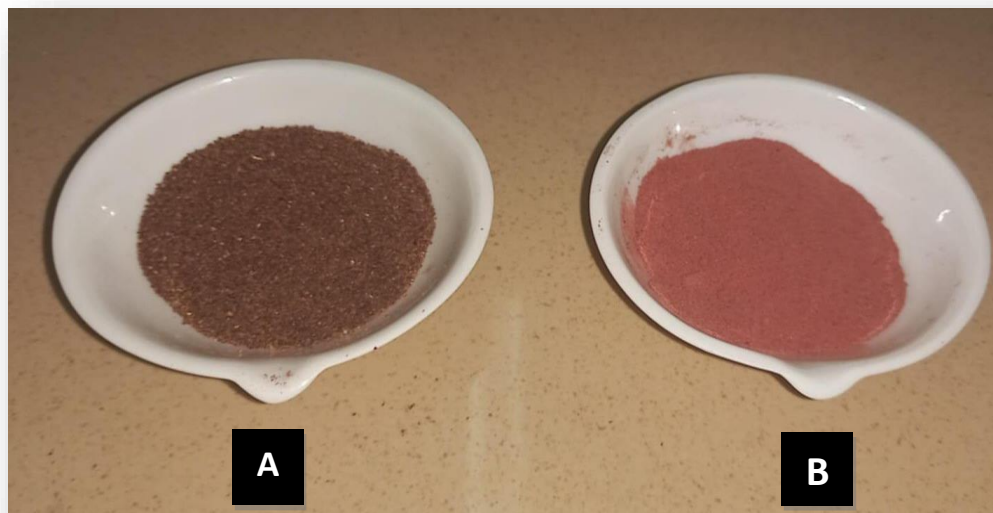
Dans ce travail, nous avons utilisé les fruits de *Smilax Aspera*, une plante grimpante de la famille des *Smilacaceae*, dont les fruits présentent un intérêt particulier en raison de leur richesse en composés antioxydants et en pigments naturels. Les fruits mûrs ont été récoltés à la main en mois de mars 2024 dans la région montagneuse de Sidi Ayad (Sidi Aïch, Béjaia), un environnement naturel propice au développement de cette espèce.

Après la récolte, les fruits ont été préparés selon les étapes suivantes : les fruits matures et sains ont été sélectionnés et cueillis manuellement, puis été soigneusement lavés à l'eau distillée afin d'éliminer toutes les impuretés et les résidus indésirables. Par la suite les baies sont soigneusement nettoyées, coupées puis les parties non comestibles sont retirées et la pulpe et les grains sont séparés. Ils sont par la suite séparés en deux lots :

Le **premier lot** a été soumis à une lyophilisation (séchage à froid sous vide) afin de préserver au maximum les composés thermosensibles.

Le **deuxième lot** a été séché dans une étuve ventilée à température de 40°C, jusqu'à l'élimination complète de l'humidité.

Les baies séchées sont par la suite broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à ce qu'on obtienne une poudre fine. Par la suite, cette dernière a été tamisée en utilisant un tamis de 250 µm de diamètre afin d'obtenir une poudre homogène. Les poudres obtenues ont été stockées dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière afin d'éviter toute détérioration de l'échantillon et pour réaliser l'extraction (figure 7).



**Figure (7) : Poudres de fruits préparées, séchage à l'étuve (A) et lyophilisée (B).**

### **1.2. Extraction du colorant par macération**

#### **➤ Préparation de la solution d'extraction**

La solution d'extraction utilisée est composée de l'eau acidifiée, préparée en mélangeant 15% d'acide chlorhydrique (HCl) avec 85% d'eau distillée sous agitation afin d'obtenir une solution homogène (**Benchikh *et al.*, 2020**).

#### **➤ Principe**

La macération est une technique d'extraction qui consiste à faire tremper une plante dans un liquide pour permettre aux substances qu'elle contient, comme les colorants, de se diffuser dans ce liquide. Ce procédé est doux, simple, et se fait généralement à température ambiante.

#### **➤ Protocole**

Une quantité de 750 mg de poudre ont été introduite dans 50ml de solution HCl-eau, puis le mélange a été soumis à une agitation pendant 1h30 à température ambiante, le mélange est ensuite centrifugé à 4000 tr/min pendant 15 min. Après centrifugation, le surnageant contenant le colorant extrait a été récupéré. L'extrait obtenu est ensuite conservé dans des flacons en verre brun au frigidaire afin d'effectuer des analyses ultérieures.

### 1.3. Dosage des anthocyanes

#### ➤ Principe

La teneur totale en anthocyanes (TAC) a été déterminée selon la méthode décrite par (Tonutare *et al.*, 2014), basée sur la méthode différentielle de pH. Cette méthode exploite les propriétés structurales des anthocyanes, qui présentent une couleur intense à pH 1,0 et deviennent pratiquement incolores à pH 4,5. Cette variation permet une quantification spécifique des anthocyanes, en éliminant l'interférence d'autres pigments ou composés phénoliques.

La différence d'absorbance entre les deux pH est mesurée à deux longueurs d'onde : 510 nm (correspondant à l'absorption maximale des anthocyanes) et 700 nm (afin de corriger la turbidité). La différence d'absorbance corrigée est calculée selon la formule suivante :

$$A_{\text{diff}} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

Cette valeur est ensuite intégrée dans l'équation dérivée de la loi de Beer-Lambert pour calculer la teneur totale en anthocyanes :

$$\text{Anthocyanes totaux (mg/g)} = A_{\text{diff}} \times M \times DF \times 1000 / \epsilon \times l \times m$$

Où :

- TAC : teneur en anthocyanes totales, exprimée en mg équivalents cyanidine-3-glucoside (C3GE) pour 100 g de poids frais (PS),
- $A_{\text{diff}}$  : différence d'absorbance corrigée,
- M : masse molaire de la cyanidine-3-glucoside = 449 g/mol,
- DF : facteur de dilution appliqué,
- 1000 : facteur de conversion de grammes en milligrammes,
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire de la cyanidine-3-glucoside = 26 900  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,
- L : longueur du trajet optique de la cuve = 0,5 cm,
- m : masse de l'échantillon (en grammes).

### ➤ Protocole

Un volume de 1,5 mL de l'extrait végétal est prélevé et réparti dans deux tubes séparés, puis dans chaque tube nous rajoutons :

- **Tube 1** : 2,5 mL de solution de chlorure de potassium (KCl) 0,025 M, pH 1,0 ;
- **Tube 2** : 2,5 mL de solution d'acétate de sodium 1 M, pH 4,5.

Les tubes sont ensuite incubés à température ambiante, à l'obscurité, pendant 30 minutes pour assurer la stabilisation des anthocyanes, puis les absorbances de chaque solution sont mesurées à 510 nm et à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### I.4. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée en suivant la méthode colorimétrique de (**Singleton et Rossi, 1965**), qui repose sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif entre en interaction avec les groupements hydroxyles des composés phénoliques présents dans l'échantillon, conduisant à la formation d'un complexe coloré de teinte bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en phénols.

