UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

# THESE

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**Spécialité : Génie des procédés et des produits**

Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés (LRGP)
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM)
École doctorale : RP2E

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2015
par Khalil ZAGHDOUDI

# Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir du persimmon (*Diospyros kaki L.),* de l'abricot (*Prunus armeniaca L.)* et de la pêche (*Prunus persica L.).* Etude photophysique en vue d'une application en thérapie photodynamique (PDT).

**Rapporteurs :**

Eric MARCHIONI, Professeur, Université de Strasbourg.
Ann VAN LOEY, Professeur, Université Catholique de Louvain.

**Examinateur :**

Yann GUIAVARC'H, Maître de Conférences, Université de Lorraine.

**Directeur et co-Directeurs de thèse :**

Céline FROCHOT, Directeur de Recherche CNRS, Université de Lorraine.
Régis VANDERESSE, Chargé de Recherche CNRS, Université de Lorraine.

**Membre Invité :**

Danielle BARTH, Professeur, Université de Lorraine.

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du jury, et en particulier les Professeurs Ann Van Loey et Eric Marchioni, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de recherche en étant rapporteurs de ma thèse.

Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

A ma directrice de thèse Céline FROCHOT, merci pour ton appui scientifique et moral, merci pour m'avoir encadré et conseillé durant ces années de thèse. Merci pour ta confiance et ton soutien tout le long de ce travail.

A Régis VANDERESSE mon co-directeur de thèse, merci pour tes conseils, merci pour ta bonne humeur toujours présente.

Un merci particulier à Yann GUIAVARC'H, mon co-encadrant. Merci pour ta disponibilité, ton appui scientifique si précieux, pour tes conseils, tes idées lumineuses et nombreuses. Merci pour ton soutien moral. J'ai apprécié nos discussions et j'ai beaucoup appris de toi : "Apprendre sur le tas".

J'adresse également mes remerciements, à toute l'équipe BioProMo. Un merci particulier à Aymeric, Rima et Aurélie pour leur amitié, leur présence et leur soutien durant ma thèse.

Merci également à Philippe ARNOUX, Francis BAROS, Mathilde ACHARD pour leur aide technique et logistique et leur assistance quotidienne.

Merci à Steve PONTVIANNE et Xavier FROMBOISIER pour leur soutien technique précieux.

Merci au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de la Tunisie d'avoir financé mes séjours en France.

Merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

A ma femme Emna et mon fils Youssef, à ma famille, à mes amis.

# Table des Matières

# TABLE DES MATIERES

**REMERCIEMENTS** ..... 5

**TABLE DES MATIERES** ..... 9

**LISTE DES TABLEAUX** ..... 17

**LISTE DES FIGURES** ..... 21

**NOMENCLATURE** ..... 27

**INTRODUCTION GENERALE** ..... 33

**Chapitre I : Fruits et Caroténoïdes** ..... 39

I Fruits et caroténoïdes ..... 41

I.1 L'abricotier, *Prunus armeniaca L.* ..... 41

I.1.1 Propagation de *Prunus armeniaca L.* à travers le monde ..... 41

I.1.2 L'abricotier en Afrique du Nord ..... 42

I.1.3 Production mondiale ..... 43

I.1.4 Description botanique ..... 44

I.1.4.1 Données Générales ..... 44

I.1.4.2 Conditions de culture ..... 45

I.1.4.3 Classification Botanique ..... 45

I.1.5 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit ..... 45

I.2 Le persimmon, *Diospyros kaki L.* ..... 46

I.2.1 Propagation des persimmons à travers le monde ..... 46

I.2.2 Production mondiale ..... 47

I.2.3 Description botanique ..... 47

I.2.3.1 Données générales ..... 47

I.2.3.2 Les différentes variétés de *Diospyros kaki* L. ..... 49

I.2.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit ..... 49

I.3 La pêche, *Prunus persica* L. ..... 52

I.3.1 Propagation du *Prunus persica* L. à travers le monde ..... 52

I.3.2 Le Pêcher en Nord Afrique ..... 52

I.3.3 Production mondiale ..... 52

I.3.4 Description Botanique ..... 53

I.3.4.1 Données générales ..... 53

I.3.4.2 Conditions climatique de culture ..... 54

I.3.4.3 Classification Botanique ..... 54

I.3.5 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit ..... 55
I.4 Les caroténoïdes ..... 55
I.4.1 Généralités ..... 55
I.4.2 Source des caroténoïdes ..... 56
I.4.2.1 Fruits et légumes ..... 56
I.4.2.2 Animaux ..... 57
I.4.2.3 Caroténoïdes dans les algues marines ..... 58
I.4.3 Classification des caroténoïdes ..... 59
I.4.4 Structure chimique ..... 60
I.4.5 Propriétés physico-chimiques des caroténoïdes ..... 61
I.4.5.1 Solubilité des caroténoïdes ..... 61
I.4.5.2 Absorption de la lumière UV-visible ..... 62
I.4.5.3 Stabilité et réactivité des caroténoïdes ..... 63
I.4.6 Biosynthèse des caroténoïdes ..... 64
I.4.6.1 Synthèse du phytoène et lycopène ..... 66
I.4.6.2 Cyclisation du lycopène ..... 67
I.4.6.3 Formation des xanthophylles ..... 67
I.4.7 Extraction des caroténoïdes à partir des matrices végétales ..... 68
I.4.7.1 Extraction conventionnelle des caroténoïdes à partir de matrices végétales ..... 69
*I.4.7.1.1 Extraction par Soxhlet* ..... 70
*I.4.7.1.2 Extraction par agitation/homogénéisation* ..... 72
*I.4.7.1.3 Autres extractions conventionnelles* ..... 72
I.4.7.2 Extraction par solvants organiques accélérée par la pression (ASE ou PLE) ..... 72
*I.4.7.2.1 Principe et instrumentation* ..... 73
*I.4.7.2.2 Paramètres influençant l'extraction accélérée par solvant organique* ..... 73
I.4.7.2.2.1 Extraction des caroténoïdes par ASE ..... 75
I.4.7.3 Extraction en milieux $CO_2$ supercritique ..... 79
*I.4.7.3.1 Fluide supercritique et diagramme de phase* ..... 79
*I.4.7.3.2 Domaines d'applications du dioxyde de carbone supercritique* ..... 81
*I.4.7.3.3 Principe de l'extraction par $CO_2$ supercritique* ..... 82
*I.4.7.3.4 Influence des paramètres d'extraction* ..... 83
I.4.7.3.4.1 Effet de la température et pression ..... 83
I.4.7.3.4.2 Effet du cosolvant ..... 84
I.4.7.3.4.3 Effet du débit de $CO_2$ supercritique ..... 84
I.4.7.3.4.4 Influence du temps d'extraction ..... 85
I.4.7.3.4.5 Effet de la granulométrie et de la taille des particules de la matrice solide ..... 86
*I.4.7.3.5 Extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique* ..... 87

I.4.8 Analyse des caroténoïdes ..... 91
I.4.8.1 Séparation par chromatographie conventionnelle sur colonne et/ou couche mince à l'atmosphère ..... 91
I.4.8.2 Analyse des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance en phase inverse 92
*I.4.8.2.1 Colonne* ..... 92
*I.4.8.2.2 Phase mobile* ..... 93
*I.4.8.2.3 Méthodes de détection* ..... 94
I.4.8.2.3.1 Absorbance UV-visible ..... 94
I.4.8.2.3.2 La détection électrochimique ..... 94
I.4.8.2.3.3 Spectrométrie à lentille thermique (TLS) ..... 95
I.4.8.2.3.4 Spectroscopie de masse (MS) ..... 95
*I.4.8.2.4 Identification des caroténoïdes par résonance magnétique nucléaire (RMN)* ..... 96
Références ..... 97

**Chapitre II : La Thérapie photodynamique (PDT) et les caroténoïdes en PDT** ..... 119
II Contexte général ..... 121
II.1 Histoire du cancer ..... 121
II.1.1 Définition du cancer ..... 125
II.1.2 Comment guérir le cancer? ..... 126
II.2 La thérapie photodynamique ..... 126
II.2.1 Rappel historique ..... 126
II.2.1.1 Photothérapie et photo-chimiothérapie ..... 126
II.2.1.2 Les premiers jours de la thérapie photodynamique ..... 127
II.2.1.3 L'utilisation de l'éosine ..... 128
II.2.1.4 L'hématoporphyrine et ces dérivées ..... 129
II.2.2 Principe de base ..... 131
II.2.3 Applications courantes et espoirs de la PDT ..... 132
II.2.3.1 Dermatologie ..... 132
II.2.3.2 Ophtalmologie ..... 134
II.2.3.3 Cancer de la tête et du cou ..... 134
II.2.3.4 Tumeur cérébrale ..... 134
II.2.3.5 Cancer des poumon et mésothéliome ..... 135
II.2.3.6 Cancer gastro-entérologique ..... 135
II.2.3.7 Cancers urologiques ..... 136
II.2.3.8 Gynécologie ..... 136
II.2.4 Mécanisme et mode de fonctionnement ..... 136
II.3 L'oxygène singulet ..... 138

II.3.1 Historique ..... 138
II.3.2 Propriétés photophysiques ..... 139
II.3.2.1 Structure électronique de l'oxygène singulet ..... 139
II.3.2.2 Inhibition de la production de l'oxygène singulet ..... 140
II.3.2.2.1 Quenching physique de $^1O_2$ ..... 141
II.3.2.2.2 Quenching chimique de $^1O_2$ ..... 141
II.4 Le ciblage en PDT ..... 141
II.4.1 La lumière en PDT et son ciblage ..... 142
II.4.2 Ciblage du photosensibilisateur : passif et actif ..... 143
II.4.2.1 Le ciblage actif ..... 144
II.4.2.2 Le ciblage actif direct ..... 144
II.4.2.3 Ciblage actif indirect ..... 147
II.4.2.3.1 Ciblage de la néovascularisation ..... 147
II.4.2.3.2 Le ciblage de l'oxygène singulet ..... 150
II.5 Les caroténoïdes ..... 156
II.5.1 Propriétés anti-radicalaire des caroténoïdes ..... 156
II.5.2 Les caroténoïdes comme antioxydants ..... 157
II.5.2.1 Réaction des caroténoïdes radicaux ..... 158
II.5.2.2 Effet quencher des caroténoïdes ..... 160
II.5.2.3 Structure électronique des caroténoïdes ..... 164
II.5.3 Rôle des caroténoïdes dans la prévention du cancer ..... 165
II.6 Contexte et objectif : l'utilisation des caroténoïdes comme inhibiteurs d'$^1O_2$ pour des applications potentielles en PDT ..... 166
Références ..... 168

**Chapitre III : Matériels & Méthodes** ..... 187
III Procédés d'extraction des caroténoïdes ..... 187
III.1 Préparation et caractérisation des poudres de fruits ..... 187
III.1.1 Lyophilisation ..... 188
III.1.2 Broyage des poudres lyophilisées ..... 188
III.1.3 Détermination des % en matière sèche et eau ..... 188
III.1.4 Activité de l'eau $a_w$ ..... 188
III.1.5 Granulométrie ..... 189
III.1.6 Préparation des extraits caroténoïdiques avant analyse HPLC-PDA-MS ..... 189
III.1.7 Extraction par solvant organique à pression atmosphérique ..... 190
III.1.8 Extraction par solvant accélérée (Accelerated Solvent Extraction, ASE) ..... 191
III.1.8.1 Principe ..... 191

III.1.8.2 Description technique ..... 192
III.1.8.3 Extraction des caroténoïdes ..... 193
III.1.9 Extraction par $CO_2$ supercritique avec cosolvant ..... 194
III.1.9.1 Principe ..... 194
III.1.9.2 Description du processus d'extraction ..... 195
III.1.9.3 Plan d'expérience appliqué à l'extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique ..... 196
III.2 Analyse ..... 198
III.2.1 Spectroscopie UV-VIS et spectrophotométrie ..... 198
III.2.1.1 Mesure d'absorption UV-visible ..... 198
III.2.1.2 Mesure de la fluorescence statique ..... 198
III.2.1.3 Mesure de durée de vie de l'oxygène singulet ..... 198
III.2.2 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ..... 198
III.2.3 Analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) ..... 199
III.2.4 Purification par chromatographie préparative ..... 199
III.3 Planifications d'expériences ..... 200
III.3.1 Définition ..... 200
III.3.2 Principe ..... 200
III.3.3 Application de l'approche des plans d'expériences dans notre étude ..... 202
III.3.4 Plan pour surface de réponse : plan factoriel complet et plan central composite à face centrée ..... 202
III.3.4.1 Plan factoriel complet $2^2$ avec point central répété utilisé en extraction ASE ..... 202
III.3.4.2 Plan central composite à faces centrées utilisé dans le cadre de l'extraction de caroténoïdes par $CO_2$ supercritique (SFE) ..... 203
Références ..... 205

**Chapitre IV : Extraction des caroténoïdes avec solvant accélérée (ASE)** ..... 209
IV Extraction des caroténoïdes avec solvant accélérée (ASE) ..... 209
IV.1 Contexte ..... 209
**Chapitre V : Extraction des caroténoïdes avec le $CO_2$ supercritique** ..... 223
V Extraction des caroténoïdes avec $CO_2$ supercritique ..... 223
V.1 Contexte ..... 223
**Chapitre VI : Propriétés de quenching d'$^1O_2$ des caroténoïdes** ..... 255
VI Propriétés de quenching d'oxygène singulet des caroténoïdes ..... 257
VI.1 Contexte ..... 257

**CONCLUSION & PERSPECTIVES** ..... 285
**ANNEXE I** ..... 295

**ANNEXE II** ..... 299
**ANNEXE III** ..... 309
**RESUME** ..... 314
**ABSTRACT** ..... 314

# Liste des Tableaux


Tableau I.1 : Classification éco-géographique de l'abricot ..... 41

Tableau I.2 : Classification Botanique du *Prunus armeniaca L.* ..... 45

Tableau I.3 : Classification botanique des *Diospyros kaki* L ..... 49

Tableau I.4 : Composition en vitamines, Ca et Fe (g/Kg de Matière fraîche) de la pelure. ..... 50

Tableau I.5a : Taux de sucres, saccharose, fructose et glucose dans les pelures de 11 variétés du *Diospyros kakiL* (g/kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009).* ..... 50

Tableau I.5.b : Acides citrique, malique et fumarique et acides totaux présents dans les pelures de 11 variétés de persimmons (mg /kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009).* ..... 51

Tableau I.5.c : Teneur en zéaxanthine, β-cryptoxanthine, α-carotène et β-carotène ainsi qu'en caroténoïdes totaux dans les pelures de 11 variétés de *Diospyros kaki* L (µg/Kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009).* ..... 51

Tableau I.6 : Classification botanique de *Prunus persica* L ..... 54

Tableau I.7 : Teneur en caroténoïdes en mg/100g dans les fruits et légumes du régime méditerranéen d'après *(Fernandez-Garcia et al., 2012).* ..... 56

Tableau I.8 : Les caroténoïdes produits par les microalgues. ..... 59

Tableau I.9 : Extraction des caroténoïdes par ASE ..... 76

Tableau I.10 : Comparaison des propriétés d'un gaz, d'un fluide supercritique et d'un liquide. ..... 80

Tableau I.11 : Température et pression critiques de certains fluides supercritiques d'après *(Jessop, 1998)* et *(Lu et al., 2014)* ..... 81

Tableau II.1 : Les photosensibilisateurs appliqués en traitement clinique *(Agostinis et al., 2011).* ..... 131

TableauII.2 : Les PMBs ..... 154

Tableau III.2 : Paramètres maintenues fixe durant l'extraction ..... 194

Tableau III.3 : Les essais relatifs au plan composite à faces centrées et les différents facteurs associés au modèle. ..... 197

Tableau III.4 : Les paramètres associés au plan factoriel choisi et leurs niveaux codifiés ..... 203

Tableau AI.1 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour le kaki exprimé en µg/g de matière sèche. ..... 295

Tableau AI.2 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour le pêche exprimé en µg/g de matière sèche. ..... 296

Tableau AI.3 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour l'abricot exprimé en µg/g de matière sèche. ..... 297

Tableau A II.1: Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for lutein with ($CO_2$+EtOH) extraction ..... 299

Table A II.2 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for zeaxanthin with ($CO_2$+EtOH) extraction. ..... 301

Table A II.3 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for β-cryptoxanthin with ($CO_2$+EtOH) extraction. ..... 303

Table A II. 4 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for β-carotene with ($CO_2$+EtOH) extraction ..... 305

# Liste des Figures

Figure I.1 : Origine de *Prunus armeniaca L*. au Maghreb suivant la proximité spatiale et génétique d'après (*Bourguiba et al., 2012).* ..... 42

Figure I.2 : Répartition géographique de la culture de l'abricot en Tunisie d'après *(Krichen et al., 2010).* ..... 43

Figure I.3 : Production d'abricot durant les 10 dernières années dans le Maghreb *(FAOSTAT, 2015).* ..... 44

Figure I.4 : (a) : Fruit entier, (b) : coupe longitudinale. ..... 44

Figure I.5 : A gauche le plaqueminier, à droite la fleur de *Diospyros kaki* L. ..... 48

Figure I.6 : Coupe transversale du persimmon ..... 48

Figure I.7 : Production de pêches en Afrique du Nord depuis 1993 jusqu'à 2013 d'après *(FAOSTAT, 2015).* ..... 53

Figure I.8 : Coupe longitudinale du fruit de *Prunus persica* L. ..... 54

Figure I.9 : Structure de quelques caroténoïdes présents chez les animaux *(LaFontaine et al., 2013)* ..... 58

Figure I.10 : Structure des caroténoïdes présents dans les algues d'après *(Takaichi, 2011).* ..... 59

Figure I.11 : Structure de quelques xanthophylles et carotènes d'après *(Rivera & Canela-Garayoa, 2012).* ..... 60

Figure I.12 : Structure de quelques caroténoïdes cycliques et acycliques d'après *(Rodriguez- Amaya, 2001).* ... 61

Figure I.13 : Spectre d'absorption UV visible du lycopène (— ), du γ-carotène (---), du β-carotène (-.-.), et de l'α-carotène (…..) dans l'éther de pétrole, d'après *(Rodriguez- Amaya, 2001).* ..... 62

Figure I.14 : Niveaux d'énergie d'un caroténoïde et transitions après excitation *(Jomova & Valko, 2013).* ..... 63

Figure I.15 : Processus de dégradation des caroténoïdes *(Rodriguez- Amaya,2001)* ..... 64