Pour chaque échantillon, un volume de 200 µL d'extrait dilué a été mélangé à 750 µL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après, 400 µL d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7,5 % ont été ajoutés afin d'alcaliniser le milieu, ce qui favorise le développement de la coloration bleue caractéristique. Le mélange a ensuite été incubé pendant 60 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 720 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en composés phénoliques totaux a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions standards d'acide gallique (**Annexe1**), et les résultats ont été exprimés en mg équivalents d'acide gallique (EAG) pour 100 g de matière sèche (MS).

### 1.5. Dosage des proanthocyanidines

La teneur en proanthocyanidines a été déterminée en utilisant une méthode de (**Škerget et al., 2005**). Cette méthode repose sur le fait que les proanthocyanidines, aussi appelées tanins condensés, se transforment en composés colorés (comme la cyanidine) lorsqu'elles sont chauffées dans un milieu acide. Ces composés produisent une couleur rouge qui peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

Pour réaliser cette analyse, on a d'abord préparé un réactif en dissolvant 15,4 mg de sulfate ferreux ( $\text{FeSO}_4$ ) dans 100 mL d'un mélange de 40 % d'acide chlorhydrique et 60 % de butanol. Ensuite, on a mélangé 0,5 mL de l'extrait de l'échantillon avec 2 mL du réactif dans un tube à essai. Le mélange a été incubé au bain-marie à 95 °C pendant 15 minutes, c'est-à-dire chauffé à cette température pendant ce temps. Après incubation, le mélange a été laissé à refroidir. L'absorbance a ensuite été mesurée à 530 nm avec un spectrophotomètre. Les résultats ont été déterminés en appliquant la loi de Beer-Lambert, en utilisant la cyanidine comme standard. Ils sont exprimés en mg équivalent cyanidine pour 100 g de matière sèche (mg ECy/100 g MS).

## II. Evaluation de l'Activité antioxydante

### II.1. Test du DPPH

#### ➤ Principe

L'activité antioxydante est mesurée à l'aide de la méthode DPPH, selon le protocole décrit par **Shimada *et al.* (1992)**. Cette méthode repose sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), qui présente une couleur violette intense. Lorsqu'ils réagissent avec ce radical, les antioxydants provoquent une réduction visible par une décoloration progressive de la solution. Cette perte de couleur, proportionnelle à la puissance antioxydante de l'échantillon, est évaluée en mesurant l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

#### ➤ Protocole

Pour ce test, nous avons mélangé 200  $\mu\text{L}$  d'extrait dilué avec 1 mL de solution DPPH (60  $\mu\text{mol/L}$  dans le méthanol). Les mélanges ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes, puis l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Les résultats ont été calculés en se basant sur une courbe d'étalonnage faite avec de l'acide gallique (**Annexe 2**) et sont exprimés en mg équivalent acide gallique pour 100 g de matière sèche.

### II.2. Test du Pouvoir réducteur

#### ➤ Principe

Le test du pouvoir réducteur permet d'évaluer la capacité antioxydante d'un extrait en mesurant sa faculté à réduire des ions métalliques. Cette méthode, décrite par **Yildirim *et al.* (2001)**, repose sur la transformation du ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) en ferrocyanure sous l'action des antioxydants présents dans l'échantillon. Le ferrocyanure formé réagit ensuite avec le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ), produisant un complexe coloré dont

l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait. L'absorbance de ce complexe est mesurée à 700 nm, et une absorbance plus élevée indique une activité antioxydante plus importante.

### ➤ Protocole

1 mL de l'extrait est mélangé avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 mol/L, pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium ( $K_3 [Fe (CN)_6]$ ) à 1 %. Ce mélange est ensuite incubé à 50 °C pendant 20 minutes afin de permettre la réduction du ferricyanure. Après l'incubation, 2,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % sont ajoutés pour arrêter la réaction et précipiter les protéines. Ensuite, 2,5 mL du mélange préparé sont transférés dans un nouveau tube à essai, puis on y ajoute 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1 %. L'absorbance du complexe formé est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés en mg équivalents acide gallique (EAG) pour 100 g de matière sèche (MS), en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations connues d'acide gallique .

## II.3. Test au phosphomolybdate

### ➤ Principe

La méthode du phosphomolybdate, décrite par **Prieto *et al.* (1999)**, permet d'évaluer l'activité antioxydante globale d'un extrait. Elle est basée sur la réduction des ions molybdate ( $Mo^{6+}$ ) par les antioxydants présents dans l'échantillon. Cette réduction entraîne la formation d'un complexe phosphomolybdène de couleur verte. L'intensité de cette coloration, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la teneur en composés antioxydants.

### ➤ Protocole

Dans notre travail, nous avons utilisé 100  $\mu$ L d'extrait dilué, mélangés à un mL de réactif de phosphomolybdate. Les échantillons ont été incubés à 95 °C pendant 1h30. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats ont été déterminés à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique (**Annexe3**), et sont exprimés en mg équivalent acide gallique (mg EAG) pour 100 g de matière sèche.

### III. Suivi de la cinétique de dégradation des anthocyanes au cours du stockage

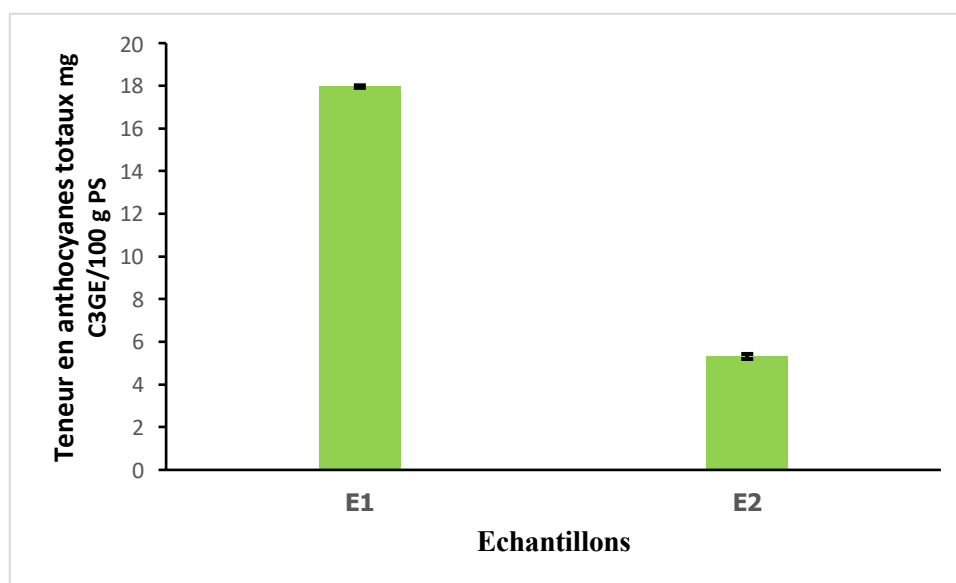
Durant notre étude, nous avons procédé au suivi de la cinétique de dégradation des anthocyanes de la poudre lyophilisée des baies de *Smilax aspera* pendant une période de 20 jours à différentes températures : 4, 20 et 37°C.

Le paramètre mesuré au cours de cette étude concerne la teneur totale en anthocyanes (TAC). Ce dernier a été déterminé selon la méthode décrite par **Tonutare *et al.* (2014)**, basée sur la méthode différentielle de pH.