Figure I.16 : Voie de synthèse de l'acide mévalonique. ..... 65

Figure I.17 : Différents stades de biosynthèse des caroténoïdes. ..... 65

Figure I.18 : Schéma de synthèse du phytoène et du lycopène. ..... 66

Figure I.19 : Différentes cyclisations du lycopène *(Britton et al., 1996).* ..... 67

Figure I.20 : Hydroxylation stéréospécifique du β-carotène et formation de la lutéine. ..... 68

Figure I.21 : Différentes localisations du composé à extraire au niveau de la matrice végétale, *(Mustafa & Turner, 2011).* ..... 70

Figure I.22 : Montage d'extraction Soxhlet ..... 71

Figure I.23 : Les différents étapes d'extraction par solvant accélérée *(Giergielewicz-Mozajska et al., 2001).* .... 73

Figure I.24 : Paramètres principaux influençant l'extraction par ASE *(Mustafa & Turner, 2011).* ..... 75

Figure I.25 : Diagramme de phase de $CO_2$ ..... 80

Figure I.26 : Schéma simplifié d'un pilote d'extraction par $CO_2$ supercritique d'après *(Turner, 2006).* ..... 83

Figure I.27 : Effet du temps d'extraction sur l'extraction par $CO_2$ supercritique du β-carotène à 328 K (55°C), à deux pressions 30,4 et 40,5 MPa ; Débit 1mL/min, d'après *(Sanal et al., 2004).* ..... 86

Figure I.28 : Simulation des courbes de rendement d'extraction d'huiles végétales pour des grains génériques à différents diamètres de particules d'après *(Reverchon & Marrone, 2001).* ..... 87

Figure I.29 : Profiles de concentrations des caroténoïdes en fonction de la pression à température : (a) 40°C et (b) 60°C d'après *(Filho et al., 2008).* ..... 89

Figure I.30 : Effet de la température et de la pression sur l'extraction par $CO_2$ supercritique + éthanol du β-carotène (15%, v/v éthanol, t=90 min, Débit = 1 mL/min) d'après *(Sanal et al., 2005).* ..... 89

Figure I.31 : Extraction de lycopène à partir de pelure et pulpe du tomate à des débits de 0,5 et 1,2 mL/min, 70°C, et 400 bars pour le $CO_2$et 5 % (v/v) d'huile de Canola d'après *(Saldana et al., 2010).* ..... 91

Figure II.1 : Reste de Kanam mandible. ..... 122

Figure II.2 : Reste fossilisé de Java Man. ..... 122

Figure II.3 : Sens hiéroglyphique du terme tumeur *(Tu, 2010).* ..... 123

Figure II.4 : A gauche le Papyrus de George Ebert, à droite George Ebert. ..... 123

Figure II.5 : L'Ammi majus (à gauche), la Psoralea corylifolia et ses pépins (à droite). ..... 127

Figure II.6 : Structure chimique de l'acridine et l'acridine orange. ..... 128

Figure II.7 : Structure chimique de l'éosine. ..... 128

Figure II.8 : Structure chimique d'un monomère de l'hématoporphyrine. ..... 129

Figure II.9 : Photographie de Meyer-Betz à droite juste après injection, à gauche après diminution des symptômes d'hypersensibilité 5 jours après. ..... 130

Figure II.10 : Principe de la PDT suivant *(Agostinis et al., 2011).* ..... 132

Figure II.11 : Structures chimiques de la protoporphyrine IX (PpIX) à gauche et de l'acide aminolévulinique (ALA) à droite. ..... 133

Figure II.12 : Structure chimique de la Visudyne. ..... 134

Figure II.13 : Diagramme de Jablonski simplifié décrivant les transferts énergétiques conduisant à la formation d'$^1O_2$. ..... 137

Figure II.14 : Les orbitales moléculaires de l'oxygène à l'état triplet ou singulet. ..... 140

Figure II.15 : Diagramme d'énergie potentielle des trois états électroniques de l'oxygène moléculaire. ..... 140

Figure II.16 : Pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde (nm) *(Agostinis et al., 2011).* ..... 142

Figure II.18 : UCNPs comme support de photosensibilisateur pour application en PDT *(lin et al., 2012)* ..... 143

Figure II.17 : UCNPs doppé avec des lanthanides, les ions dopants confinés à l'intérieur d'une structure noyau/enveloppe par surface de revêtement *(lin et al., 2012).* ..... 143

Figure II.19 : Structure chimique d'un composé porphyrine-œstradiol d'après *(Swamy et al., 2002).* ..... 145

Figure II.20 : Schéma de synthèse d'une tétraphénylporphyrine glycosylée *(Maillard et al., 1989).* ..... 146

Figure II.21 : Les différents étapes de l'angiogenèse *(Weiss et al., 2012).* ..... 148

Figure II.22 : La contribution des intégrines dans la progression et la métastase tumorale *(Desgroellier & Cheresh, 2010)* ..... 149

Figure II.23 : Schéma de la micelle polymérique MPEG poly-(acides β–aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide. ..... 151

Figure II.24 : Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables ..... 151

Figure II.25 : Schéma simplifié du principe d'action d'un *photomolecular beacon.* ..... 152

Figure II.26 : Schéma du *molecular beacon* clivé par les MMP-2 et MMP-9. Sur le squelette de polylysine est attaché le peptide GPLGVRGKC (en vert). Sur la lysine du peptide est greffé le fluorophore FITC (en rouge). . 153

Figure II.27 : Oligonucléotide d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1. ..... 155

Figure II.28 : Oligonucléotides d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1. ..... 155

Figure II.29 : Schéma du PMB utilisant le pyrophéophorbide-a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPL*GV*RGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique). ..... 156

Figure II.28 : Modèle de la dissipation de l'énergie des différents états excités des caroténoïdes et chlorophylles après excitation photonique, $Car_Q$ : mécanisme de quenching non photochimique NPQ *(Britton et al., 2008).* 161

Figure II.31 : Molécules issues de l'oxydation du β–carotène par l'$^1O_2$ avec leur masse molaire correspondantes *(Ramel et al., 2012).* ..... 163

Figure II.32 : Structure du PMB contenant un caroténoïde comme quencher *(Chen et al., 2004).* ..... 164

Figure II.33 : Différents niveaux d'énergies d'excitation et de désexcitation des caroténoïdes en présence de la chlorophylle *(Beck et al., 2015).* ..... 164

Figure II.34 : Schéma simplifié de la démarche adaptée dans notre étude. ..... 167

Figure III.1 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière ..... 189

Figure III.2 : Différents étapes de transformation d'un extrait des caroténoïdes avant analyse HPLV-PDA-MS. 190

Figure III.3 : Montage d'extraction Soxhlet ..... 191

Figure III.4 : Extracteur ASE 350 (Thermo-Scientific-Dionex). ..... 192

Figure III.5 : Remplissage de la cellule avant extraction. ..... 194

Figure III.6 : Schéma technique du pilote d'extraction $CO_2$ (Guiavarc'h, 2015). ..... 196

Figure III.7 : Différents type de facteurs. ..... 201

Figure III.9 : Points expérimentaux pour d'un plan CCF pour 2 facteurs. ..... 204

Figure AI.1 : La distribution de taille des particules pour les poudres de Kaki, pêche et abricot, obtenue par granulométrie laser (Diffusion de la lumière). ..... 297

Figure AI.2 : Etat de la poudre lyophilisée après extraction des caroténoïdes avec ASE conduite sous conditions optimales (persimmon, abricot, pêche). ..... 298

Figure AI.3 : Cellules d'extraction d'ASE en acier inoxydable de V= 22 mL ..... 298

Figure AII.1 : Structures of the all-trans form of the 4 quantified carotenoids of the present study (lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthine, β-carotene). In trends, the polarity of oxygenated carotenoids that are xanthophylls increases with their number of hydroxyl and/or epoxy groups ..... 307

Figure AII.2 : Différents étapes de transformation d'un extrait des caroténoïdes avant analyse. ..... 308

Figure AIII.1 : Chromatogramme associés à la purification des carotènoïdes sur une colonne semi-préparative C30 YMC des extraits ASE pour le kaki. ..... 309

Figure AIII.2 : Courbe de Stern-Volmer du β-carotène dans le toluène ..... 310

Figure AIII.3 : Courbe de Stern-Volmer du β-carotène dans l'hexane ..... 310

Figure AIII.4 : Courbe de Stern-Volmer du β-cryptoxanthine dans l'hexane ..... 310

Figure AIII. 5 : Courbe de Stern-Volmer de la lutéine dans l'hexane ..... 311

Figure AIII. 6 : Courbe de Stern-Volmer du lycopène dans l'hexane ..... 311

Figure AIII. 7 : Courbe de Stern-Volmer du la zéaxanthine dans l'hexane ..... 311

Figure AIII. 8 : Courbe de Stern-Volmer du pic 4 dans l'hexane ..... 312

# Nomenclature

| | |
|---|---|
| **% E** | Pourcentage en éthanol |
| **$^1O_2$** | Oxygène singulet |
| **$S_0$** | Etat fondamental singulet |
| **$S_1$** | Premier état singulet excité |
| **$S_2$** | Deuxième état singulet excité |
| **$\pi$** | Double liaison chimique |
| **$\pi^*$** | Double liaison chimique antiliante |
| **ACN** | Acétonitrile |
| **ADN** | Acide désoxyribonucléique |
| **AH** | Acide hyaluronique |
| **Ahx** | Acide aminohéxanoïque |
| **ALA** | Acide-5-aminolévulinique |
| **APCI** | Ionisation chimique à pression atmosphérique |
| **APPI** | Photo-ionisation à pression atmosphérique |
| **ARN** | Acide ribonucléique |
| **ASAP** | Analyse solide par sonde à pression atmosphérique |
| **ASE** | *Accelerated Solvent Extraction* |
| **atm** | Atmosphère |
| **$a_w$** | Activité de l'eau |
| **BHQ** | *Black Hole Quencher* |
| **BHT** | *Butylated hydroxytoluene* |
| **BPR** | *Back Pressure Regulator* |
| **$C_2H_2F_4$** | 1,1,2,2-tétrafluoroéthane |
| **$C_2H_4$** | Ethylène |
| **$C_2H_6$** | Ethane |

| | |
|---|---|
| **$C_3H_6$** | Propène |
| **$C_3H_8$** | Propane |
| **CCD** | *Central Composite Design* |
| **CCM** | Chromatographie sur couche mince |
| **CHF3** | Trifluorométhane |
| **CIS** | Conversion intersystéme |
| **CLHP-ED** | Chromatographie liquide à haute performance avec détection électrochimique |
| **CNV** | *Choroidal Neaovascularization* |
| **$CO_2$** | Dioxyde de carbone |
| **$CO_2$sc** | Dioxyde de carbone supercritique |
| **d.i** | Diamètre interne |
| **DCM** | Dichlorométhane |
| **DOXP** | 1-déoxylulose 5-phosphate |
| **$d_p$** | Diamètre de particule |
| **EGFR** | *Epidermal Growth Factor Receptor* |
| **EI** | *Electron Ionization* |
| **EMA** | Extraction assistée par micro-ondes |
| **ESI** | *Electrospray Ionization* |
| **$ESI^+$** | *Electrospray Ionization en mode positive* |
| **EUA** | Extraction assistée par ultrasons |
| **FAB** | *Fast Atom Bombardment* |
| **FGF** | *Fibroplast Growth Factor* |
| **GGDP** | Géranyl-géranyl diphosphate |
| **Hp** | Hématoporphyrine |
| **HpD** | *Hematoporphyrine Derivative* |
| **IPP** | IsoPenténYl di-Phosphate |
| **$K_q$** | Constante de quenching |

| | |
|---|---|
| **LCYB** | Enzyme lycopène-β-cyclase |
| **LCYE** | Enzyme lycopène-ε-cyclase |
| **LCPM** | Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire |
| **LED** | *Light-emitting diode* |
| **LRGP** | Laboratoire Réactions et Génie de Procédés |
| **MAL** | Acide méthyle aminolévulinate |
| **MEC** | Matrice Extra-Cellulaire |
| **MPa** | Mégapascal |
| **MMP** | Métalloprotéineases matricielles (*Matrix MetalloProteineases*) |
| **MPM** | Mésothéliome pleural maligne |
| **MS** | *Masse spectroscopy* |
| **MTBE** | Méthyl-ter-butyl-éther |
| ***m*-THPC** | méta-tétrahydroxyphénylchlorine |
| **MVA** | *Mevalonic acid pathway* |
| **MB** | *Molecular Beacon* |
| **$NH_3$** | Ammoniac |
| **NPQ** | *Non-Photochemical Quenching* |
| **NRP** | Neuropiline |
| **$NRP_1$** | Neuropiline-1 |
| **NRG** | Séquence peptidiques H-Asn-Gly-Arg-OH |
| **Pc** | Pression critique |
| **PDA** | *Photodiode Array Detector* |
| **PDS** | Enzyme phytoène désaturase |
| **PLE** | *Pressurized liquid extraction* |
| **PMB** | *Photodynamic Molecular Beacon* |
| **PPDP** | Préphytoène diphosphate |
| **PpIX** | Protoporphyrine IX |

| | |
|---|---|
| **PS** | Photosensibilisateur |
| **PSA** | *Prostate-Specific Antigen* |
| **$R_{134}a$** | 1,1,2,2-tétrafluoroéthane frigorigène |
| **RGD** | Séquence peptidique H-Arg-Gly-Asp-OH |
| **ROS** | *Reactive Oxygen Species* |
| **sBCC** | Carcinome baso-cellulaire superficiel |
| **SFE** | *Supercritical Fluid Extraction* |
| **$T_1$** | Premier état triplet excité |
| **Tc** | Température critique |
| **TEA** | Triéthylamine |
| **THF** | Tétrahydrofurane |
| **TLS** | *Thermal Lens Spectroscopy* |
| **UV** | Ultra-violet |
| **Vde** | Enzyme violaxanthine dé-époxidase |
| **VEGF** | *Vascular Endothelial Growth Factor* |
| **VEGFR** | *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* |
| **VTP** | *Vascular Targeted Photodynamic therapy* |
| **ZDS** | Enzyme ζ-carotène désaturase |
| **Z-ISO** | Enzyme 15-*cis*-ζ-carotène isomérase |

# INTRODUCTION GENERALE

La thérapie photodynamique (PDT) peut se présenter comme une modalité thérapeutique anticancéreuse locorégionale à visée curative ou palliative basée sur l'interaction entre trois composants clés essentiels à la mise en œuvre du processus photodynamique : le photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène. Après administration du PS et un temps nécessaire à une biodistribution adéquate (de l'ordre de quelques minutes à deux jours), l'activation du PS est assurée par irradiation lumineuse à une longueur d'onde et une puissance données, menant à la destruction des tissus tumoraux par nécrose ou apoptose. Après irradiation lumineuse du tissu néoplasique atteint, le photosensibilisateur est excité électroniquement et l'état excité du PS va conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) issues des réactions de photooxydation en présence d'oxygène moléculaire. Parmi ces espèces, on distingue l'oxygène singulet admis pour être l'acteur principal des réactions cytotoxiques cellulaires. L'oxygène singulet est une espèce extrêmement réactive du dioxygène, capable de réagir avec divers substrats biologiques provoquant ainsi la mort cellulaire. Dans le cas de la PDT, seuls les tissus qui ont incorporé le PS sont concernés par les réactions cytotoxiques générées par l'oxygène singulet, donnant ainsi une résolution spatiale excellente et une protection des tissus biologiques sains.

Malgré les aspects attractifs de la PDT, cette thérapie présente certaines limites, comme une faible sélèctivité des PS pour les tissus cancéreux. Afin de surmonter cette limite, la communauté scientifique s'intéresse à améliorer la sélectivité du traitement. Pour ce faire des progrès ont été réalisés dans i) l'excitation lumineuse avec l'utilisation des fibres, ou l'excitation biphotonique ou par upconversion, ii) l'élaboration de PS conjugués à des vecteurs ciblant des récepteurs membranaires surexprimés sur les cellules cancéreuses iii) l'élaboration de systèmes macromoléculaires ne produisant de l'oxygène singulet qu'une fois dans la zone tumorale.

Le LRGP et le LCPM s'intéressent au développement de constructions moléculaires (hybrides) appelées *Photodynamic Molecular Beacons* (PMB), composé d'un PS associé à un inhibiteur d'états excités (quencher, Q), couplés *via* un marqueur spécifique des tissus tumoraux.

Le PMB est doué d'une non expression de ses propriétés photophysiques là òu les marqueurs tumoraux spécifiques ne sont pas exprimés et ne pourra exprimer sa toxicité qu'au niveau de la zone tumorale.

Lors de thèses antérieures, l'approche a consisté à cibler les métalloprotéineases matricielles (MMP), qui représentent une famille d'enzymes surexprimées pendant la phase de croissance angiogénique. Une famille de PMB a été élaborée, utilisant un photosensibilisateur couplé à un inhibiteur le Black Berry Quencher (BBQ650), *via* des peptides substrats des MPP-2, MMP-9 ou MMP-14. Les caractérisations photophysiques effectués sur ces PMBs ont permis de prouver la faisabilité du

couplage entre le PS et le BBQ650 comme un bon couple donneur/ accepteur pour des applications en PDT. Ainsi, le BBQ650 s'est révélé être un quencher efficace inhibant totalement la production d'oxygène singulet à des distances relativement courtes.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la poursuite des efforts dans l'amélioration des PMB. La finalité stratégique optée dans ce travail a été l'amélioration de la partie inhibition de production d'oxygène singulet par le PS, en cherchant de nouveaux *quenchers* d'oxygène singulet pouvant être plus efficaces en terme de transfert d'énergie, et plus adaptés au développement de nouveaux PMBs. Des composés faciles d'accès représentent un intérêt considérable pour les PMBs ou pour d'autre application visant l'inhibition de l'oxygène singulet.

La nature représente un milieu riche et varié en molécules dotées d'activité antioxydante ou acceptrice d'énergie. Chez les plantes, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) sont des pigments associés à la photosynthèse, qui ont deux rôles principaux : un rôle de collecteur de lumière et un rôle photoprotecteur en protégeant le(s) système(s) photosynthétique(s) contre les dommages photooxydatifs liés à une exposition trop intense à la lumière. Les caroténoïdes ont un rôle clé dans la photosynthèse, transférant l'énergie lumineuse à la chlorophylle. Ceci s'opère, entre autre, *via* le cycle des xanthophylles. Cette aptitude à capter de l'énergie présente un intérêt potentiel à ne pas négliger dans la perspective de la conception de PMB utilisables en thérapie photodynamique. Ces pigments participent aussi dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique, en quenchant l'état triplet des chlorophylles, l'oxygène singulet et en inhibant les radicaux libres.

Nous avons choisi d'étudier les caroténoïdes comme des *quenchers* potentiel d'oxygène singulet. Si les caroténoïdes se retrouvent dans une majorité de fruits et légumes, il nous a semblé intéressant de prendre les fruits de persimmons (*Diospyros kaki* L.), abricots (*Prunus armeniaca* L.) et pêche (*Prunus persica* L.), encore peu exploités en Tunisie.

Il nous a fallu extraire les différents caroténoïdes présents dans les trois fruits, optimiser cette extraction, identifier les différents composés. Enfin, nous avons évalué leur constante d'inhibition d'oxygène singulet.

Ce manuscrit débute par une introduction générale qui donne un aperçu global sur le sujet. Dans un premier chapitre, je commencerai par une vue générale sur les fruits étudiés. La deuxième partie de ce chapitre consistera en la description des caroténoïdes ainsi que les techniques majeures d'extraction appliquées pour l'obtention de ces pigments.

Le second chapitre exposera l'histoire du cancer, traitera de la thérapie photodynamique, en particulier l'importance de l'oxygène singulet dans cette technique et le développement de *Photo Molecular Beacon* améliorant la sélectivité de la PDT.

Un troisième chapitre sera consacré aux matériels et méthodes utilisés pendant notre étude, décrivant les différents procédés d'extraction, d'analyses et de purification appliqués pour l'extraction des caroténoïdes, la méthodologie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation et la modélisation y sera abordée suivie de la description des différents paramètres étudiés.

Le quatrième chapitre sera consacré à l'optimisation de l'extraction des caroténoïdes par solvant accélérée (Accelerated Solvent Extraction; ASE). Une publication (Zaghdoudi et al., Food Chemistry, 2015) représentera le corps de cette partie.

Un cinquième chapitre, portera sur l'optimisation de l'extraction des caroténoïdes par Fluide supercritique ($CO_2$), une publication soumise (Zaghdoudi et al., Food Chemistry, 2015) représentera le corps de ce chapitre.

Enfin, un sixième chapitre, sera consacré à la purification des caroténoïdes et à l'étude des propriétés de *quenching* d'oxygène singulet. Une publication en cours d'élaboration représentera le corps de ce chapitre.

La conclusion générale de ce travail mettra l'accent sur le bilan des résultats obtenus dans la présente étude en ouvrant sur des perspectives.

# Chapitre I : Fruits et Caroténoïdes

# I Fruits et caroténoïdes

## I.1 L'abricotier, *Prunus armeniaca L.*

L'abricotier, *Prunus armeniaca L.*dans la classification officielle de Carl von Linne, est supposé être originaire d'Arménie *(Orhan & Kartal, 2010)*. Il est cependant difficile de déterminer l'origine exacte de l'abricotier. En effet, on le trouve majoritairement en Inde *(Kan & Bostan, 2010) (Hussain et al, 2011)* et en Chine *(Solis-solis et al, 2007) (Bailey & Hough, 1975)*, où les botanistes pensent que la domestication de l'abricotier a eu lieu. Elle aurait été suivie d'une diffusion à travers l'Asie centrale et la région Irano-Caucasienne qui est le troisième centre de diversification *(Vavilov, 1992)*. La domestication des plantes est un processus de sélection artificielle menée par l'homme afin d'accentuer certains caractères intéressants et d'en amoindrir d'autres, non-désirés et présents chez les plantes sauvages.

### I.1.1 Propagation de *Prunus armeniaca L.* à travers le monde

Les régions ou *Prunus armeniaca L.* s'est bien développé sont le Nord de la Chine, la Mandchourie, la Corée du Nord, les montagnes du Khingan et le Nord-Est de la Mongolie*, (Kostina, 1969)*. On a pu classifier la provenance des abricots en six groupes éco-géographiques suivant leur diversité génétique, répertoriés dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Classification éco-géographique de l'abricot

| | |
|---|---|
| Groupe 1 : Asie centrale | Groupe 2 : Irano-caucasien |
| Groupe 3 : Europe | Groupe 4 : Dzhugar-Zailij |
| Groupe 5 : Nord de la Chine | Groupe 6 : Est de la Chine |

**Le groupe 1** est le plus ancien et le plus riche en diversité. Ce groupe contient les régions de Xinjiang, l'Afghanistan, le Baloutchistan, le Pakistan, le nord de l'Inde (Kashmir). **Le groupe 2** s'étend sur l'Arménie, la Géorgie, l'Azerbaïdjan, le Daghestan, l'Iran, la Syrie, la Turquie jusqu'au Nord de l'Afrique ainsi qu'en Espagne et en Italie. L'abricot s'est répandu aussi en Amérique du Nord, en Afrique du Sud et en Australie. Ces zones sont classées dans le 3éme groupe qui sont majoritairement liée à l'Arménie, Iran, Turquie et quelques pays arabes *(Yilmaz & Gurcan, 2012)*. L'introduction de l'abricot en Europe est la plus récente, plus précisément dans le sud de l'Europe en Grèce et en Italie, réalisée par des commerçants arméniens. L'introduction de l'abricot sur le bassin

méditerranéen a été assurée par les Arabes. Différentes variétés d'abricots ont été introduites provenant de l'Arménie et de l'Afrique du Nord, de l'Europe centrale et de la Hongrie *(Mehlenbacher et al., 1990) (Faust et al., 1998).* Les zones principales de production d'abricots en France se situent dans le Languedoc-Roussillon et dans la Vallée du Rhône.

### I.1.2 L'abricotier en Afrique du Nord

En Afrique du Nord, l'introduction de l'abricot a été assurée par différentes civilisations : les phéniciens, les Romains et les arabes.

La culture de l'abricot dans le Maghreb (Tunisie, Algérie & Maroc) a débuté au 12$^{ème}$ siècle et sa propagation interne a été assurée par greffage et principalement par ensemencement *(Clement, 1977).* Le *Prunus armeniaca* L. cultivé au Maghreb appartient au groupe éco-géographique Irano-Caucasien *(Bourguiba et al., 2012).* La figure I.1 illustre l'origine de l'abricot cultivé au Maghreb en fonction de la proximité spatiale et génétique.

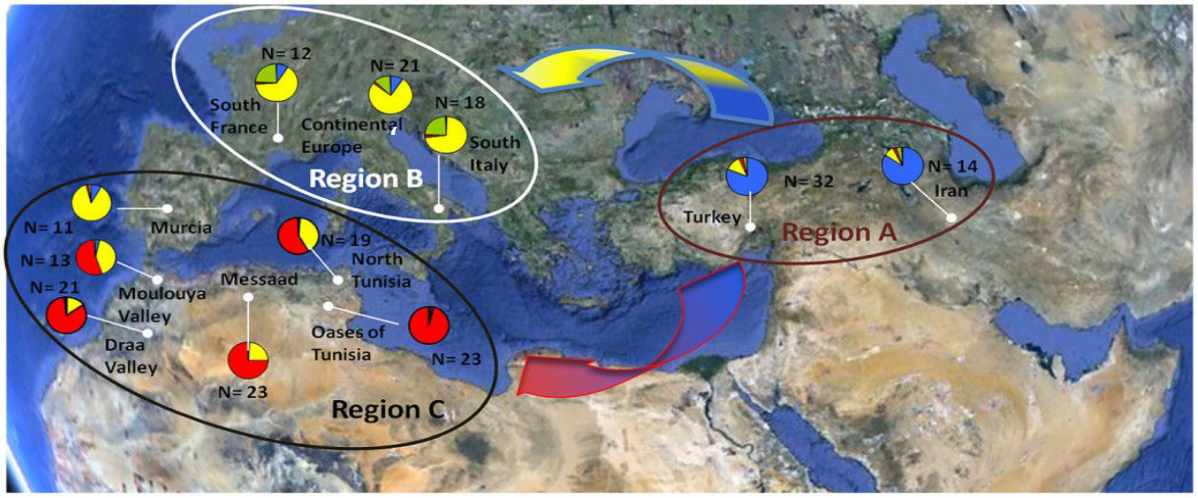



Figure I.1 : Origine de *Prunus armeniaca L.* au Maghreb suivant la proximité spatiale et génétique d'après *(Bourguiba et al., 2012).*

En Tunisie, l'abricotier est cultivé dans les zones arides, semi-arides, subhumides et humides. Il se propage du Nord (Ras Jebel, Testour), jusqu'au sud (Gafsa, Djerba, Gabes…) passant par le centre (Kairouan, Mehdia…). On le trouve aussi en oasis (Nefta, Tozeur…). La figure II.2 présente la répartition géographique de la culture d'abricots en Tunisie *(Krichen et al., 2010).*

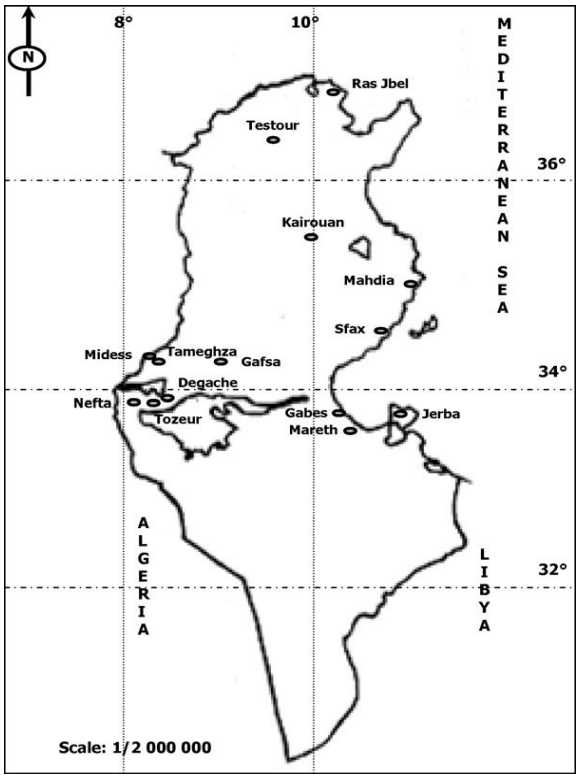



Figure I.2 : Répartition géographique de la culture de l'abricot en Tunisie d'après *(Krichen et al., 2010)*.

### I.1.3 Production mondiale

La production mondiale de l'abricot a augmenté ces 50 dernières années. Entre 1961 et 2009, cette production est passée de 1 317 607 à 3 728 083 tonnes d'après la banque de données *FAOSTAT, (2011)*. Suivant la même source d'informations en 2005, la production mondiale était de 2,6 millions de tonnes avec une production de 370 000 tonnes pour la Turquie, 285 000 tonnes pour l'Iran et 244 000 tonnes en Italie, qui représentent les trois grands pays producteurs d'abricot *(Gatti et al., 2009)*.

En Afrique du Nord, la production d'abricots durant ces dix dernières années est passée de 213187 tonnes à 468954 tonnes en 2013, l'Algérie étant leader dans cette production. (Figure. I.3) *(FOASTAT, 2015)*.

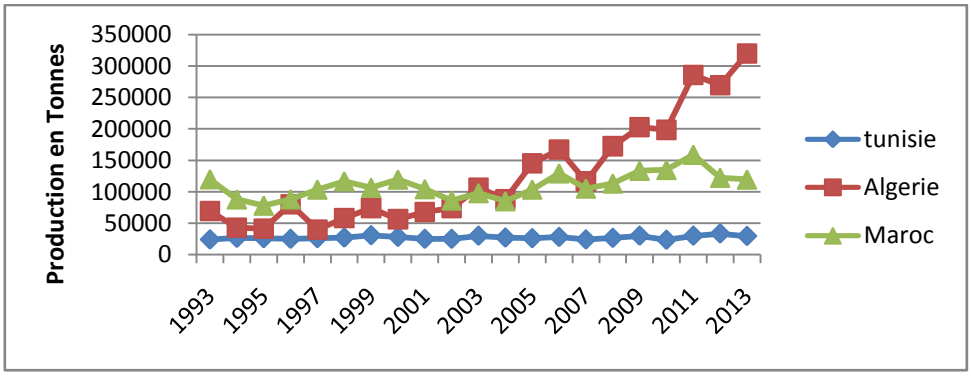



Figure I.3 : Production d'abricot durant les 10 dernières années dans le Maghreb *(FAOSTAT, 2015).*

## I.1.4 Description botanique

### *I.1.4.1 Données Générales*

L'abricotier peut atteindre 10 mètres, mais pour des raisons de production, il est maintenu à une hauteur de 3,5 m. Les feuilles sont caduques, de forme elliptique cordiforme, lisses avec des bords crénelés et dentés. Les fleurs sont pentamères de couleur blanche /rose pâle et contiennent plusieurs étamines.

Le fruit de l'abricotier est de forme globuleuse (drupe), et présente une peau (épicarpe) charnue veloutée et comestible. La chaire (mésocarpe) représente la partie interne du fruit. C'est un parenchyme qui, comme pour nombre de fruits, devient mou à maturité en raison des actions combinées de pectine méthylestérases et de polygalacturonases. L'endocarpe entoure le noyau.

La couleur du fruit est une caractéristique de la variété ; on trouve des abricots de couleur blanche, avec des petites tâches rose, orange et rouge.

La figure I.4 représente une photographie de l'abricot à maturité ainsi qu'une coupe longitudinale du fruit.

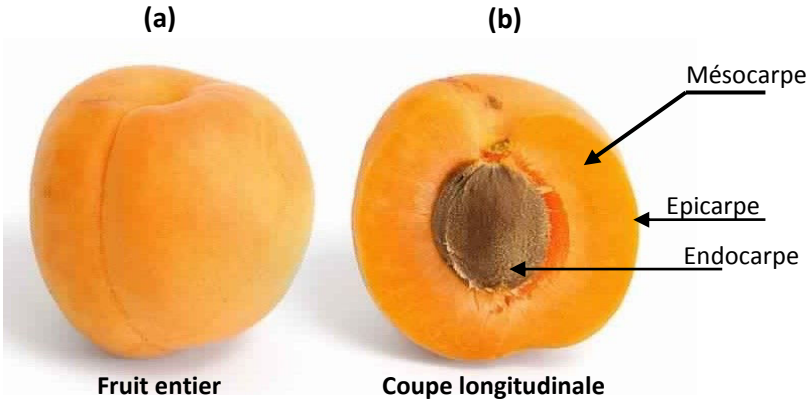



Figure I.4 : (a) : Fruit entier, (b) : coupe longitudinale.

### I.1.4.2 Conditions de culture

L'abricot appartient à la classe des fruits climactériques, c'est-à-dire dont la maturation est dépendante de la production d'éthylène comme hormone végétale et d'une augmentation de la respiration cellulaire des tissus. L'abricotier est un arbre adapté au climat continental qui peut supporter des températures hivernales de -30°C *(Hussain et al., 2011).* Il est bien adapté au climat méditerranéen chaud, avec un hiver froid, et s'adapte aux changements de températures *(Kan & Bostan, 2010).*

### I.1.4.3 Classification Botanique

Le tableau (I.2) illustre la classification botanique de *Prunus armeniaca L*.

Tableau I.2 : Classification Botanique du *Prunus armeniaca L.*

| **Règne** | ***Plantae*** |
|---|---|
| **Sous-règne** | *Tracheobionta* |
| **Division** | *Magnoliophyta* |
| **Classe** | *Magnoliopsida* |
| **Sous-classe** | *Rosidae* |
| **Ordre** | *Rosales* |
| **Famille** | *Rosacée* |
| **Sous-famille** | *Prunoideae* |
| **Genre** | *Prunus* |

## I.1.5 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit

L'abricot représente une source riche en acides gras, protéines (2,8 à 4,3 %), fibres (0,77 à 2,42 %), et sucres, avec des teneurs en glucose, fructose et saccharose de 8,1, 4.5, et 29,3 g/100 g de fruit frais, respectivement *(Danish Food composition Databank, 2009)*.

L'abricot est riche en eau, contient entre 75 % et 90 % d'eau suivant la variété et la maturité. Le fruit mature présente un pH compris entre 3,8 et 5,6 et une acidité titrable faible *(Akin et al., 2008)(Haciseferogullari et al., 2007) (Milosevic et al., 2012)*. De nombreux polyphénols sont présents dans l'abricot, comme les acides chlorogéniques, néochlorogéniques, féruliques et caféique, la catéchine et l'epicatéchine, les procyanidines B1, B2 et B3, la quercitine et le camphérol *(Uzelac et al., 2005)(Uzelac et al., 2007) (Kan & Bostan, 2010)(Radi et al., 1997)*.

Les acides organiques majoritaires présents dans l'abricot sont les acides citrique, malique et ascorbique *(Akin et al., 2008)*.

Les caroténoïdes représentent une classe de molécules bioactives bien présente dans l'abricot. Les caroténoïdes majoritaires sont la lutéine, la zéaxanthine, la β-cryptoxanthine, le lycopène, le δ-carotène, et le β-carotène avec une teneur en β-carotène qui représente 70-85% des caroténoïdes totaux à maturité. Ceci contribue à la couleur du fruit *(Uzelac et al., 2007)(Akin et al.,2008) (Sanal et al., 2004)*. Les teneurs en caroténoïdes fluctuent d'une variété à une autre, comme en témoignent les différentes valeurs trouvées dans la littérature *(Orhan & Kartal, 2010)*.

L'abricot représente une source riche en minéraux et éléments traces, tels que Na, P, Mg, Ca et K, avec une teneur élevée en potassium *(Ali et al.,2011)* fer et zinc *(Saracoglu et al., 2009)*.

## I.2 Le persimmon, *Diospyros kaki L.*

Depuis la période préhistorique, les persimmons, appelés aussi kaki (*Diospyros kaki* L.) ont été cultivés en Chine, au Japon et en Corée *(Yamagishi et al., 2005)*. Les persimmons japonais (*Diospyros kaki* L.) sont les plus connus des espèces des persimmons. L'arbre qui les produit est appelé plaqueminier. Il y a environ mille variétés de persimmons que l'on peut diviser en groupes selon leur couleur et leur astringence *(Itoo, 1980)*.

Au XVII$^{ème}$ siècle, les européens font la connaissance du *Diospyros kaki* L., grâce aux moines jésuites qui ont voyagé en Chine, notamment le moine Ricci, en 1613 *(Evreinoff, 1948)*. Les persimmons furent ainsi introduits dans le bassin méditerranéen il y a plus d'un siècle *(Telis et al., 2000)*.