## **Résultats et discussion**

### I. Teneur en anthocyanes totaux

La teneur en anthocyanes a été mesurée pour deux poudres de *Smilax aspera* obtenues par deux procédés de séchage différents : la lyophilisation (E1) et le séchage à l'étuve (E2). Les résultats sont résumés dans le graphique de la figure 8.



**Figure 8 :** Teneur en anthocyanes totaux des poudres de baies de *Smilax aspera*

Les analyses ont révélé une teneur en anthocyanes significativement plus élevée dans l'extrait E1 ( $17,97 \pm 0,06$  mg C3GE/100 g PS) comparée à l'extrait E2 ( $5,32 \pm 0,12$  mg C3GE/100 g PS). Cette différence s'explique en grande partie par la méthode de séchage : la lyophilisation utilisée pour E1 permet de mieux préserver les anthocyanes, qui sont très sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène. Le séchage à l'étuve (E2), en revanche, peut induire une dégradation oxydative rapide de ces pigments.

Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature, qui confirment que la lyophilisation constitue une méthode de séchage plus efficace pour préserver les anthocyanes. En effet, (**Patras *et al.*, 2010**) ont montré que cette technique permettait de conserver entre 70 et 80 % des anthocyanes, contre seulement 30 à 50 % après un séchage thermique conventionnel. Les teneurs nettement plus faibles observées dans l'extrait E2, obtenu par étuvage, corroborent donc ces observations et mettent en évidence l'effet dégradant de la chaleur sur ces composés sensibles.

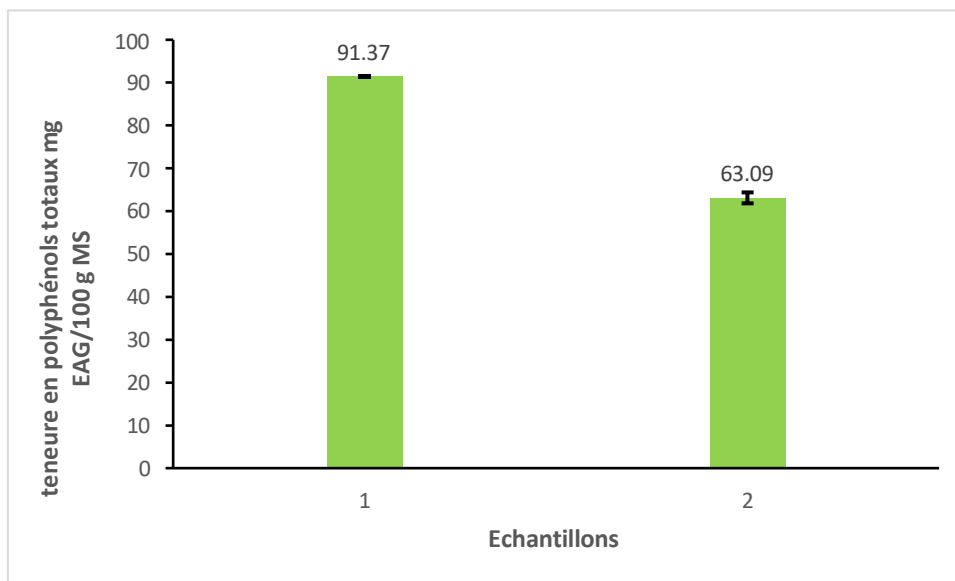
Globalement, les extraits de *Smilax aspera* montrent un potentiel intéressant comme source naturelle d'anthocyanes, en particulier lorsque la matière végétale est traitée par

## Résultats et discussion

lyophilisation, ce qui en fait une option prometteuse pour des applications alimentaires ou cosmétiques naturelles.

### II. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été évaluée pour les deux types de poudre de *Smilax aspera*, soumises à deux procédés de séchage différents : la lyophilisation (E1) et le séchage à l'étuve (E2). Les résultats sont présentés dans la figure 9.



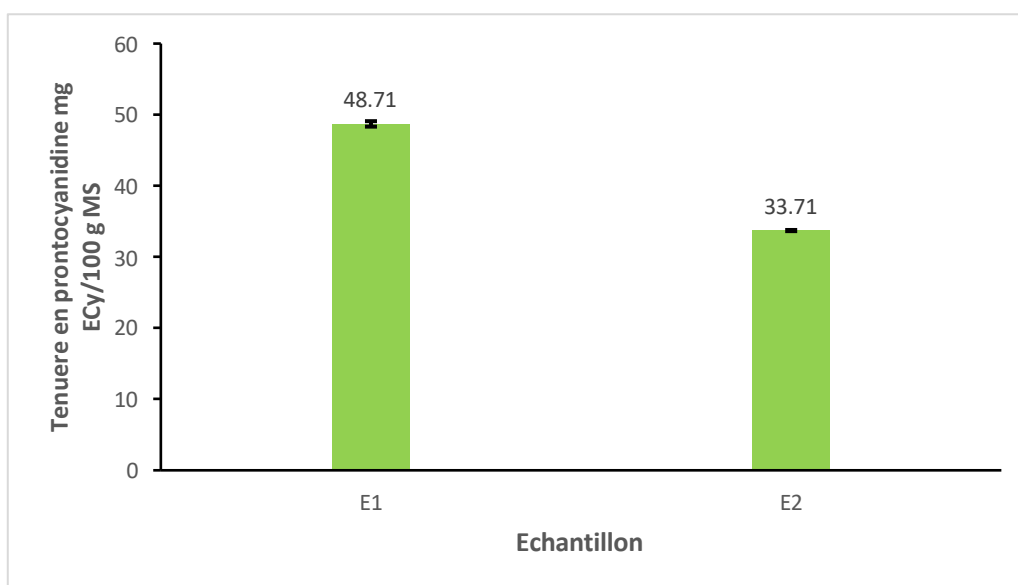
**Figure 9 :** Teneur en polyphénols totaux pour les deux types de poudre de *Smilax aspera*.

L'analyse des polyphénols totaux révèle une teneur significativement plus élevée dans l'extrait E1 ( $91,37 \pm 1,28$  mg EAG/100 g MS) comparée à l'extrait E2 ( $63,09 \pm 1,58$  mg EAG/100 g MS). Cette différence marque l'impact du mode de séchage : la lyophilisation permet une meilleure conservation des composés phénoliques thermosensibles, alors que le séchage à l'étuve peut entraîner leur oxydation ou dégradation ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature. Par exemple, (Ghasemzadeh *et al.*, 2011) et (Sultana *et al.*, 2009) rapportent des teneurs en polyphénols allant de 60 à 110 mg EAG/100 g MS selon les plantes et les méthodes de séchage.

Ainsi, les extraits de *Smilax aspera* présentent une richesse intéressante en polyphénols, surtout lorsqu'ils sont préparés par lyophilisation, ce qui confirme leur potentiel fonctionnel et antioxydant élevé.

### III. Teneur en proanthocyanidines

La teneur en proanthocyanidines, aussi appelées tanins condensés, a été évaluée pour deux types de poudre des baies de *Smilax aspera*., obtenues par deux procédés de séchage différents : la lyophilisation (E1) et le séchage à l'étuve (E2). Les résultats moyens, exprimés en mg équivalents cyanidine pour 100 g de matière sèche, sont présentés dans le graphique de la figure 10.