Ces dernières années, la culture du plaqueminier, et donc la production de persimmon, s'est un peu développée aux Etats Unis d'Amérique et en France.

### I.2.1 Propagation des persimmons à travers le monde

Les persimmons sont principalement cultivés en Chine, au Japon et en Corée. Le plaqueminier du Japon pousse naturellement dans le nord de la Chine. Sa culture qui date d'environ mille ans, s'étend sur les provinces du nord, le Shan-Hsi, le Shan-Tung, le Ho-Nan, le Chi Li *(Evreinoff, 1948)*. La culture de ces espèces s'est largement répandue en dehors de la Chine et du Japon pour devenir l'une des principales ressources alimentaires à travers les pays de l'Asie.

Outre l'Asie, la culture se développe en Californie, en Italie, au Brésil, en Nouvelle Zélande et en Australie. Elle a gagné en popularité dans les pays méditerranéens *(Clark & MacFall , 2003)*.

Comme nous l'avons mentionné, l'introduction du *kaki* en Europe a été réalisée au début de XVII$^{ème}$ siècle. En France, la culture de ce fruit tropical a pris de l'importance à la fin du XIX$^{ème}$ siècle. En Italie, le *kaki* s'est répandu à partir de 1876. Il est apparu en 1888 en Russie, notamment au Caucase,

et est largement cultivé sur les bords des mers Noire, Caspienne, aussi qu'en Géorgie *(Evreinoff, 1948)*.

Le *Diospyros kaki L.* s'est répandu aux Etats Unis à la fin du XIX$^{ème}$ siècle, réparti dans les états du sud, en Californie, et en Floride. En 1927, on comptait ainsi 88000 arbres de *Diospyros kaki L.* *(Evreinoff, 1948)*.

La production des persimmons s'est développée durant les 30 dernières années en Australie et en Nouvelle Zélande. En Australie, la plantation des persimmons a débuté en 1970 pour atteindre 200000 arbres en 1993 *(Collins & Tisdell, 1995)*. La présence de ce fruit tropical en Algérie date de 1894 *(Evreinoff, 1948)*.

Au Maroc, le *kaki* est connu depuis des décennies. Sa culture est réalisée dans les zones Khémisset-Meknès et la région de Rabat-Kénitra. La plantation est estimée à 10 hectares seulement.

En Tunisie, les persimmons sont cultivés dans le nord, dans les zones de Nefza, Ain-Drahim, Jendouba et au cap bon. La production reste faible, aussi ce précieux fruit reste non connu chez le consommateur tunisien. Pourtant, la culture de ces arbres ne demande pas de suivi particulier. Malgré la richesse nutritionnelle de ces fruits, en fibres, polyphénols, caroténoïdes, protéines, les persimmons ne sont pas encore assez valorisés en Tunisie.

### I.2.2 Production mondiale

La production mondiale des persimmons est d'environ 1 200 000 tonnes annuellement sur une surface de 235 000 ha, avec une production en Chine d'environ 57 % et 27 % au Japon. La production intensive des persimmons se développe en Italie (70 000 tonnes), en Corée (50 000 tonnes), au Brésil (45 000 tonnes), en Espagne (8000 tonnes), et aux Etat Unis (7000 tonnes) *(Telis et al., 2000)*.

### I.2.3 Description botanique

#### *I.2.3.1 Données générales*

Le persimmon est un arbre au port étalé d'environ 6 mètres de hauteur, qui possède des feuilles caduques ovales vert sombre, qui deviennent jaune à orange profond en automne, des fleurs de couleur crème, de fruits orange ou jaunes de diamètre d'environ 8 cm *(Gaston Bonnier, 1990)*(Figure. I.5). Les persimmons sont de couleur orange, d'un goût doux et de texture charnue *(Daood et al., 1992)* et présentent une pelure rouge-orange lustrée dure et une pulpe de couleur orange-jaune avec un goût sucré *(Nicoletia et al., 2005)*.

La coupe transversale du persimmon à maturité (Figure. I.6), montre (de l'extérieur vers l'intérieur) la zone épidermique de couleur verte, la pulpe de couleur vert-jaune et la présence d'une partie pétale verdâtre.



Figure I.5 : A gauche le plaqueminier, à droite la fleur de *Diospyros kaki* L.

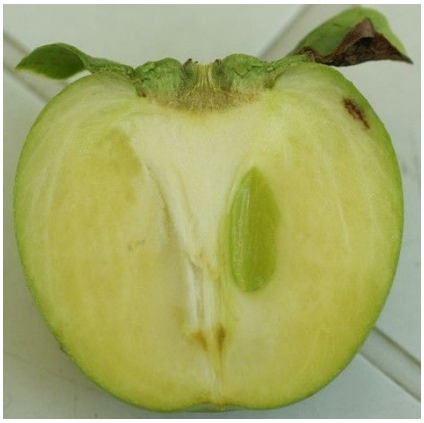


Figure I.6 : Coupe transversale du persimmon

La classification botanique des persimmons est décrite dans le tableau (I.3) *(Gaston Bonnier, 1990)*.

Tableau I.3 : Classification botanique des *Diospyros kaki* L.

| **Classification** | |
|---|---|
| **Phylum** | *Accomycota* |
| **Règne** | *Plantae* |
| **Classe** | *Magnoliopsida* |
| **Sous-classe** | *Dilleniidae* |
| **Ordre** | *Ebanales* |
| **Famille** | *Ebenaceae* |
| **Genre** | *Diospyros* |
| **Espèce** | *Diospyros kaki L.* |

### *I.2.3.2 Les différentes variétés de Diospyros kaki L.*

Les persimmons japonais (*Diospyros kaki* L.) sont souvent classés selon deux types, astringent et non astringent, dépendant du degré de l'astringence au stade de maturité *(Asgar et al., 2003)*. Les fruits des deux types sont caractérisés par leur coloration orange-rouge intense qui augmente durant la maturation *(Clark & MacFall, 2003)*. Ce fruit caduc compte plus de 1000 variétés locales au Japon, en Chine et en Corée *(Collins & Tisdell, 1995)*. Les plus connus sont : Hiratanenashi, Tone-wase, Ishibashi-wase, Matsumoto-wase-Fuyu et Maekawa-Jiro *(Suzuki et al., 2005)*.

## I.2.4 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit

Plusieurs composés bioactifs comme les polyphénols, flavonoïdes, terpènoïdes, stéroïdes, fibres, caroténoïdes et minéraux sont présents dans les pelures du persimmon *(Yokozawa et al., 2007)*. Par comparaison avec d'autres fruits très consommés comme les pommes, pêches, poires et oranges, les fruits de persimmon contiennent un taux de sucre élevé de l'ordre de 12,5 g/100 g de fruit frais, majoritairement du sucrose, du glucose et du fructose *(Del Bubba et al., 2009)*. Ils présentent une teneur moyenne totale en polyphénols de 1,45 g/100 g de fruit frais ainsi que 1,48 g de fibre/100 g de fruit frais *(Gorinsteinet al., 1999)*.

La pulpe des fruits représente une source de vitamine A, vitamine C, calcium et fer *(Nicoletia et al., 2005)*. Le tableau I.4 résume la composition de ce fruit en vitamines C et A, fer et calcium.

Tableau I.4 : Composition en vitamines, Ca et Fe (g/Kg de Matière fraîche) de la pelure.

| Vitamines | Composition en g/Kg |
|---|---|
| **Vitamine C** | 0,70 |
| **Vitamine A** | 0,65 |
| **Calcium** | 0,90 |
| **Fer** | 0,02 |

Dans les tableaux I.5.a, I.5.b et I.5.c sont consignées les teneurs en sucres, caroténoïdes et acides organiques présents dans les pelures de 11 variétés de persimmon *(Veberic et al., 2009)*.

Tableau I.5a : Taux de sucres, saccharose, fructose et glucose dans les pelures de 11 variétés du de persimmon (g/kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009)*.

| Diospyros kaki (var.) | Saccharose | Fructose | Glucose | Sucres totaux |
|---|---|---|---|---|
| **Aman kaki** | 10,4 | 55,9 | 60,5s | 127 |
| **Cal Fuyu** | 9,90 | 42,0 | 53,7 | 108 |
| **Fuji** | 11,5 | 52,9 | 66,3 | 132 |
| **Hana Fuyu** | 9,99 | 44,2 | 53,6 | 108 |
| **Jiro** | 11,2 | 44,2 | 60,5 | 120 |
| **O gosho** | 9,16 | 38,0 | 47,8 | 106 |
| **Tenjino gosho** | 9,47 | 46,0 | 61,8 | 117 |
| **Thiene** | 11,5 | 63,6 | 79,9 | 156 |
| **Tipo** | 10,3 | 46,6 | 68,2 | 126 |
| **Tone wase** | 10,2 | 77,8 | 87,9 | 178 |
| **Triumph** | 12,2 | 68,5 | 76,7 | 160 |

Tableau I.5.b : Acides citrique, malique et fumarique et acides totaux présents dans les pelures de 11 variétés de persimmons (mg /kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009)*.

| ***Diospyros kaki* (var.)** | **Acide citrique** | **Acide malique** | **Acide fumarique** | **Acides totaux** |
|---|---|---|---|---|
| **Aman kaki** | 305 | **839** | 125 | 1296 |
| **Cal Fuyu** | 251 | 576 | 23.2 | 897 |
| **Fuji** | 285 | 556 | 31.3 | 1007 |
| **Hana Fuyu** | 331 | 477 | 58.3 | 788 |
| **Jiro** | 230 | 401 | 27.4 | 681 |
| **O gosho** | 257 | 532 | 24.0 | 804 |
| **Tenjin o gosho** | 196 | 499 | 14.7 | 729 |
| **Thiene** | 351 | 853 | 97.1 | 1344 |
| **Tipo** | 352 | **934** | 146 | 1436 |
| **Tone wase** | 701 | 452 | 13,8 | 1186 |
| **Triumph** | 366 | **1044** | 68,8 | 1442 |

Tableau I.5.c : Teneur en zéaxanthine, β-cryptoxanthine, α-carotène et β-carotène ainsi qu'en caroténoïdes totaux dans les pelures de 11 variétés de de persimmon (µg/Kg de Matière Fraîche), d'après *(Veberic et al., 2009)*.

| ***Diospyros kaki* (var.)** | **Zéaxanthine** | **β-cryptoxanthine** | **α-carotène** | **β-carotène** | **Caroténoïdes totaux** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Aman kaki** | 190 | 327 | 1088 | 4044 | 5670 |
| **Cal Fuyu** | 300 | 767 | 1.68 | 4179 | 6975 |
| **Fuji** | 300 | 784 | 1385 | 4286 | 7127 |
| **Hana Fuyu** | 415 | 789 | 2047 | **8747** | 12235 |
| **Jiro** | 165 | 477 | 784 | 2653 | 4090 |
| **O gosho** | 435 | 686 | 1892 | 5844 | 9181 |
| **Tenjin o gosho** | 356 | 1254 | 1976 | **6780** | 10616 |
| **Thiene** | 200 | 283 | 652 | 2390 | 3517 |
| **Tipo** | 184 | 366 | 671 | 2733 | 3962 |
| **Tone wase** | 310 | 581 | 1447 | 4940 | 7000 |
| **Triumph** | 267 | 1232 | 1187 | **4285** | 6609 |

La teneur en sucre est influencée par la variété et le lieu de culture ; les variétés Tone wase et Triumph sont les plus riches en sucres (particulièrement le sucrose et le fructose). Concernant l'acidité, la variété Triumph est la plus acide (1442 mg/kg fruit frais). Le β-carotène présente la teneur la plus élevée dans les pelures des persimmons.

La bioactivité des persimmons est attribuée aux fibres solubles, aux minéraux, aux éléments traces et aux composés phénoliques. *(Park et al., 2005)* ont identifié la présence d'éléments traces (Zn, Mn, Cu) dans les persimmons frais et séchés, ainsi que de certains minéraux (K, Mg, Ca, Na).

## I.3 La pêche, *Prunus persica* L.

Le *Prunus persica* L., ou pêcher commun, est originaire de Chine où il est cultivé depuis 4500 ans *(Aranzana et al., 2010)*. On trouve aujourd'hui le pêcher en Asie, en Europe, en Afrique du nord et en Amérique. Le nom ''persica'' a été attribué à l'espèce par les Romains qui croyaient que son origine était la Perse.

### I.3.1 Propagation du *Prunus persica L.* à travers le monde

Le pêcher s'est propagé il y a environ 3000 ans de la Chine vers le continent asiatique, puis vers la Perse il y a 2000 ans suivie de l'Europe (Grèce, France et Angleterre) et enfin l'Amérique. On trouve aussi le pêcher dans la région du Népal, le plateau Tibétain et l'Inde *(Badenes & Bryne, 2012)*.
Le pêcher s'est propagé de son centre d'origine vers l'extérieur par deux voies : la première est la mer vers l'Inde et l'Asie de l'ouest, la deuxième par les routes de la soie à travers la Perse *(Janick, 2003)*.

### I.3.2 Le Pêcher en Nord Afrique

Le pêcher, tout comme l'abricotier, est bien présent en Afrique du nord (région du Maghreb), introduit par les Romains. En Tunisie, la culture du pêcher couvre environ 22714 hectares *(Mdellel & Ben Halima, 2012) ;* au Maroc la surface de culture est plus faible environ 3600 hectares *(Mahhou et al., 1996)*. En Algérie, la surface de culture est d'environ 10146 hectares *(Belhadj, 2003)*.

### I.3.3 Production mondiale

*Prunus persica* L. est classé comme le troisième arbre tempéré fruitier après le pommier et le poirier. La production mondiale de pêches a augmenté de 7,7 millions de tonnes en 1980 à 17,8 millions de tonnes en 2008. Cette augmentation de production a été observée principalement en Chine, ainsi qu'en Corée, au Chili, en Espagne, en Egypte, en Tunisie et en Algérie, pays dans lesquels la

production a doublé durant les trois dernières décennies *(Badenes & Bryne, 2012)*. La production mondiale de pêches atteint en 2013 environ 21,6 millions de tonnes. Les cinq plus grands producteurs sont la Chine, l'Italie, l'Espagne, l'Amérique et la Grèce *(FAOSTAT, 2015)*.

Dans la région du Maghreb, la production de pêches durant ces 10 dernières années a triplé, passant de 134191 tonnes en 1993 à 396814 tonnes en 2013, l'Algérie étant en tête de production (Figure I.7).

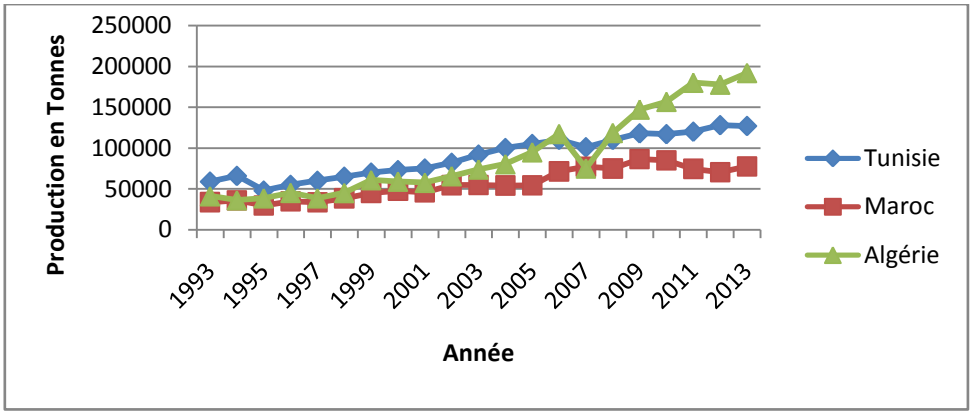



Figure I.7 : Production de pêches en Afrique du Nord depuis 1993 jusqu'à 2013 d'après *(FAOSTAT, 2015)*.

## I.3.4 Description Botanique

### *I.3.4.1 Données générales*

Le pêcher est de hauteur comprise entre 3 et 7 mètres, large au sommet, souvent sans tronc central. C'est un arbre à écorce sombre et lisse, brun rougeâtre pour les vieux arbres. Les branches sont étalées et minces avec des brindilles rondes et glabres.

Le pêcher présente des feuilles caduques alternées, de couleur verte, qui dégagent une odeur d'amande. Les fleurs sont sous forme de boutons de formes coniques ou obtues et apparaissent avant les feuilles. Elles sont hermaphrodites à cinq pétales contenant entre 20 et 25 étamines. La couleur vire du blanc, au rose et au rougeâtre.

Le fruit est une drupe charnue de forme globulaire. La forme et la taille sont caractéristiques de la variété. Le fruit est caractérisé par une cavité abrupte bien distincte, et un apex avec un mucron. La couleur du fruit varie du blanc verdâtre à jaune-orange, et peut être rouge sur les côtés exposés au soleil. La peau (épicarpe) est adhérente et la chair (mésocarpe) est blanc-verdâtre ou jaunâtre teintée de rouge. Le fruit présente une forme elliptique ou ovoïde, parfois plate avec un noyau aromatique et amère *(Hedrick, 1917)*, comme le montre la figure I.8.

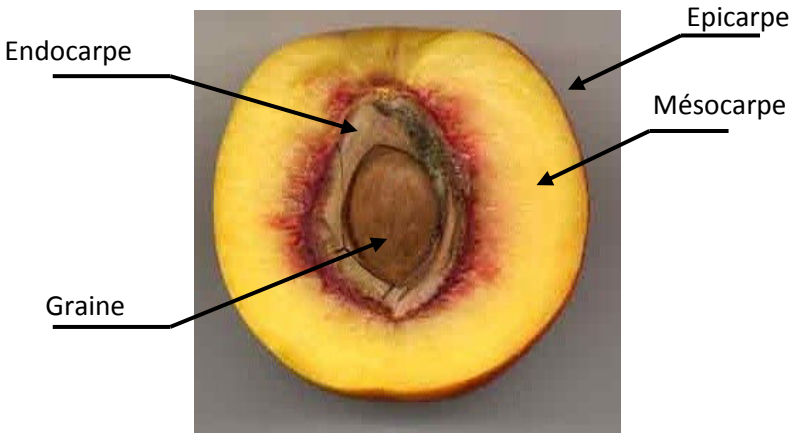



Figure I.8 : Coupe longitudinale du fruit de *Prunus persica* L.