**Figure 10** : Teneur en pro anthocyanidines pour deux types de poudre des baies de *Smilax aspera*.

La quantification des proanthocyanidines a révélé des teneurs respectives de  $48,71 \pm 0,38$  mg équivalent cyanidine/100 g MS pour l'extrait E1 (lyophilisé) et de  $33,71 \pm 0,08$  mg ECy/100 g MS pour l'extrait E2 (séchage à l'étuve). Cette différence nette entre les deux extraits confirme l'impact du mode de séchage sur la conservation des composés phénoliques. La lyophilisation permet ici une meilleure préservation des proanthocyanidines, probablement en limitant l'oxydation et la dégradation thermique de ces composés sensibles.

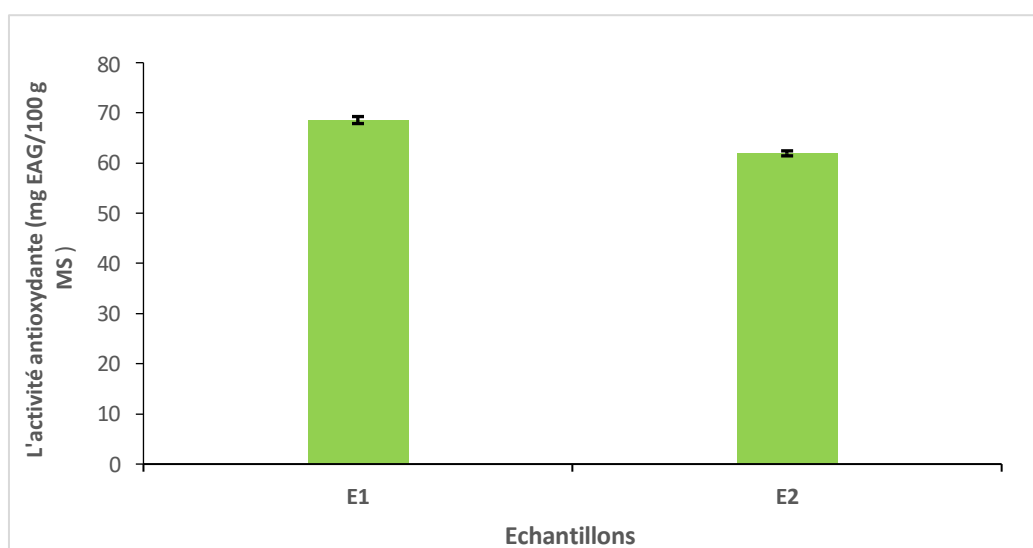
Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans la littérature pour d'autres plantes riches en polyphénols condensés. Par exemple, (Zhao *et al.*, 2014) ont mesuré environ 45 à 55 mg ECy/100 g MS dans des extraits de pépins de raisin (*Vitis vinifera*), tandis que, (Cao *et al.*, 2019) ont observé une diminution significative des proanthocyanidines après séchage thermique dans des extraits de canneberge, ce qui corrobore les différences observées entre E1 et E2.

Ainsi, l'extrait E1 se distingue par une concentration élevée en proanthocyanidines, renforçant son intérêt pour une application comme colorant naturel fonctionnel, aux propriétés antioxydantes potentiellement supérieures.

### IV. Evaluation de l'activité antioxydante

#### IV.1. Test du DPPH

L'activité antioxydante des deux extraits, E1 (poudre lyophilisée) et E2 (poudre séchée à l'étuve), a été évaluée par la méthode DPPH. Les résultats sont présentés dans la figure 11.



**Figure 11 :** Activité de piégeage du radical DPPH des fruits de *Smilax aspera*

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait E1, issu de la poudre lyophilisée des fruits de *Smilax aspera*, possède une meilleure activité antioxydante que l'extrait E2, avec une teneur équivalente à 68,57mg d'acide gallique pour 100 g de matière sèche, contre 61,93 mg pour E2.

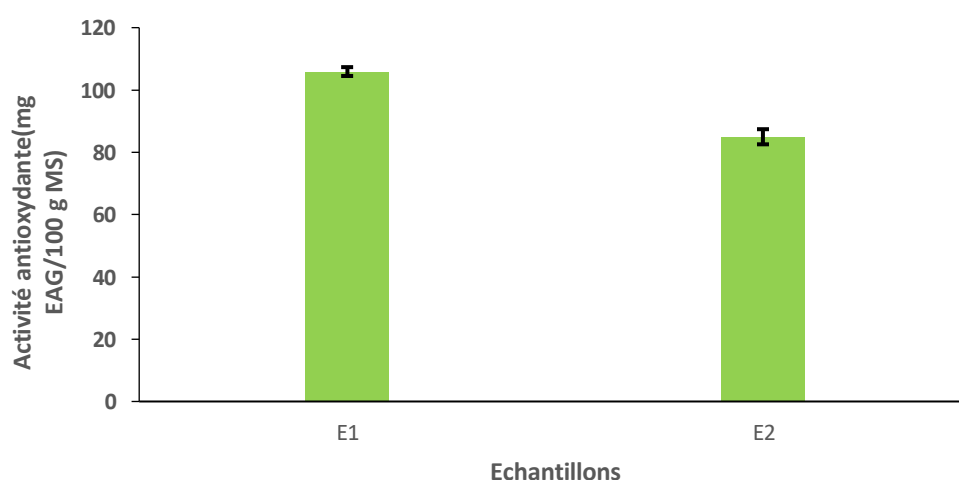
La supériorité de l'extrait E1 s'explique probablement par la préservation plus efficace des composés phénoliques lors de la lyophilisation, contrairement au séchage à l'étuve qui peut entraîner leur dégradation partielle par l'effet de la chaleur.

Ces valeurs indiquent une bonne capacité de piégeage des radicaux libres, mesurée par la méthode DPPH, et se situent dans la même gamme que plusieurs extraits végétaux connus pour leur richesse en composés phénoliques. Par exemple, (Mokrani et Madani 2016) ont rapporté des activités comprises entre 40 et 65 mg EAG/100 g MS pour des

extraits de myrtilles, tandis que Siddiq et al. (2013) ont obtenu environ 60,2 mg EAG/100 g MS pour des extraits d'hibiscus. De même, (Albuquerque *et al.*, 2020) mentionnent une activité de 52 mg EAG/100 g MS pour des extraits de mûres. Ces résultats confirment que les extraits de *Smilax aspera*, notamment celui obtenu par lyophilisation, présentent une activité antioxydante compétitive.

### IV.2. Pouvoir réducteur

L'activité antioxydante des deux extraits, E1 (poudre lyophilisée) et E2 (poudre séchée à l'étuve), a été évaluée par le pouvoir réducteur. Les résultats sont présentés dans la figure 12.



**Figure12** : Résultats du pouvoir réducteur des extraits des fruits de *Smilax aspera*

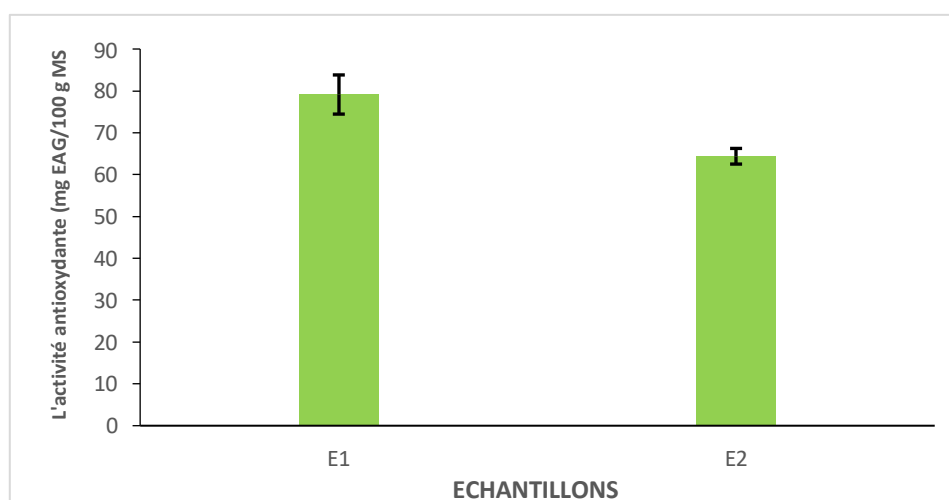
Les résultats montrent que l'extrait E1 présente une activité réductrice significativement plus élevée ( $105,91 \pm 1,42$  mg EAG/100 g MS) que l'extrait E2 ( $84,98 \pm 2,43$  mg EAG/100 g MS). Cela suggère une plus grande richesse en composés phénoliques réducteurs dans l'extrait obtenu par lyophilisation, probablement en raison d'une meilleure préservation des antioxydants sensibles à la chaleur.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études de la littérature. Par exemple, (Ghasemzadeh *et al.*, 2011) ont rapporté un pouvoir réducteur de 95 à 120 mg EAG/100 g MS dans des extraits de feuilles de plantes médicinales riches en flavonoïdes. De même, (Sultana *et al.*, 2009) ont observé des valeurs de 75 à 100 mg EAG/100 g MS dans des extraits méthanoliques de plantes, avec des valeurs supérieures dans les extraits séchés par lyophilisation.

Ainsi, les valeurs observées dans le présent travail confirment que *Smilax aspera* peut être considérée comme une source prometteuse de composés antioxydants réducteurs, en particulier lorsque la lyophilisation est utilisée comme méthode d'extraction.

### IV.3. Test au Phosphomolybdate

L'activité antioxydante des deux extraits, E1 (poudre lyophilisée) et E2 (poudre séchée à l'étuve), a été évaluée par la phosphomolybdate. Les résultats sont présentés dans la figure 13.

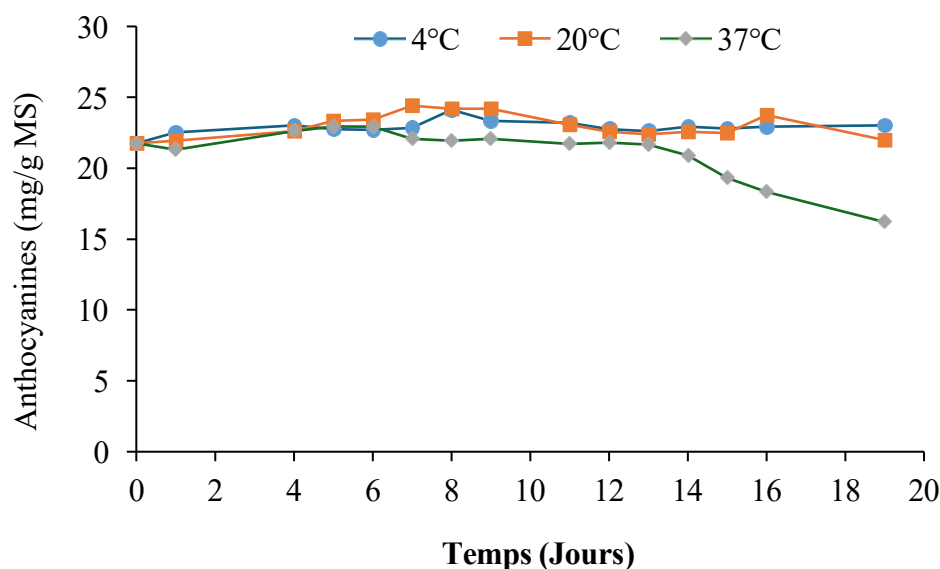


**Figure 13 :** Résultats du test phosphomolybdate des extraits des fruits de *Smilax aspera*.

L'évaluation de la capacité antioxydante totale par la méthode au phosphomolybdate a montré que l'extrait E1 présentait une valeur significativement plus élevée (79,13 mg EAG/100 g MS,  $\pm 4,68$ ) que l'extrait E2 (64,38 mg EAG/100 g MS,  $\pm 1,87$ ). Ce test, basé sur la réduction du molybdate (VI) en molybdate (V) par les antioxydants présents dans l'extrait, reflète la puissance globale de réduction. Les valeurs obtenues confirment que le procédé de lyophilisation (E1) permet une meilleure conservation des composés réducteurs, en particulier les polyphénols et anthocyanes. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Sultana *et al.*, 2009), qui ont rapporté des capacités antioxydantes allant de 55 à 75 mg EAG/100 g MS pour différents extraits de plantes médicinales. La supériorité de l'extrait E1 par rapport à E2 peut également s'expliquer par la dégradation thermique plus marquée des composés phénoliques lors du séchage à l'étuve, comme l'ont souligné (Chen *et al.*, 2013). Ainsi, les extraits de *Smilax aspera* se positionnent favorablement par rapport à d'autres matrices végétales et confirment leur potentiel en tant que source de colorants naturels bioactifs.

### V. Suivi de la cinétique de dégradation des anthocyanes

Afin d'évaluer la stabilité des anthocyanes au cours du stockage, des analyses ont été réalisées à différentes températures (4 °C, 20 °C et 37 °C) sur une période de 20 jours. Les résultats de la figure 14 présentent l'évolution de la teneur en anthocyanes totaux (exprimée en mg/g de matière sèche) en fonction du temps et de la température de conservation. Cette étude permet de mieux comprendre l'influence des conditions thermiques sur la dégradation ou la stabilité de ces composés.



**Figure 14 :** Courbe d'évolution de la teneur en anthocyanes (mg/g MS) selon la température de conservation.

Les résultats de la figure 14 montrent une évolution variable de la teneur en anthocyanes totaux en fonction de la température et du temps de conservation.

- À 4 °C, la teneur reste globalement stable, avec même une légère augmentation (de 21,75 à environ 23 mg/g), ce qui pourrait s'expliquer par une meilleure solubilisation ou accessibilité des anthocyanes piégés dans la matrice végétale.
- À 20 °C, les concentrations restent également assez stables jusqu'au 15e jour, traduisant une stabilité modérée à température ambiante, bien que des fluctuations soient notées. Ce comportement peut être attribué à un équilibre entre dégradation lente et relargage progressif.

- À 37 °C, on observe une dégradation progressive, surtout à partir du 13<sup>e</sup> jour. La teneur chute de 21,75 à 16,20 mg/g, ce qui suggère que la chaleur favorise l'instabilité des anthocyanes, via des phénomènes comme l'oxydation ou la désintégration de la structure flavonoïdique.