### *I.3.4.2 Conditions climatique de culture*

Le pêcher, comme l'abricotier, appartient à la classe des arbres fruitiers climactériques. La production principale est réalisée dans les deux hémisphères, dans une latitude comprise entre 30 et 45°. C'est un arbre de climat continental qui préfère des sols de pH compris entre 6 et 7. Le pêcher s'adapte aux diverses conditions climatiques, ce qui justifie sa répartition géographique remarquable à travers le monde *(Kazan et al., 2014)*. Une humidité trop élevée ou une température trop chaude peuvent cependant affecter la production *(Badenes & Bryne, 2012)(Ghrab et al., 2014)*.

### *I.3.4.3 Classification Botanique*

Le tableau (I.6) illustre la classification botanique du *Prunus persica* L.

Tableau I.6 : Classification botanique de *Prunus persica* L.

| **Règne** | *Plantae* |
|---|---|
| **Sous-règne** | *Tracheobionta* |
| **Division** | *Magnoliophyta* |
| **Classe** | *Magnoliopsida* |
| **Sous-classe** | *Rosidae* |
| **Ordre** | *Rosales* |
| **Famille** | *Rosacée* |
| **Sous-famille** | *Amygdaloideae* |
| **Genre** | *Prunus* |

### I.3.5 Composition chimique et valeur nutritionnelle du fruit

Le *Prunus persica* L. donne un fruit qui présente une valeur nutritive importante. Outre l'eau, les constituants majoritaires sont les carbohydrates, les acides organiques, les minéraux et les fibres *(Manzoor et al., 2012)*. La pêche est riche en eau, contient entre 85,6 et 91,6 g d'eau/100 g de fruit frais, entre 0,9 et 1,2 g de protéine/100 g de fruit frais, entre 8,3 et 12,6 g de carbohydrates/100 g de fruit frais, principalement sous forme de saccharose, de glucose et de fructose *(Danish Food composition Databank, 2009)*. A maturité, le fruit présente un pH compris entre 3,5 et 3,9 avec une acidité titrable comprise entre 0,45 et 0,77 (g/100 g équivalent en acide malique) *(Montevecchiet al., 2012; Font I Forcada et al. , 2013)*. Les acides organiques majoritaires présents dans la pêche sont les acides citrique, malique, quinique et succinique dont les concentrations sont variables selon la variété de fruit.

La pêche présente des teneurs élevées en minéraux. Elle est riche en Mg, Ca, K, Fe, Zn et Cu avec une teneur élevée en K (potassium) dans la pelure et la pulpe *(Basar, 2006 ; Manzoor et al., 2012)*. La pêche contient également, des polyphénols comme la procyanidine B1, l'acide proto-catéchique, l'acide néochlorogénique, la catéchine et l'epicatéchine *(Oliveira et al., 2012)*. Le pêcher contient également des caroténoïdes, comme le β-carotène, la β-cryptoxanthine, la lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine *(Jeana Gross, 1979; Gil et al., 2002)*.

## I.4 Les caroténoïdes

### I.4.1 Généralités

Les caroténoïdes regroupent les carotènes et les xanthophylles. Plus de 700 caroténoïdes ont été isolés et identifiés jusqu'à présent dans la nature, généralement responsables des couleurs rouge, jaune, et orange des fruits, légumes et fleurs mais aussi des animaux les consommant. Ils sont biosynthétisés par les plantes supérieures, les bactéries, dont les cyanobactéries, les algues, les champignons filamenteux et les levures. Chez certains animaux qui sont incapables de les synthétiser *de novo*, la présence de caroténoïdes permet une traçabilité de ces pigments dans la chaîne alimentaire.

La majorité des caroténoïdes se trouve dans les tissus des plantes vertes photosynthétiques. Leur présence peut être un indicateur sur le stade de maturité, la pertinence, la photoprotection et la sénescence *(Crozier et al., 2006)*. Les caroténoïdes possèdent des propriétés spécifiques et remarquables *(Britton, 1995)*. Ils sont source de vitamine A. Parmi les quelques 700 caroténoïdes actuellement identifiés, environ 50 servent de précurseurs de la vitamine A, en particulier l'α-carotène, la β-cryptoxanthine et le β-carotène *(Amorim-Carilho et al., 2014)*. L'omniprésence

naturelle de ces pigments a fait des caroténoïdes les additifs alimentaires les plus utilisés en tant que colorants et/ou antioxydants.

## I.4.2 Source des caroténoïdes

### *I.4.2.1 Fruits et légumes*

Les fruits et les légumes, et leurs produits de transformation, représentent la première source de caroténoïdes, puisqu'ils sont capables de les synthétiser *de novo* *(Rodriguez et al., 2006)*. On peut les classer en :

- Fruits et végétaux jaunes/oranges riches en β- et α-carotène,
- Fruits orange riches en β-cryptoxanthine,
- Légumes verts feuillus et jaune d'œuf riches en lutéine et zéaxanthine, les tomates et leurs produits de transformation riches en lycopène *(Rao et al., 2007)*.

Dans le tableau I.7 sont répertoriées quelques sources végétales riches en caroténoïdes.

Tableau I.7 : Teneur en caroténoïdes en mg/100 g dans les fruits et légumes du régime méditerranéen d'après *(Fernandez-Garcia et al., 2012)*.

| | α-carotène | β-carotène | β-cryptoxanthine | Lutéine ou zéaxanthine | Lycopène |
|---|---|---|---|---|---|
| **Légumes vertes** | | | | | |
| **Laitue** | - | 1272 | - | 2635 | - |
| **Epinards** | - | 5597 | - | 11938 | - |
| **Choux de Bruxelles** | 6 | 450 | - | 1590 | - |
| **Légumes / Tubercules** | | | | | |
| **Haricots** | 147 | 408 | - | - | - |
| **Brocoli** | 1 | 779 | - | 2 | - |
| **Poivre** | 59 | 2379 | 2205 | - | - |
| **Citrouille** | 4795 | 6940 | - | - | - |
| **Pomme de terre** | - | 6 | - | - | - |
| **Tomates** | 112 | 393 | - | 130 | 3025 |
| **Carotte** | 4649 | 8836 | - | - | - |
| **Oignon** | 6 | - | - | - | - |
| **Fruits** | | | | | |
| **Ananas** | 30 | - | - | - | - |
| **Banane** | 5 | 21 | - | - | - |
| **Grain de raisin** | 5 | 603 | 12 | 13 | - |
| **Mangue** | 17 | 445 | 11 | - | - |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Melon** | 27 | 1595 | - | 40 | - |
| **Orange** | 16 | 51 | 122 | 187 | - |
| **Pastèque** | - | 295 | 103 | 17 | 4868 |
| **Poire** | 6 | 27 | - | - | - |
| **Céréales** | | | | | |
| **Maïs** | 33 | 30 | - | 884 | - |
| **Blé** | - | 100 | - | 35 | - |
| **Huiles végétales** | | | | | |
| **Olive** | - | 219 | 30 | 5990 | - |
| **Palmier** | 24 | 38 | - | - | - |

### *I.4.2.2 Animaux*

Les caroténoïdes peuvent être présents chez certains animaux (les oiseaux, certains poissons, les crustacés et les insectes) en raison de la consommation d'aliments riches en caroténoïdes. Les caroténoïdes chez les animaux peuvent être aussi produits par certains métabolismes de transformation (oxydation ou réduction). A partir des pigments présents dans la chaîne alimentaire, les animaux aquatiques constituent une deuxième source de caroténoïdes *(Moretti et al., 2006)* après les légumes et les fruits. L'astaxanthine est ainsi beaucoup utilisée comme agent de pigmentation dans l'élevage des saumons, des crevettes, des homards, des crabes, écrevisses, truites, ou encore de poissons rouges *(Shahidi et al., 1998)*.

La figure I.9 représente quelques caroténoïdes présents chez certains animaux.

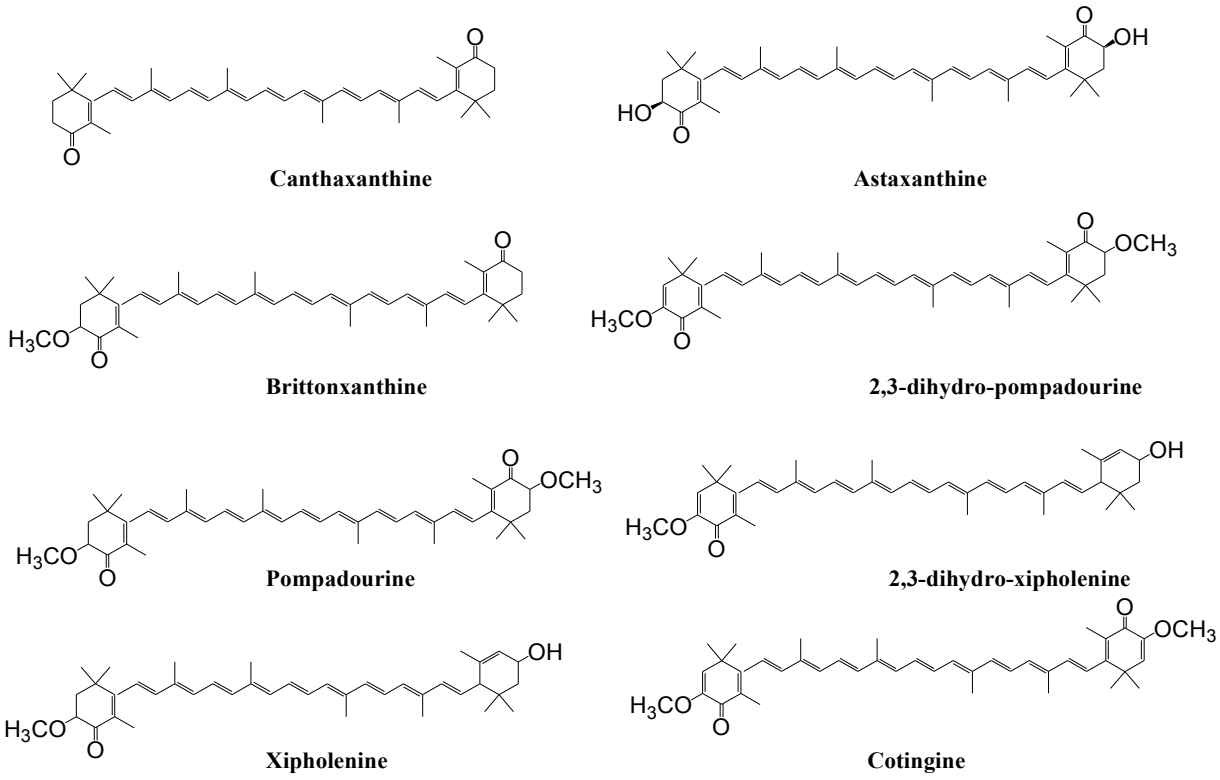



Figure I.9 : Structure de quelques caroténoïdes présents chez les animaux *(LaFontaine et al., 2013)*

### *I.4.2.3 Caroténoïdes dans les algues marines*

Les algues et les microalgues sont une troisième source importante de caroténoïdes. Les algues vertes (*chlorophyta*) sont riches en β-carotène, lutéine, violaxanthine, néoxanthine, zéaxanthine, fucoxanthine, pérédinine et dianoxanthine. Les algues rouges (*rhodophyta*) contiennent en plus de l'α-carotène et du β-carotène *(Shahidi et al., 1998)*. Actuellement, la production massive de caroténoïdes par des microalgues unicellulaires en photobioréacteurs est de plus en plus étudiée car elle permet d'obtenir des oléorésines très riches en caroténoïdes d'intérêt industriel *(Guedes et al., 2011)*. Le tableau. I.8 liste les principales algues cultivées ainsi que les caroténoïdes produits.

Tableau I.8 : Les caroténoïdes produits par les microalgues.

| Microalgue | Caroténoïdes | Références |
|---|---|---|
| *Duneliella salina* | β-carotène | *(Mendes et al., 2003), (Plaza et al., 2009)* |
| *Haematococcus pluvialis* | Astaxanthine, Canthaxanthine, lutéine | *(Plaza et al., 2009), (Nobre et al., 2006)* |
| *Chlorella vulgaris* | Astaxanthine, Canthaxanthine | *(Plaza et al., 2009), (Mendes et al., 1995)* |
| *Chlorella pyrenoidosa* | Lutéine, violaxanthine | *(Plaza et al., 2009), (Wu et al., 2007), (Cha et al., 2008)* |

La Figure I.10 présente la structure de quelques caroténoïdes spécifiques ou fortement présents dans les algues.

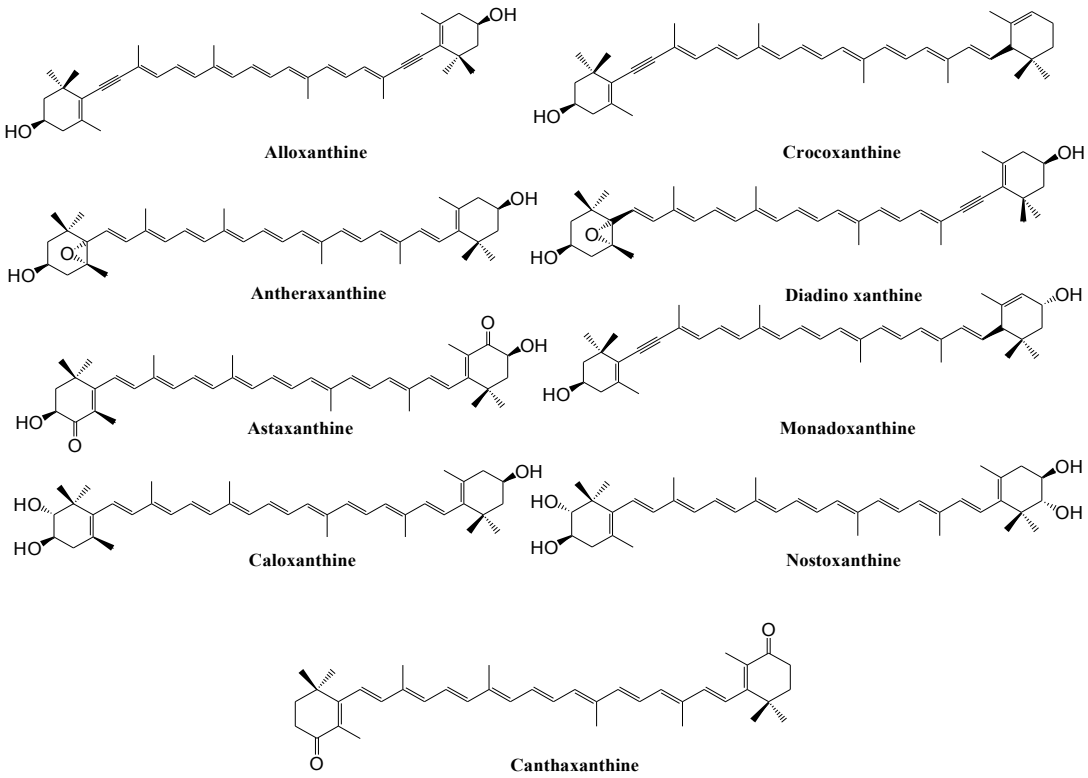



Figure I.10 : Structure des caroténoïdes présents dans les algues d'après *(Takaichi, 2011)*.

### I.4.3 Classification des caroténoïdes

On peut répertorier les caroténoïdes selon deux grandes classes : **(1)** les carotènes ou les caroténoïdes hydrocarbonés composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène (α-

carotène, β-carotène, phytoène, lycopène, etc.),**(2)** : les xanthophylles ou les caroténoïdes oxygénés, qui contiennent en plus de la chaîne carbonée des fonctions époxy, carbonyle, hydroxyle, méthoxy ou acide carboxylique (violaxanthine, canthaxanthine, zéaxanthine, spirilloxanthine, torularhodine) *(Rivera & Canela-Garayoa 2012)*. On peut classer les carotènes en deux sous-classes : les carotènes acycliques et les carotènes cycliques. Les xanthophylles peuvent être classées en caroténols et époxy caroténoïdes. La figure I.11 représente la structure de quelques xanthophylles et carotènes bien distincts en terme de groupements fonctionnels.

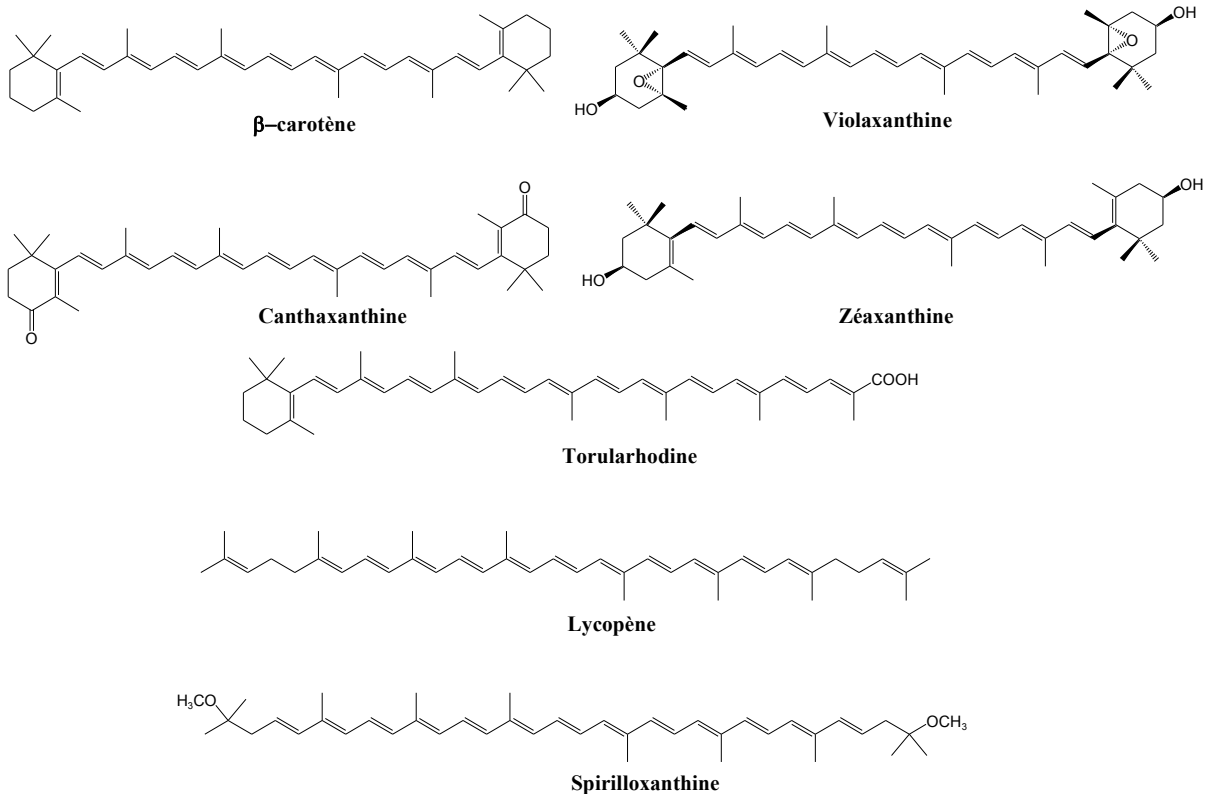



Figure I.11 : Structure de quelques xanthophylles et carotènes d'après *(Rivera & Canela-Garayoa, 2012)*.

### I.4.4 Structure chimique

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des tetraterpénoïdes. L'unité de base de la structure de ces pigments est l'isoprène, constitué de 8 unités isopréniques **($C_5$)** liées tête-à-queue. Au centre, les unités isopréniques sont liées queue-à-queue de façon renversée, ce qui donne à certains caroténoïdes une symétrie moléculaire. Généralement, les caroténoïdes sont des **$C_{40}$** tetraterpénoides mais il existe aussi des structures en **$C_{30}$** ou **$C_{50}$**.

La structure chimique des molécules présente un système conjugué de doubles liaisons (chaîne polyène) alternées avec des liaisons simples, formant la partie centrale de la molécule qui constitue

le chromophore responsable de l'absorption de la lumière. Les électrons π de ce système conjugué sont délocalisés tout le long de la chaîne polyène, ce qui confère aux caroténoïdes leur couleur et leur réactivité chimique *(Britton, 1995)*.

La modification du squelette basique $C_{40}$ des caroténoïdes donne différentes structures, par hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation et introduction de fonctions oxygénées (Figure. I.12).

La classification des quelques 700 caroténoïdes isolés et identifiés se fait suivant leurs structures chimiques : tout d'abord le nombre d'atomes de carbone qui constitue le squelette de base, variant de 30 à 50, ensuite la structure linéaire ou cyclique, enfin la présence des groupes fonctionnels insérés généralement sur les extrémités de la chaîne carbonée. Suivant le nombre de doubles liaisons, différentes configurations (*cis*/*trans*) (E/Z) sont possibles pour un caroténoïde, mais la forme all-*trans* est largement prédominante dans la nature *(Stahl & Sies, 2003)*.

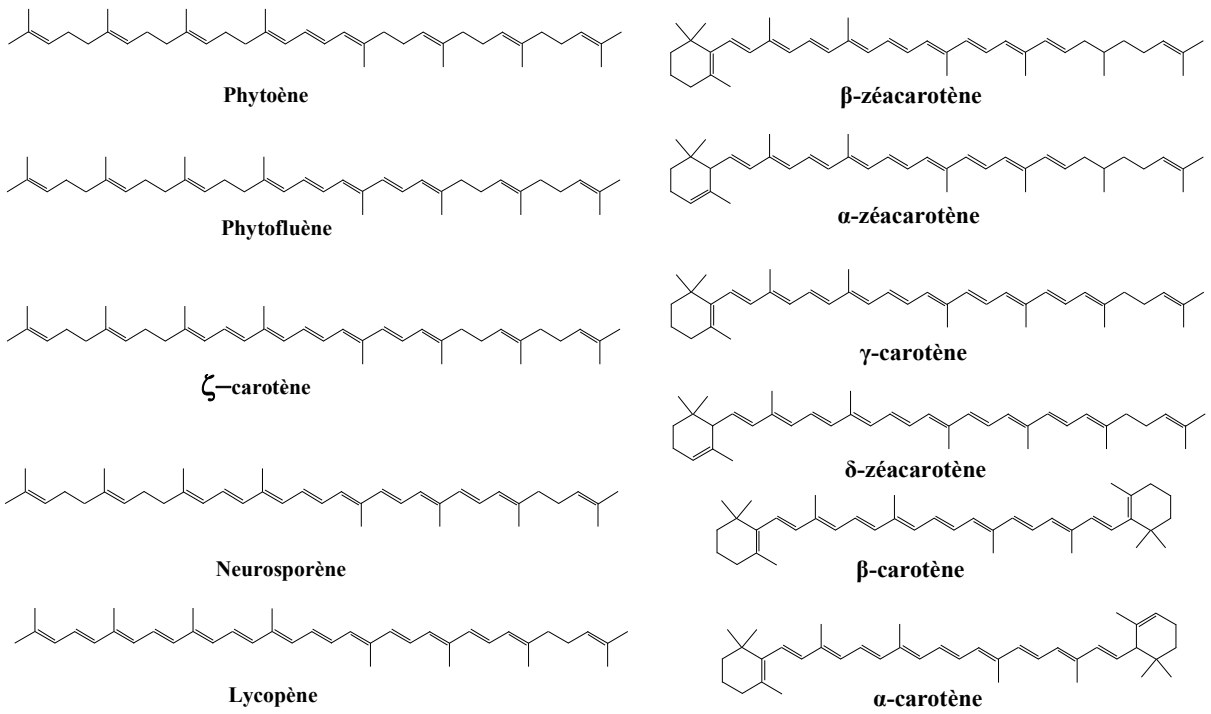



Figure I.12 : Structure de quelques caroténoïdes cycliques et acycliques d'après *(Rodriguez- Amaya, 2001)*.

## I.4.5 Propriétés physico-chimiques des caroténoïdes

### *I.4.5.1 Solubilité des caroténoïdes*

Les caroténoïdes sont des molécules extrêmement hydrophobes qui présentent donc une faible solubilité dans l'eau. La polarité des caroténoïdes varie d'un pigment à l'autre, suivant le groupe

fonctionnel lié aux extrémités de la chaîne polyène. Ceci influence leur interaction avec les membranes biologiques et diverses molécules *(Jomova & Valko, 2013)*. Ils peuvent s'associer à des protéines *(Britton, 1995)*. Ils sont solubles dans les solvants organiques tel que l'acétone, l'éthanol, l'éther diéthylique, le chloroforme, et l'acétate d'éthyle. Les carotènes, qui sont de façon générale apolaires, sont solubles dans l'hexane, le toluène et l'éther de pétrole. En revanche, les xanthophylles telles que la lutéine ou la zéaxanthine sont des molécules très polaires, solubles dans le méthanol et l'éthanol *(Rodriguez- Amaya, 2001)*. La solubilité des caroténoïdes est influencée par l'interaction avec d'autres molécules environnantes, comme les lipides et les protéines. *In vivo,* les caroténoïdes sont localisés dans les membranes, leur interaction avec les protéines modifie leur polarité, facilitant ainsi leur transport en milieu aqueux *(Britton, 1995)*.

### *I.4.5.2 Absorption de la lumière UV-visible*

Le système conjugué de doubles liaisons des caroténoïdes constitue le chromophore qui absorbe la lumière UV-visible généralement entre 400 et 600 nm. La majorité des caroténoïdes ont un spectre d'absorption avec 3 maxima, en relation avec leur structure chimique. Le nombre élevé de doubles liaisons conjuguées explique l'absorption dans le vert *(Meléndez-Martinez et al., 2007)*. Ainsi, le lycopène, caroténoïde acyclique de couleur rouge avec 11 doubles liaisons conjuguées, présente des bandes d'absorption maximales à 444, 470 et 502 nm dans l'éther de pétrole. Le ζ-carotène, de couleur jaune pâle également acyclique et possédant 7 doubles liaisons conjuguées absorbe dans l'éther de pétrole, à des longueurs d'onde maximales de 378, 400 et 425 nm. Les phytoène et phytofluène ont respectivement 3 et 5 doubles liaisons et sont incolores. Ils absorbent en dessous de 400 nm. La cyclisation influence également la forme du spectre UV visible des caroténoïdes : le β-carotène étant bi-cyclique avec 11 doubles liaisons conjuguées, il présente un effet hypsochrome par rapport au lycopène, dû à la cyclisation *(Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004)*.

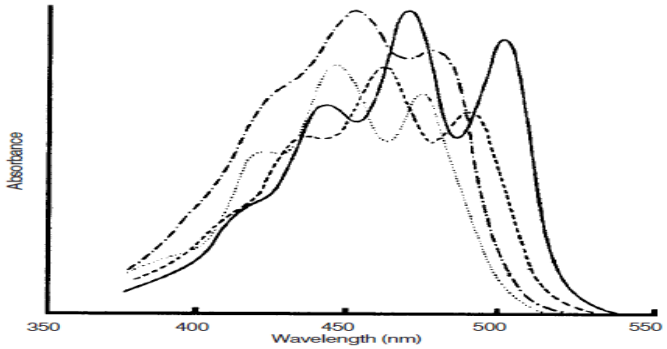



Figure I.13 : Spectre d'absorption UV visible du lycopène (—), du γ-carotène (---), du β-carotène (-.-.), et de l'α-carotène (.....) dans l'éther de pétrole, d'après *(Rodriguez- Amaya, 2001)*.

L'absorption de l'énergie lumineuse par une molécule organique produit un état excité de haute énergie. Dans le cas des caroténoïdes, la transition pertinente est de type $\pi-\pi^*$ au cours de laquelle un électron $\pi$ de la liaison liante du système de la double liaison conjuguée passe à l'orbitale non liante $\pi^*$. Les électrons $\pi$ sont hautement délocalisés et l'état excité présente une énergie faible, ce qui correspond à l'émission dans la région du visible pour des longueurs d'onde comprises entre 400 et 500 nm. La caractéristique de la forte absorption de la lumière dans la région du visible est attribuée à une forte transition permise de l'état initial $S_0$ à l'état excité secondaire singulet $S_2$. La formation directe de l'état triplet $T_1$ des caroténoïdes à partir des états excités $S_2$ ou $S_1$ *via* le croisement intersystéme (CIS) n'est pas favorable *(Britton 1995)*(Figure I.14).

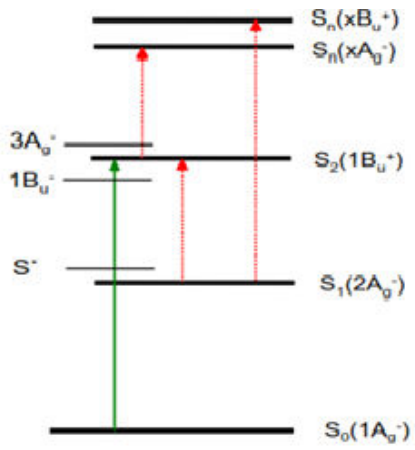



Figure I.14 : Niveaux d'énergie d'un caroténoïde et transitions après excitation *(Jomova & Valko, 2013).*

### *I.4.5.3 Stabilité et réactivité des caroténoïdes*

Les caroténoïdes sont une famille de molécules thermolabiles, sensibles à la température et à l'oxygène. Leurs structures chimiques insaturées les rendent peu stables et très réactives. *(Lemmens et al., 2013)* ont par exemple étudié de manière approfondie les cinétiques d'isomérisation du all-*trans*-β-carotène en formes *cis*-isomère dans de la purée de mangue soumise à des traitements combinés haute pression-température. *(Knockaert et al., 2012)* ont aussi étudié la dégradation et l'isomérisation de β-carotène de carotte durant des traitements thermiques en présence de matière grasse (huile). *(Colle et al., 2013)* ont mené la même étude avec le lycopène. La chaîne polyène des caroténoïdes est sujette à l'isomérisation des *trans*-caroténoïdes en *cis*-caroténoïdes. Leur oxydation, la température, l'exposition à la lumière, la présence d'acides et l'adsorption sur des surfaces actives facilitent l'isomérisation. La dégradation oxydative représente la cause principale de dégradation des caroténoïdes, liée à la présence d'oxygène, d'enzymes, de métaux, et la co-oxydation en présence

des hydro-péroxydes lipidiques *(Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004)*. Les processus de dégradation des caroténoïdes sont résumés dans la figure I.15.

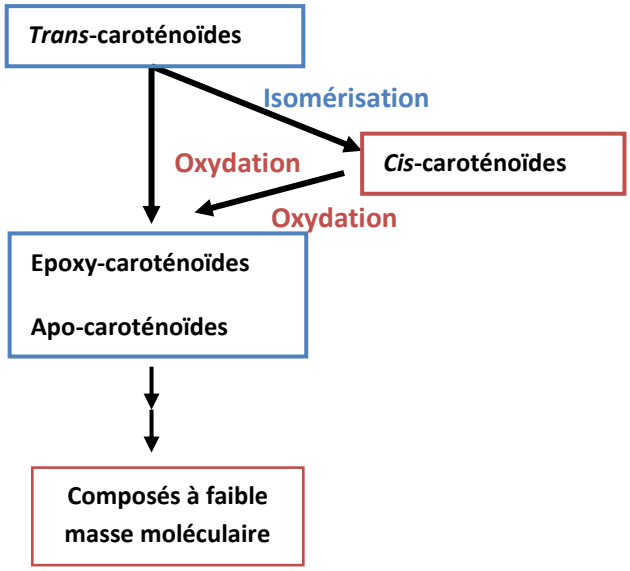



Figure I.15 : Processus de dégradation des caroténoïdes *(Rodriguez- Amaya,2001)*

D'une façon générale, le système conjugué des caroténoïdes, riche en électrons, est très réactif vis-à-vis des agents électrophiles, ce qui favorise l'oxydation. Même les caroténoïdes à l'état pur cristallin sont susceptibles de s'oxyder en présence d'oxygène. *In vivo,* les caroténoïdes sont souvent stabilisés par les protéines ou les lipides, mais ceci ne les empêche pas d'être oxydés en présence de radicaux libres ou d'agents oxydants *(Britton, 1995)*. Ils peuvent aussi être dégradés par les lipoxygénases *(Britton et al., 1996)*.

*(Lin & Chen, 2005)* ont montré que dans le jus de tomate, la dégradation et l'isomérisation des all-*trans* lutéine, β-carotène et lycopène, augmente lors du stockage à la lumière, et lorsque la température augmente. Le traitement thermique des matrices provoque la dégradation partielle des caroténoïdes par isomérisation de la forme *trans* vers la forme *cis.* Ceci est dû à la rupture des complexes caroténoïdes-protéines *(D'Evoli et al., 2013)*. La lyophilisation des caroténoïdes favorise également leur dégradation du fait de la diminution de porosité et l'augmentation de la surface de contact avec l'air.

### I.4.6 Biosynthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont biosynthétisés par les plantes supérieures, les algues, les champignons et les bactéries. Leur biosynthèse dérive de la biosynthèse générale des isoprénoïdes. Quelles que soient la matrice, les premières étapes de biosynthèse sont communes. Les caroténoïdes sont biosynthétisés au niveau des plastides **(IPP)** et synthétisés à travers la voie du plastide spécifique **DOXP** (1-déoxylulose 5-phosphate) *(Eldahshan & Singab, 2013)*. Il y a deux voies de biosynthèse

indépendantes de l'IPP, la voie classique de l'acide mévalonique **(MVA)** et la voie non-mévalonique **(DOXP)**. Dans la suite, nous allons expliquer uniquement la voie **(MVA)**(Figure I.16).

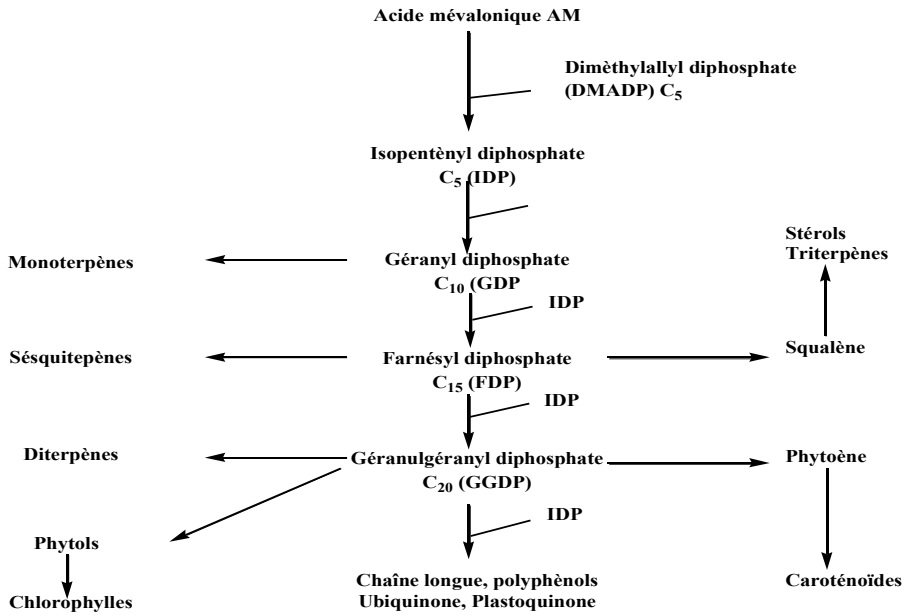



Figure I.16 : Voie de synthèse de l'acide mévalonique.

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes, ils sont biosynthétisés à partir de l'acétyle coenzyme-A *via* l'acide mévalonique, les principaux stades de biosynthèse sont résumés dans la figure I.17.