Globalement, ces observations montrent que plus la température de stockage augmente, plus la dégradation des anthocyanes s'accélère. Ce comportement est en accord avec les données de la littérature, qui confirment que les anthocyanes sont des composés thermosensibles, particulièrement vulnérables aux températures élevées (**Patras et al., 2010 ; Sadilova et al., 2006**). La chaleur favorise leur dégradation via des phénomènes tels que l'oxydation, l'hydrolyse ou la rupture de leur structure flavonoïdique.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était de valoriser une matrice végétale riche en pigments naturels, à travers l'extraction, la caractérisation et l'évaluation de la stabilité des anthocyanes, ainsi que d'autres composés phénoliques tels que les polyphénols totaux et les proanthocyanidines. Pour ce faire, différentes approches technologiques ont été explorées, notamment le choix du mode de séchage (lyophilisation vs étuvage) et l'étude de la stabilité thermique des anthocyanes au cours du stockage.

Les résultats obtenus montrent clairement que la lyophilisation est la méthode de séchage la plus appropriée pour préserver les composés bioactifs thermosensibles. En effet, la poudre lyophilisée (E1) a présenté des teneurs nettement supérieures en anthocyanes (17,97 mg C3GE/100 g PF), en polyphénols totaux (91,37 mg EAG/100 g MS) et en proanthocyanidines (39,15 mg ECy/100 g MS), comparée à la poudre séchée à l'étuve (E2). Cette supériorité s'explique par l'absence de chaleur dans le procédé de lyophilisation, limitant la dégradation oxydative ou thermique des composés phénoliques.

L'analyse de l'activité antioxydante des extraits a confirmé la supériorité de la poudre lyophilisée, qui a affiché des valeurs significativement plus élevées dans les trois tests utilisés (DPPH, pouvoir réducteur et phosphomolybdate). Cette activité antioxydante élevée renforce l'intérêt des extraits issus de cette matrice pour une application en tant qu'ingrédient fonctionnel.

Enfin, l'étude du comportement des anthocyanes au cours du stockage à différentes températures (4, 20 et 37°C) a permis de démontrer leur instabilité thermique. Si les anthocyanes se maintiennent bien à 4 °C et 20 °C, une dégradation marquée est observée à 37 °C. Ces résultats confirment la nécessité de stocker les produits contenant des anthocyanes dans des conditions réfrigérées afin d'en préserver la stabilité et l'efficacité fonctionnelle.

Dans l'ensemble, ce travail met en évidence l'importance des choix technologiques tout au long de la chaîne de valorisation, depuis la préparation de la matière première jusqu'à la conservation du produit fini. Il montre aussi le potentiel réel de la plante étudiée comme source naturelle de colorants et d'antioxydants, pouvant être intégrée dans des formulations alimentaires ou nutraceutiques.

En perspectives, plusieurs pistes peuvent être envisagées pour poursuivre cette étude :

- Étendre l'analyse à d'autres composés bioactifs de la plante (flavonols, acides phénoliques, etc.).
- Identifier les anthocyanes individuels par chromatographie (HPLC) pour mieux caractériser le profil pigmentaire.
- Formuler un produit fini (yaourt, boisson, crème glacée) enrichi en anthocyanes, et tester la stabilité colorante et nutritionnelle dans des conditions réelles.
- Valider l'intérêt biologique des extraits par des tests cellulaires ou microbiologiques (ex. pouvoir anti-inflammatoire ou antimicrobien).

Ce travail constitue donc une base solide pour la valorisation de cette ressource naturelle dans le domaine de l'agroalimentaire ou des compléments nutritionnels.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

1. Abdel-Aal E-S M. Hucl P et Rabalski I. (2018). Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. *Food Chemistry*, 254 : 13-19.
2. Albuquerque, B. R., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–31.
3. Alquezar, B., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2008). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara. *Phytochemistry*, 69(10), 1997–2007.
4. Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., & Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 151–183.
5. Azzoug, A., & Cheurfa, Z. (2013). *Effet de la fortification de l'acide ascorbique sur la stabilité des anthocyanes et les paramètres physico-chimiques du jus d'orange sanguine lors des traitements thermiques* [Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa]
6. Badaoui, D. (2024). *Évaluation du potentiel antioxydant de quelques plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète* [Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa].
7. Bakowska-Barczak, A. M., Kolodziejczyk, P., & Kolesarova, A. (2020). Comparison of the content of polyphenolic compounds and anthocyanins in extracts of different berries and their stability during storage. *Journal of Berry Research*, 10(1), 47–60.
8. Beutler, C. (2011). *Les colorants artificiels dans les denrées alimentaires destinées aux enfants*, pp. 6, 9, 11 et 12.
9. Block, G., Dietrich, M., Norkus, E. P., Morrow, J. D., Hudes, M., Caan, B., & Packer, L. (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. (*Vol. 156*).
10. Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72, 429–452.
11. Boulekbache-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., & Madani, K. (2013). Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Industrial Crops and Products*, 49, 668–674.
12. Bourgou, S., Serairi, B., Medni, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur les composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia. *Journal of New Sciences*, 28, 1649–1655.
13. Brooks, M. S.-L., & Celli, G. B. (2019). *Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health*. Royal Society of Chemistry.
14. Burton-Freeman B. Sandhu A. et Edirisinghe I. (2016). Chapter 35—Anthocyanins. In R. C. Gupta (Éd.), *Nutraceuticals* (p. 489-500).
15. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.

16. Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509.
17. Cao, Y., Zhang, Z., Wu, H., & Sun, X. (2019). Effect of drying methods on phenolic compounds and antioxidant activity of *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108298.
18. Chemat, F., Huma, Z., Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.
19. Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.
20. Chemat, F., & Vian, M. A. (2014). *Alternative solvents for natural products extraction*. Springer.
21. Chen, J., Liu, X., Shi, Y., & Zhang, X. (2013). Effects of different drying methods on antioxidant properties in *Morus alba* L. fruits. *Food and Bioprocess Technology*, 91(2), 161–165.
22. Chin, N. L., Pang, S. C., Yusof, Y. A., & Talib, R. A. (2022). Impact of drying processes on phenolics and in vitro health-related activities of indigenous plants in Thailand. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6), e16532.
23. Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2000). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. CRC Press.
24. De Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1679–1703.
25. Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., & Paredes-López, O. (2010). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3).
26. Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(1), 1–6.
27. Denev, P., Kratchanov, C., Ciz, M., Lojek, A., & Kratchanova, M. (2019). Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1214–1238.
28. El Darra, N. (2013). *Les composés phénoliques des raisins : Étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction* [Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne].
29. Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moel, G., Steghens, J. P., & Nabet, F. (1999). Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. *Annales de Biologie Clinique*, 57(2), 169–183.
30. Forman, M. R., Beecher, G. R., Lanza, E., Reichman, M. E., Graubard, B. I., Campbell, W. S., Marr, T., Yong, L. C., Judd, J. T., & Taylor, P. R. (1995). Effect of alcohol consumption on plasma carotenoid concentrations in premenopausal women: A controlled dietary study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(1), 131–135.
31. Gasperotti, M., Masuero, D., Guella, G., Mattivi, F., & Vrhovsek, U. (2014). Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol

- gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC–ESI-MS/MS. *Talanta*, 128, 221–230.
32. Gee, J. M., & Johnson, I. T. (2001). Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 1245–1255.
  33. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2011). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia youngginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 16(6), 4539–4550.
  34. Ghédira, K., & Goetz, P. (2016). Salsepareille *Smilax sarsaparilla* L. (syn. *Smilax aspera* L.) [Smilacaceae]. *Phytothérapie*, 14(5), 330–333.
  35. Ghitscu, R. E., Volf, I., & Carausu, C. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 535–541.
  36. Gutiérrez-Grijalva, E. P., López-Martínez, L. X., Contreras-Angulo, L. A., Elizalde-Romero, C. A., & Heredia, J. B. (2020). Plant alkaloids: Structures and bioactive properties. In *Plant-derived bioactives: Chemistry and mode of action* (pp. 85–117).
  37. Gouvernement algérien. (2009, 1 mars). Loi n° 09-03 du 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes. Journal officiel de la République algérienne démocratique et populaire, (n° 15).
  38. Gouvernement algérien. (2012, 16 mai). Décret exécutif n° 12-214 du 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine. Journal officiel de la République algérienne démocratique et populaire (n° 30).
  39. Gouvernement algérien. (2013, 18 novembre). Décret exécutif n° 13-378 du 9 novembre 2013 fixant les conditions et les modalités relatives à l'information du consommateur. Journal officiel de la République algérienne démocratique et populaire (n° 58).
  40. Hong, H. T., Netzel, M. E., & O'Hare, T. J. (2020). Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. *Food Chemistry*, 319, 126515.
  41. Hondjedj, N., & Née, M. (2012). *Évaluation du risque toxicologique du colorant alimentaire tartrazine à court terme chez la souris suisse* [Thèse de doctorat, Université d'Oran, Algérie].
  42. Hallagan, J. B., Allen, D. C., & Borzelleca, J. F. (1995). The safety and regulatory status of food, drug and cosmetic color additives in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 33(6), 515–528.
  43. Ito, Y., Sasaki, R., Minohara, M., Otani, M., & Aoki, K. (1987). Quantitation of serum carotenoid concentrations in healthy inhabitants by high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 169(2–3), 197–207.
  44. Jacynthe Lafrenière, Couillard, C., Lamarche, B., & Lemieux, S. (2018). Les caroténoïdes sériques comme biomarqueurs : Une stratégie pour améliorer la validité de l'évaluation alimentaire. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 79, 23–27.
  45. Kim, D. J., Takasuka, N., Nishino, H., & Tsuda, H. (2000). Chemoprevention of lung cancer by lycopene. *BioFactors*, 13(1), 95–102.

46. Klipstein-Grobusch, K., Launer, L. J., Geleijnse, J. M., Boeing, H., Hofman, A., & Witteman, J. C. M. (2000). Serum carotenoids and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 148(1), 49–56.
47. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923–933.
48. Kucuk, O., Sarkar, F. H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M. N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J. S., & Wood, D. P. (2002). Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 881–885.
49. Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
50. Kumudu, G., Rajapaksha, M., Wansapala, M. A. J., Buddhika, A., & Silva, G. (2015). Detection of synthetic colours in selected foods & beverages available in Colombo District, Sri Lanka. *International Journal of Science and Research*, 6(5), 2319–7064.
51. Lakshmi, C. (2014). Food coloring: The natural way. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(2), 2231–2606.
52. Linnewiel-Hermoni, K., Paran, E., & Wolak, T. (2016). Carotenoid supplements and consumption: Implications for healthy aging. In M. Malavolta (Ed.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. 473–489). San Diego: Academic Press.
53. Landim Neves, A., et al. (2021). Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges and future strategies. *Food Chemistry*, 344, 128681.
54. Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition: Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170–176.
55. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
56. Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë ramnoides)* [Thèse de doctorat, Université d'Orléans, Chimie Analytique – Phytochimie].
57. Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76.
58. Morgane, B. (2020). *Potentiel antidiabétique de métabolites de polyphénols : les urolithines* [Thèse de doctorat, Université de Montpellier].
59. Mueller, L., & Boehm, V. (2011). Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*, 16, 1055–1069.
60. Nachay, K. (2009). A new color palette emerges. *Food Technology (Chicago)*, 63(4).
61. Naidu, M. M., & Sowbhagya, H. B. (2012). In *Food Colours*. March, 79–88. <http://ir.cftri.com/11060/1/natural%20colours-chemical%20industry%20digest.pdf>

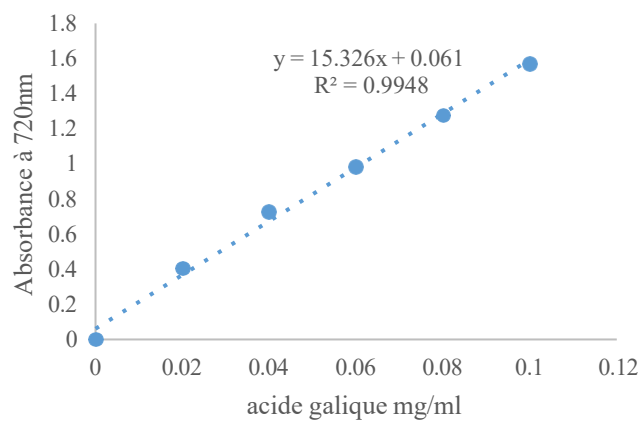
62. Neill, S. O. (2002). *The functional role of anthocyanins in leaves* [Thèse, University of Auckland]. ResearchSpace@Auckland.
63. Nguyen, T. T. (2018). *Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales* [Thèse de doctorat, Université Bourgogne Franche-Comté].
64. Nicol, M., & Maudet, M. (2000). Caroténoïdes et vitamine A. *OCL*, 7, 266–270.
65. Norrish, A. E., Jackson, R. T., Sharpe, S. J., & Skeaff, C. M. (2000). Prostate cancer and dietary carotenoids. *American Journal of Epidemiology*, 151(2), 119–123.
66. Olson, J. (1989). Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. (*Vol. 119*).
67. OUARET, L., & OUGUERGOUZ, H. (2020). Réactivité chimique des anthocyanes en vue de leur application en sciences alimentaires [Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira – Béjaïa, Génie des Procédés].
- 68.
69. Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: Mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3–11.
70. Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 801–809.
68. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
69. Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 483–508.
70. Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: From biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29–36.
71. Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3Suppl), 570S–578S.
72. Puspawati, G. A. K. D., Marsono, Y., Supriyadi, & Armunanto, R. (2018). Comparison of sonication with maceration on antioxidant potency of anthocyanin and carotenoid of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Agritech*, 38(3), 304–312.
73. Rahman, M. M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y., & Konishi, T. (2006). Superoxide radical and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radical Research*, 40, 993–1002.
74. Rahman, M. M., & Lamsal, B. P. (2021). *The acoustic cavitation effect produced by high-intensity ultrasound (HIU)* [Image].
75. Rao, A. V. (2006). Lycopène. *Food and Nutrition Research*. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)51002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)51002-2)
76. Rao, A., Fleshner, N., & Agarwal, S. (1999). Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: A case-control study. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 33(2), 159–164.

77. Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins* [Thèse de doctorat, University of Helsinki].
78. Rodriguez-Amaya, D. B. (2019). Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200–205.
79. Routray, W., & Orsat, V. (2019). Microwave-assisted extraction of flavonoids: A comprehensive overview. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 409–424.
80. Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504–C512.
81. Schagen, S. K., Zampeli, V. A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 298–307.
82. Semences du Puy. (S.d.). *Smilax aspera – Salsepareille d'Europe*.
83. Simon, M. S., Djuric, Z., Dunn, B., Stephens, D., Lababidi, S., & Heilbrun, L. K. (2000). An evaluation of plasma antioxidant levels and the risk of breast cancer: A pilot case control study. *The Breast Journal*, 6(6), 388–395.
84. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180.
85. Smaili, K., & Tahir, O. (2020). *Yaourts : Colorants et ingrédients texturants pour applications industrielles* [Mémoire de Master, Université A. Mira de Béjaïa, Département des Sciences Alimentaires].
86. Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocchio, E., & Trombetta, D. (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytotherapy Research*, 30, 1265–1286.
87. Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 34–351.
88. Stephenson, R. C., Ross, R. P., & Santon, C. (2021). Carotenoids in milk and the potential for dairy-based functional foods. *MDPI*, 10, 1263.
89. Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 100–110.
90. Tan, L. T. H., Lee, L. H., Yin, W. F., & Chan, C. K. (2019). Effects of three drying methods on the polyphenol composition and antioxidant activities of *Litchi chinensis* peel. *Antioxidants*, 8(12), 567.
91. Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A., Barbagallo, R., & Spagna, G. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114, 434–439.
92. Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 159–170.
93. Turker, N., Aksay, S., & Ekiz, H. I. (2004). Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. *L.*) beverage: Shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3807–3813.
94. van het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., & Hautvast, J. G. A. J. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 130(3), 503–506.

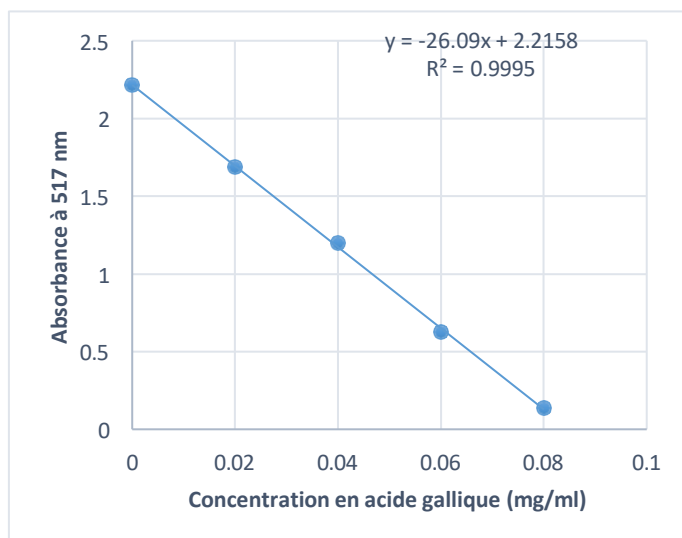
95. Valls, J., Millan, S., Marti, M. P., Borrás, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143–7172.
96. Van Dokkum, W., Frølich, W., Saltmarsh, M., & Gee, J. (2008). The health effects of bioactive plant components in food: Results and opinions of the EU COST 926 action. *Nutrition Bulletin*, 33, 133–139.
97. Vats, D., Pop, O. L., Pop, C. R., Coldea, T. E., Socaci, S. A., Suharoschi, R., & Suharoschi, C. (2023). Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activity of different extracts from frozen, freeze-dried, and oven-dried jostaberries. *Foods*, 12(8), 1637.
98. Wahyuni, D. T., & Widjanarko, S. B. (2015). Effect of solvent type and extraction time on carotenoid extract of yellow pumpkin with the ultrasonic wave method. *Journal of Food and Agroindustry*, 3(2), 390–401.
99. Willig, J. A. (2009). *The effect of anthocyanin acylation on the inhibition of HT-29 colon cancer cell proliferation* [Master's thesis, The Ohio State University].
100. Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4069–4075.
101. Zhao, M., Yang, B., Wang, J., Liu, Y., & Yu, L. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of proanthocyanidins from grape seeds and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 162, 54–62.

# **Annexes**

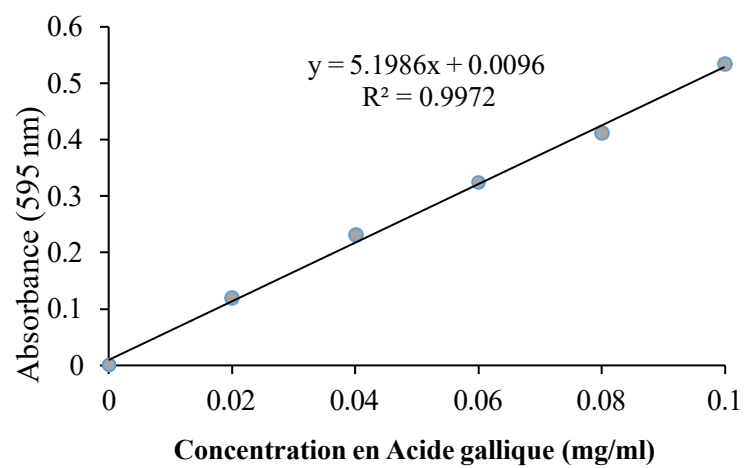
### Annexe1 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques



### Annexe2 : Courbe d'étalonnage du test DPPH



### Annexe3 : Courbe d'étalonnage phosphomolybdates



## Résumé

Ce travail a porté sur l'extraction et la valorisation d'un colorant naturel à partir des baies de *Smilax aspera*, dans le but de proposer une alternative saine et fonctionnelle aux colorants synthétiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Deux poudres ont été préparées : l'une obtenue par lyophilisation et l'autre par séchage à l'étuve. L'extraction des composés bioactifs a été réalisée par macération, puis les extraits ont été analysés pour déterminer leur teneur en anthocyanes, polyphénols totaux, proanthocyanidines et leur activité antioxydante. Les résultats ont montré que la poudre lyophilisée a permis d'obtenir les concentrations les plus élevées en composés antioxydants, ainsi qu'un bon rendement. Ce travail confirme que *Smilax aspera* constitue une source efficace de colorants naturels à haute valeur antioxydante, et que son exploitation pourrait contribuer au développement de produits alimentaires fonctionnels, tout en valorisant une ressource végétale locale.

**Mots-clés :** *Smilax aspera*, colorant naturel, anthocyanes, lyophilisation, activité antioxydante.

## Abstract:

This study focused on the extraction and valorization of a natural colorant from *Smilax aspera* berries, aiming to offer a healthy and functional alternative to synthetic dyes used in the food industry. Two types of powders were prepared: one obtained by freeze-drying and the other by oven-drying. Bioactive compounds were extracted using maceration, then analyzed to determine their content in anthocyanins, total polyphenols, proanthocyanidins, and their antioxidant activity. Results showed that the freeze-dried powder yielded the highest concentrations of antioxidant compounds and good extraction efficiency. This work confirms that *Smilax aspera* is an effective source of natural colorants with high antioxidant value, and that its exploitation could contribute to the development of functional food products while enhancing a local plant resource.

**Keywords:** *Smilax aspera*, natural colorant, anthocyanins, freeze-drying, antioxidant activity.