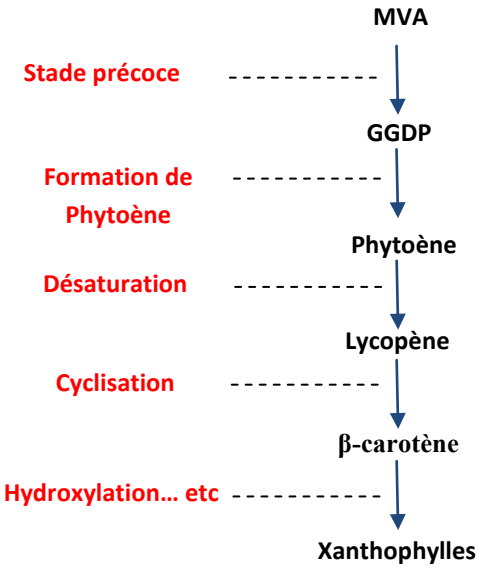
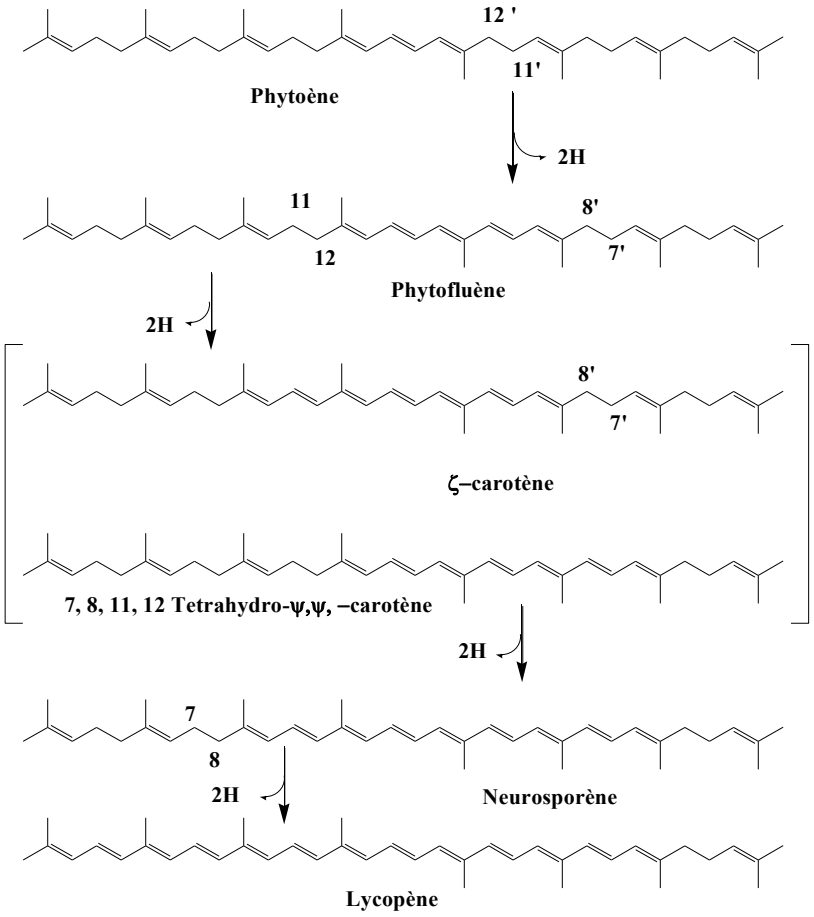



Figure I.17 : Différents stades de biosynthèse des caroténoïdes.

### *I.4.6.1 Synthèse du phytoène et lycopène*

La première étape est la formation de $C_{40}$ tétraterpénoïde phytoène, à partir de deux molécules de géranyl-géranyl diphosphate $C_{20}$ **(GGDP)**, *via* le préphytoène diphosphate **(PPDP)** ou la phytoène synthase *(Eldahshan & Singab, 2013; Britton et al., 1996)*. Dans les plantes, le phytoène formé se trouve sous forme d'isomère 15 *cis*, mais également d'isomère 15 *trans* chez certaines bactéries. Ensuite, le phytoène avec ses 9 doubles liaisons subit une série de réactions de désaturation, chacune générant une double liaison. Les formes intermédiaires sont le phytofluène, le ζ-carotène, le neurosporène *(Britton et al., 1996)*. Quatre réactions de désaturation ont lieu lors de cette étape catalysée par l'enzyme **(PDS) phytoène** désaturase et la **ζ-carotène** désaturase, menant à la formation du lycopène de couleur rose à partir du phytoène incolore *(Eldahshan & Singab, 2013)*. La première désaturase (**PDS**) catalyse la biosynthèse de 9, 15, 9'-tri-*cis*- **ζ-carotène,** substrat de la 15-*cis*-ζ-carotène isomérase **(Z-ISO)** pour produire le 9, 9'-di-*cis*- ζ-carotène, après l'isomérisation du 15-*cis*-ζ-carotène, la deuxième ζ-carotène désaturase **(ZDS)** mène à la formation de 7, 9, 9'-*cis*-neurosporène et le 7', 9'-*cis*-lycopène. Enfin, la carotène isomérase (CRISTO) catalyse l'isomérisation de ces composés en all-*trans* lycopène *(Stange & Flores, 2012)*(Figure I.18).




FigureI.18 : Schéma de synthèse du phytoène et du lycopène.

### I.4.6.2 Cyclisation du lycopène

Comme tous les caroténoïdes ne sont pas cycliques, deux produits peuvent se former suivant la position de la double liaison du cyclohexane. Le lycopène peut subir une cyclisation à une ou deux extrémités de sa structure donnant le γ-carotène monocyclique, le δ-carotène monocyclique et le β-carotène di-cyclique. Le neurosporène peut subir une même cyclisation donnant le β- et l'α-zéacarotène. Cette cyclisation se déroule suivant le mécanisme décrit dans la figure I.19, dans lequel une perte de $H^+$ à partir du $C_6$, $C_{18}$ ou $C_4$ favorise la formation du β-, γ- ou ε cycle respectivement *(Britton et al., 1996)*. Ces transformations en différentes molécules bicycliques se font par l'intermédiaire de la lycopène cyclase, de la lycopène-β-cyclase **(LCYB)** qui convertit le lycopène en γ-carotène contenant un cycle β. Ce γ-carotène est, ensuite, converti, par la même enzyme, en β-carotène *(Eldahshan & Singab, 2013)*. La production du α-carotène se fait par une cyclisation du lycopène par la lycopène-ε-cyclase **(LCYE)** et **(LCYB)** *(Stange & Flores 2012)*.

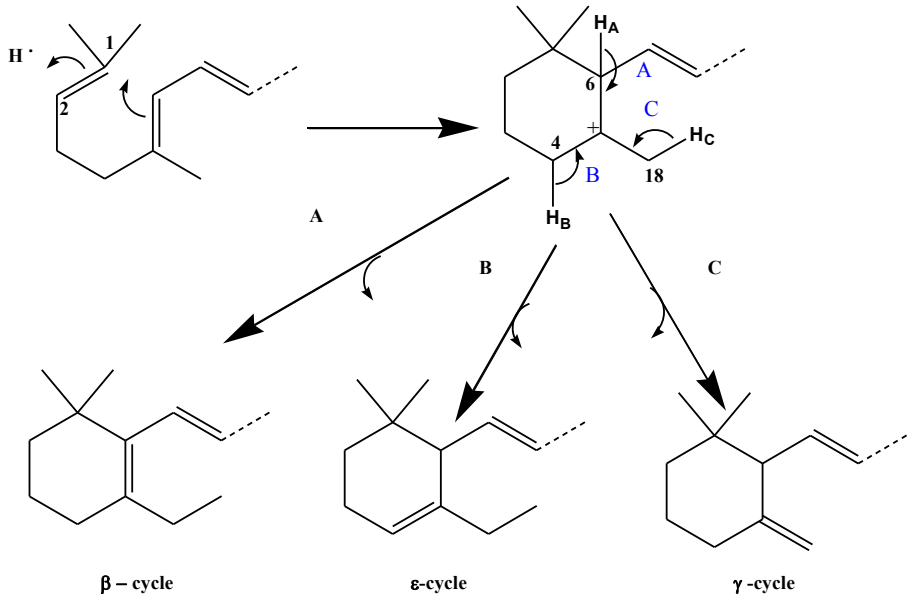



Figure I.19 : Différentes cyclisations du lycopène *(Britton et al., 1996).*

### I.4.6.3 Formation des xanthophylles

La formation des xanthophylles représente la dernière étape de la biosynthèse des caroténoïdes. Dans certains cas, la caroténogenèse s'arrête avec la formation des carotènes. Dans d'autres cas, les carotènes synthétisés à partir du all-*trans*-lycopène subissent une oxygénation aboutissant à la formation de xanthophylles linéaires ou cycliques. L'oxygénation est la dernière étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Au cours de cette étape, la zéaxanthine et la 3-hydroxy-xanthophylle

lutéine sont formées par une hydroxylation stéréospécifique du α- et β-carotène par un mélange d'enzymes oxydases (Figure I.20)*(Britton et al., 1996)*.

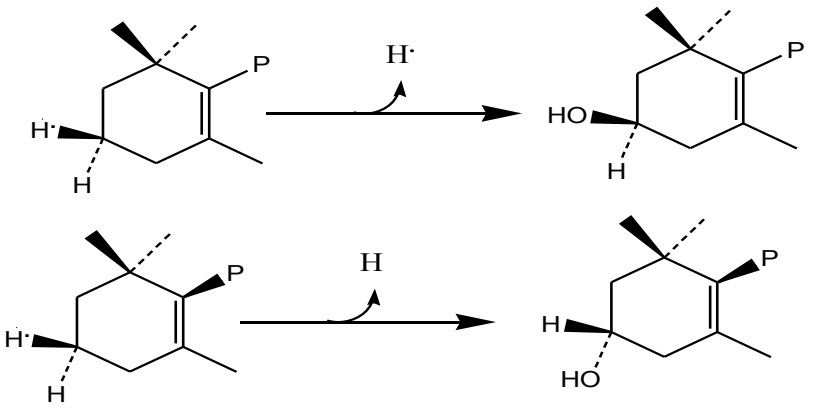



Figure I.20 : Hydroxylation stéréospécifique du β-carotène et formation de la lutéine.

L'oxygène introduit par l'intermédiaire de ces réactions peut être sous forme de groupement hydroxyle, méthoxy ou carbonyle et dans certains cas sous forme époxyde. La conversion du β-carotène en xanthophylle est assurée par une série de réactions dépendantes catalysées par l'hydroxylase ferrédoxine. Le β-carotène est hydroxylé par l'enzyme β-carotène hydroxylase pour donner la zéaxanthine tandis que l'hydroxylation de l'α-carotène par l'enzyme ε-carotène hydroxylase conduit à la lutéine *(Stange & Flores, 2012)*.

Dans les plantes supérieures, les groupes hydroxyles sont introduits sur le β-carotène pour donner de la zéaxanthine *via* la β-carotène hydroxylase, les groupes époxy sont introduits sur la zéaxanthine par la zéaxanthine époxidase pour donner la violaxanthine *via* l'anteraxanthine. Exposée à la lumière, la violaxanthine se transforme en zéaxanthine *via* la violaxanthine de-époxidase (**Vde**) *(Takaichi, 2011)*.

### I.4.7 Extraction des caroténoïdes à partir des matrices végétales

L'extraction est une étape cruciale. La grande diversité des composés (polyphénols, caroténoïdes, anthocyanes,…) ainsi que la grande variabilité des matrices (légumes, fruits, champignons, algues …) contenant ces principes bioactifs fait de l'extraction une étape clé qui doit être sensible, peu coûteuse et reste différente d'une molécule à une autre. Malgré les progrès en chimie analytique, la préparation de l'extrait avant l'analyse finale demeure très complexe *(Giergielewicz-Mozajska et al., 2001)*.

Il existe diverses techniques d'extraction, classiques ou conventionnelles, qui ont été utilisées pour l'extraction des caroténoïdes à partir de matrices naturelles : l'extraction par Soxhlet, l'extraction liquide-liquide, l'extraction solide-liquide. Ces techniques présentent une reproductibilité limitée, une faible sélectivité, des rendements d'extraction faibles, des temps de manipulation élevés pouvant engendrer l'altération du produit *(Herrero et al., 2013)*.

Ces verrous peuvent être levés grâce à l'utilisation des nouvelles techniques d'extraction plus rapides, automatisées, sélectives en terme d'extraction *(Herrero et al, 2013)*. Une voie prometteuse est l'extraction en milieu $CO_2$ supercritique.

La majorité des techniques d'extraction fait appel à la diffusion du composé désiré à partir de la matrice par perturbation des tissus suivie par une élimination des composés indésirables (purification) *via* une extraction liquide-liquide ou solide-liquide *(Ishida et al., 2012)*. La nature du composé à extraire ainsi que la nature de la matière végétale (fleur, feuille, fruit) sont d'une grande importance en vue d'une extraction efficace. La polarité des solutés affecte leur solubilité dans le solvant d'extraction et donc l'extraction elle-même *(Tsao & Deng, 2004)*.

### *I.4.7.1 Extraction conventionnelle des caroténoïdes à partir de matrices végétales*

L'extraction est, par définition, une méthode ou procédé utilisé dans le but de l'obtention de composés à partir d'un mélange de solide ou d'une solution (liquide). Ce procédé d'extraction consiste à épuiser la matrice végétale en molécules extractibles par un solvant qui va être ensuite éliminé par évaporation. L'extraction par solvants organiques est la technique d'extraction la plus utilisée. Elle consiste en une série d'opérations dont le but est de séparer un ou plusieurs composés ciblés, à partir d'une matrice solide ou liquide. Cette technique est basée sur le principe de la diffusion du solvant à travers la matrice et la solubilisation du composé ciblé *(Strati & Oreopoulou, 2014)*. Un modèle proposé par Pawlizym en 2003, qui décrit le processus d'extraction d'un échantillon hétérogène, postule que la partie poreuse d'un échantillon est entourée par une couche organique. L'extraction du composé à partir de l'échantillon est réalisée selon les étapes *(Mustafa & Turner, 2011)* décrites ci-dessous :

- Le composé est désorbé de son site au niveau de la matrice,
- Il diffuse ensuite à travers la matrice pour atteindre l'interface matrice-fluide au niveau des pores de la matrice solide,
- La troisième étape est la diffusion du composé dans le solvant d'extraction à travers les pores,
- Enfin, le composé ciblé atteint la phase d'extraction par convection.

La localisation du composé au niveau de la matrice représente un facteur critique dans l'extraction par solvant : cinq situations ont été identifiées/postulées (Figure I.21) **(1)** : le composé est adsorbé sur la surface d'analyse, **(2)** : il est dissous dans les pores, **(3)** : il est dissous/adsorbé dans les micro/nanopores de la matrice, **(4)** : il est chimiquement lié à la matrice, **(5)** : il est dissous dans la solution. Dans le cas des matrices végétales, l'étape limitante est celle de la solubilisation ou de la diffusion *(Mustafa & Turner, 2011)*.

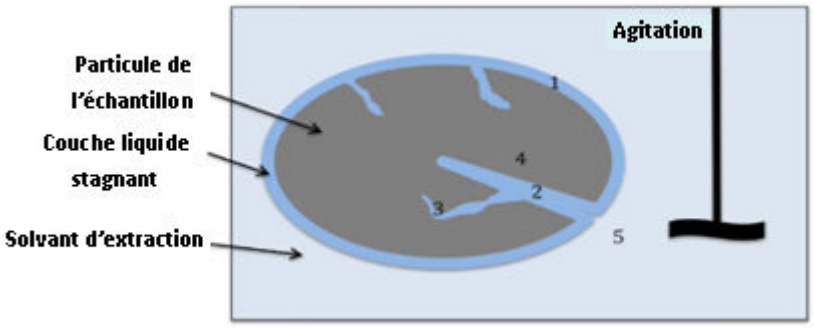



Figure I.21 : Différentes localisations du composé à extraire au niveau de la matrice végétale, *(Mustafa & Turner, 2011)*.

Pour les caroténoïdes,un solvant organique est utilisé pour permettre une extraction en une seule étape «*One-step* » (*Amorim-Carrilho et al., 2014)*. Une bonne extraction par solvant doit libérer tous les caroténoïdes, en solution, à partir de la matrice végétale, sans les abimer. Les solvants choisis pour l'extraction doivent avoir un point d'ébullition faible afin de minimiser la température d'extraction et être adaptés à la polarité des caroténoïdes *(Machmudah & Goto, 2013; Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004)*. Différents solvants organiques ont été utilisés pour l'extraction des caroténoïdes, mais la sélection du solvant approprié reste difficile. La différence de polarité entre les caroténoïdes (xanthophylles, carotènes, caroténoïde-esters) et la structure de la matrice joue un rôle clé dans le choix du solvant *(Amorim-Carrilho et al., 2014)*. Dans le cas où les caroténoïdes sont apolaires (carotènes) ou estérifiés, l'hexane est le meilleur solvant d'extraction. Dans le cas des caroténoïdes polaires, l'éthanol est un bon choix et présente l'avantage d'être « *food compatible* » *(Machmudah & Goto, 2013)*.

#### *I.4.7.1.1 Extraction par Soxhlet*

##### *Principe*

L'extraction par Soxhlet (méthode développée par l'Allemand Franz von Soxhlet à la fin du 19 ème siècle) se fait avec des solvants organiques à pression atmosphérique, pour une dissolution sélective

des composés ciblés contenus dans la matrice solide *(Cardenas-Toro et al., 2015)*. Cette technique surpasse d'autres techniques d'extraction conventionnelles, du fait de la continuité du contact entre le solvant pur et la matrice solide, d'une part, et l'absence de l'étape de filtration après l'extraction, d'autre part. Cependant, le temps d'extraction est long (plusieurs heures) et le risque d'une décomposition thermique est possible (Figure I. 22).

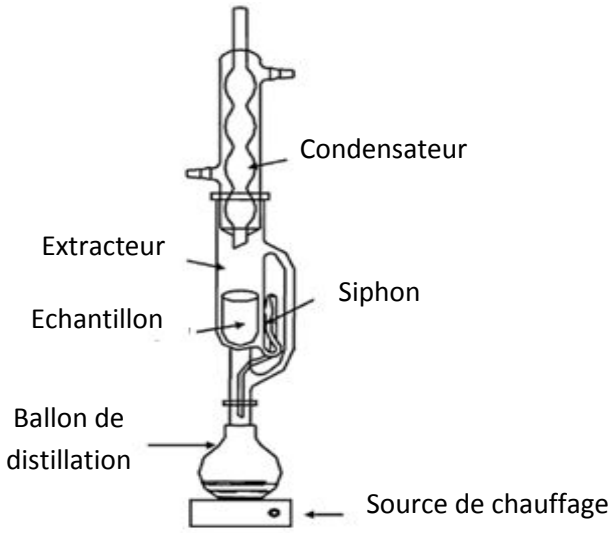



Figure I.22 : Montage d'extraction Soxhlet.

Concrètement, l'extraction par Soxhlet est une extraction par solvant organique d'une espèce contenue dans une poudre solide ou un amas de morceaux de matrice grossiers placés dans une cartouche en papier (filtre épais). Le solvant placé dans un ballon est chauffé jusqu'à ébullition et sa vapeur passe au travers de l'échantillon dans l'extracteur, puis le condenseur où il est condensé et retombe dans l'extracteur contenant la cartouche avec l'échantillon. L'échantillon placé dans le filtre au sein de l'extracteur va progressivement être recouvert par le solvant d'extraction condensé. Quand le solvant atteint le niveau maximal de remplissage au niveau de la cartouche, il se déverse par un siphon vers le ballon de distillation avec les composés ciblés issus de la macération de l'échantillon dans le solvant. Ces différentes étapes (ébullition-condensation-macération-vidange par effet siphon) se répètent de manière cyclique tant que l'ébullition du solvant dans le ballon est maintenue *(Luque de Castro & Priego-Capote, 2010)*.

*(Cardenas-Toro et al., 2015)* ont extrait des caroténoïdes (α- et β-carotènes) à partir des fibres de palmier, en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Dans une autre étude sur la teneur en caroténoïdes des crevettes roses (*P. brasiliensis et P. paulensis*), *(Mezzomo et al., 2011)* ont extrait l'astaxanthine, la β-cryptoxanthine, l'α-carotène, le *trans*-β-carotène et le *cis*-β-carotène en utilisant l'extraction par Soxhlet, avec divers solvants d'extraction, comme le n-hexane, l'éthanol, l'acétone, l'isopropanol, et un mélange (isopropanol/hexane) (50/50) (v /v).

#### *I.4.7.1.2 Extraction par agitation/homogénéisation*

L'extraction par agitation est une méthode d'extraction beaucoup utilisée dans l'industrie. L'agitation utilise le couplage entre un agitateur et le réceptacle contenant la matrice brute, tandis que l'homogénéisation repose sur le principe de la macération où le mélange du solvant et de la matrice brute ne subit aucune agitation *(Prado et al., 2014)*.

Ce type d'extraction est généralement appliqué à des matrices broyées. Cette méthode repose sur un mélange mécanique du solvant d'extraction avec la matrice végétale, suivie d'un temps de repos qui peut aller de quelques minutes à plusieurs heures, suivie d'une filtration. Une étape d'évaporation sous agitation suit l'étape d'extraction, afin d'éliminer le solvant *(Strati & Oreopoulou, 2014)*. L'extraction des caroténoïdes par agitation est utilisée en particulier pour l'extraction des caroténoïdes à partir des pelures de tomate lyophilisées en utilisant l'éthanol et l'acétate d'éthyle *(Strati & Oreopoulou, 2011)* ou sur les déchets de tomate (pelures et pépins), en utilisant des mélanges hexane/éthanol, (1/1) hexane/acétone (1/1) et hexane/éthyle acétate (1/1).

#### *I.4.7.1.3 Autres extractions conventionnelles*

Outre l'extraction liquide/liquide et solide/liquide utilisant les solvants organiques à pression atmosphérique pour l'extraction des caroténoïdes, il existe d'autres techniques telles que (i) l'extraction assistée par micro-ondes (EMA) *(Zhao et al., 2009)(Hiranvarachat & Devahastin, 2014)(Hiranvarachat et al., 2013)*, (ii) l'extraction assistée par ultrasons (EUA) *(Li et al., 2013)(Mezzomo et al., 2011)(Macias-Sanchez et al., 2009)*. Cette dernière technique se base sur l'utilisation de fréquences élevées, souvent plus que 16 kHz et une quantité de solvant limitée, dans le but de réaliser une extraction effective en augmentant le transfert de matière et facilitant la solubilisation du composé à extraire dans le solvant, ceci par le biais de la perturbation de la matrice *(Herrero et al., 2013)*.

### *I.4.7.2 Extraction par solvants organiques accélérée par la pression (ASE ou PLE)*

L'extraction par solvant accélérée par la pression aussi nommé ASE ou PLE, est une technique d'extraction qui utilise les solvants organiques à température et pression élevées, ce qui maintient le solvant d'extraction à son état liquide durant l'extraction *(Herrero et al., 2013)*. Cette technique a été décrite pour la première fois en 1996 par *(Richter et al., 1996)*. On peut considérer la PLE comme une nouvelle modalité d'extraction par Soxhlet mais en opérant à des pressions et températures élevées *(Mendiola et al., 2007)*. Cette combinaison engendre une extraction rapide, et demande des petits volumes de solvant. L'augmentation de la température d'extraction favorise la solubilisation du

composé ciblé *(Mustafa & Turner, 2011)*. D'autre part, la viscosité et la tension de surface du solvant diminuent, ce qui facilite la diffusion du solvant au niveau des surfaces de la matrice d'extraction.

#### *I.4.7.2.1 Principe et instrumentation*

L'extraction par ASE commence par l'ajout de la matrice à extraire dans une cellule avec le solvant d'extraction qui va être chauffé par l'intermédiaire d'un four à la température désirée, en pressurisant la cellule afin de maintenir le solvant à l'état liquide *(Turner, 2006)*. Pendant un temps t, la pression est maintenue à l'intérieur du système par une vanne de pressurisation. Après l'extraction, l'extrait est collecté dans des tubes placés à la fin du système d'extraction (Figure I.23).

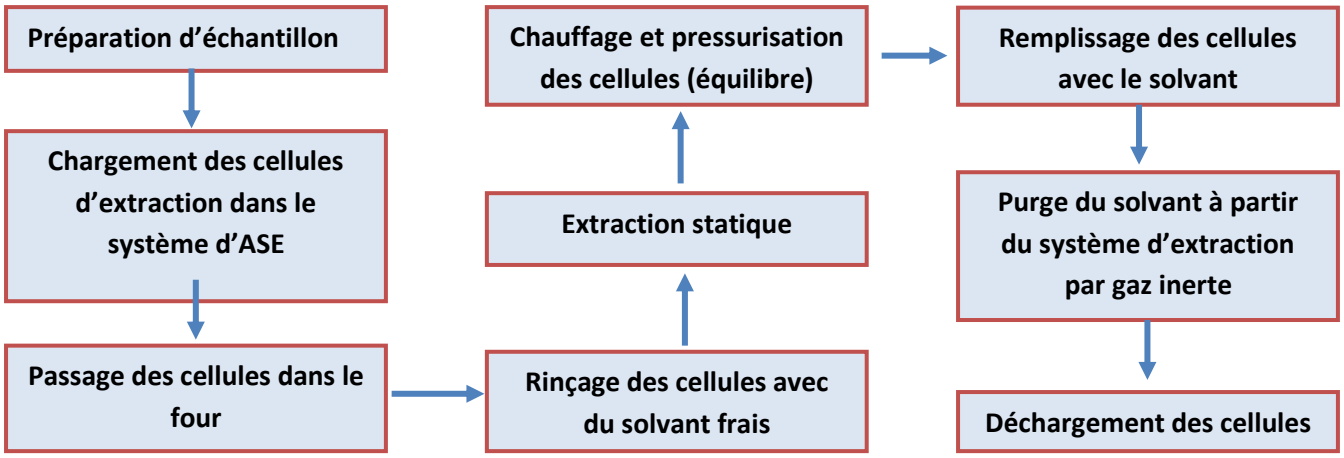



Figure I.23 : Les différents étapes d'extraction par solvant accélérée *(Giergielewicz-Mozajska et al., 2001)*.

L'extraction ASE peut être réalisée en deux modes, le mode statique ou le mode dynamique. En mode statique, le procédé d'extraction se compose de un ou plusieurs cycles avec un changement partiel de solvant entre chaque cycle. En mode dynamique, le débit du solvant est maintenu constant durant tout le temps d'extraction ce qui permet un contact long entre la matrice et le solvant *(Mustafa & Turner, 2011)*.

#### *I.4.7.2.2 Paramètres influençant l'extraction accélérée par solvant organique*

Différents paramètres interviennent dans l'extraction par solvants organiques accélérée par la pression. Les plus importants sont la nature du solvant d'extraction, la température, la pression, le temps d'extraction statique et le nombre de cycles. La présence d'eau dans la matrice végétale est aussi importante *(Mustafa & Turner, 2011)*. La température est un facteur critique dans l'extraction,

qui affecte la sélectivité de l'extraction ASE. L'utilisation de températures élevées favorise la rupture des interactions entre la matrice est la molécule à extraire, ces interactions peuvent être de type Van der Waals, liaison hydrogène ou attraction inter-dipôles *(Giergielewicz-Mozajska et al., 2001)*.

L'utilisation d'une énergie thermique permet d'atteindre plus facilement les énergies d'activation nécessaire au processus de désorption, ce qui augmente la solubilisation du composé à extraire et la vitesse de transfert de matière. La température diminue la viscosité et la tension de surface du solvant d'extraction ce qui facilite son contact avec la matrice *(Mendiola et al., 2007)*. L'effet de la pression durant l'extraction dépend de la température : à une température élevée, la pression maintient l'état liquide du solvant d'extraction. Quand la température dépasse le point d'ébullition, ceci favorise une meilleure pénétration du solvant à travers les pores de la matrice pour extraire les molécules ciblées et augmente le transfert de masse des molécules de la matrice vers le solvant *(Mustafa & Turner, 2011)*. L'effet de la pression reste négligeable sur le rendement d'extraction *(Herrero et al., 2013)* et en général une pression proche de 100 bars environ est utilisée. Dans certains cas, l'utilisation d'un mélange binaire de solvants améliore l'efficacité de l'extraction. Par exemple, dans un mélange binaire, un premier solvant peut solubiliser le composé à extraire tandis que le deuxième solvant favorise la désorption *(Mustafa & Turner, 2011)*. L'ASE est une technique au cours de laquelle une large gamme de solvants peut être utilisée, même ceux qui ne sont pas efficaces en extraction conventionnelle à pression atmosphérique, car l'ajustement des paramètres température et pression au cours de l'extraction augmente le pouvoir solubilisant du solvant d'extraction *(Giergielewicz-Mozajska et al., 2001)*.

Le facteur temps d'extraction et nombre de cycles influencent l'extraction, puisque dans certains cas l'extraction reste inachevée à cause du volume limité de solvant d'extraction utilisé. En augmentant le nombre de cycles d'extraction, on peut obtenir une extraction complète *(Mustafa & Turner, 2011)* (Figure I.24).

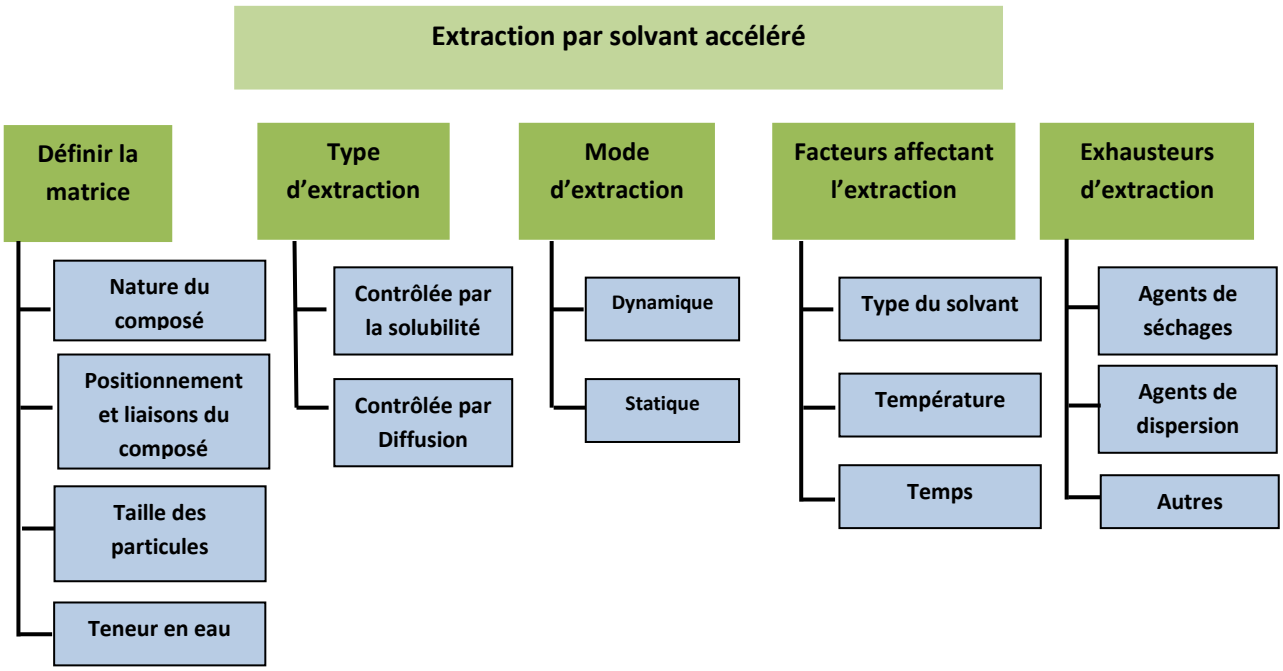



Figure I.24 : Paramètres principaux influençant l'extraction par ASE *(Mustafa & Turner, 2011).*

#### *I.4.7.2.2.1 Extraction des caroténoïdes par ASE*

Durant la dernière décennie, l'extraction par solvants organiques accélérée par la pression est devenue une technique populaire pour l'extraction des caroténoïdes. C'est en 2004 que l'extraction des caroténoïdes par ASE a été décrite pour la première fois par *Denery et al.,* sur les algues H. *pluvialis* et D. *salina.* Ils ont étudié l'effet du solvant d'extraction et de la température sur l'extraction de l'astaxanthine et la lutéine et comparé avec une extraction conventionnelle. L'extraction par ASE présente des rendements d'extraction équivalents aux rendements obtenus par extraction conventionnelle. *(Breithaupt et al., 2004)* ont montré que les meilleurs rendements d'extraction par ASE de caroténoïde sont obtenus à 70 bar, 40°C, 5 min de temps de cycle statique avec 3 cycles d'extraction, en utilisant un mélange binaire de solvant (MTBE/méthanol) (1/1 ; v/v) et (éthanol/hexane) (4/3 ; v/v). L'extraction des caroténoïdes de différents types d'algues a été réalisée par ASE dans diverses études *(Meizoso et al., 2008)(Koo et al., 2012)(Jaime et al., 2010)(Cha et al., 2010)(Herrero et al., 2004)*. L'extraction des caroténoïdes a été également réalisée par ASE à partir de carottes et de leurs produits de transformation, en utilisant l'éthanol comme solvant *(Mustafa et al., 2012 ; Saha et al., 2015)*. L'extraction des capsacinoïdes du piment a été décrite par *(Barbero et al., 2006)*, celle de l'astaxanthine à partir de crevettes par *Quan & Turner* en 2009. Celle de l'α- et β-carotène à partir de fibres de palme pressées par *Cardenas-Toro et al.* en 2015 et *Sangi et al.* en 2005.

Les principales études décrites dans la littérature sont colligées dans le tableau I.9.

Tableau I.9 **:** Extraction des caroténoïdes par ASE

| Sources | Conditions d'extraction | Caroténoïdes | Solvant d'extraction |
|---|---|---|---|
| ***Haematococcus pluvialis*** | **103,4 bars, 40°C, 2 cycles (5 min)** | Astaxanthine | |
| *(Denery et al., 2004)* | **(mode statique)** | Lutéine | Acétone, éthanol |
| | | | Acétone: éthanol (7/3,v/v) |
| | | | Acétone: Méthanol (7/3, v/v) |
| | | | DCM: méthanol(1/3,v/v) |
| ***Dunaliella salina*** | **103,4 bars, 40°C, 2 cycles (5 min)** | Lutéine | |
| *(Denery et al., 2004)* | **(mode statique)** | β-carotène | |
| | | | |
| ***Caroténoïdes comme additifs alimentaires*** | **70 bars, 40°C, 3 cycles (5min)** | Lutéine, Norbixine, Bixine | Méthanol/Ethyle acétate/Ether de pétrole |
| *(Breithaupt et al, 2004)* | **(mode statique)** | Capsanthine | (1/1/1, v/v/v) |
| | | Canthaxanthine | |
| | | β-carotène | |
| | | Lycopène | |
| | | β-Apo-8'-caroténal | |
| | | Ester éthylique de l' acideβ-Apo-8'-caroténoïque | |
| | | | |
| ***Spirulina platensis*** | **103,4 bar, 115<T°C<170, 9<t (min) <15** | β- carotène | Hexane, Ethanol, Eau, Ether de pétrole |
| *(Herrero et al., 2004)* | **(mode statique)** | | |
| ***Phormidium (algue)*** | **103,4 bars, 150°C, (20 min)** | β- carotène | Ethanol |
| *(Meizoso et al., 2008)* | | Violaxanthine | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | Néoxanthine | |
| | | Lutéine | |
| | | | |
| ***Haematococcus pluvialis*** | **103,4 bars, 100°C, (20 min)** | Néoxanthine | Ethanol, Hexane |
| *(Jaime et al., 2010)* | **(mode statique)** | Lutéine | |
| | | β-carotène | |
| | | Astaxanthine | |
| | | astaxanthine ester | |
| | | astaxanthine mono ester | |
| | | | |
| ***Clorella vulgaris*** | **103,4 bars, 160°C, (30 min)** | Lutéine | Ethanol/Eau (90/10, v/v) |
| *(Cha et al., 2010)* | **(mode statique)** | β-carotène | |
| | | | |
| ***Clorella ellipsoidea*** | **103,4 bars, 115,4°C, (23,3) min** | Zéaxanthine | Ethanol |
| ***Piments rouge*** | **(mode statique)** | | |
| *(Koo et al., 2012)* | | | |
| | | | |
| ***Carotte*** | **50 bars, 60°C, 5 cycles (2min)** | β- carotène | Ethanol |
| *(Mustafa et al., 2012)* | **(mode statique)** | α-carotène | |
| | | | |
| ***Carotte*** | **103,4 bars, 60°C, (15 min)** | β-carotène | Ethanol/ Hexane (4/3, v/v) |
| *(Saha et al., 2015)* | **(mode statique)** | Lutéine | Ethanol/Hexane/Acetone (2/3/1, v/v/v) |
| | | | |
| ***Fibre de palme*** | **103,4 bars, 80°C, 2 cycles (10 min)** | β- carotène | n-hexane |
| *(Sangi et al., 2005)* | **(mode statique)** | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ***Fibre de palme*** | **40 bars, 55°C, (17 min)** | β-carotène | Ethanol |
| *(Cardenas-Toro et al., 2015)* | **(mode dynamique)** | α-carotène | |
| | | | |
| ***Crevette*** | **60 bars, 80°C, (15 min)** | Astaxanthine | Ethanol |
| *(Quan & Turner, 2009)* | **(mode statique)** | | |

### *I.4.7.3 Extraction en milieux $CO_2$ supercritique*

L'extraction par fluide supercritique est une technique d'extraction relativement récente. Elle est apparue dans l'industrie dans les années 1970, comme un procédé alternatif à la distillation des matrices végétales. Le $CO_2$ supercritique fut utilisé comme solvant d'extraction pour la première fois en 1971, dans la décaféination des grains de café. Depuis 1980 cette technique s'est imposée dans le secteur agroalimentaire, en particulier pour l'extraction de molécules organiques à partir de plantes *(Messer et al., 1998)*.

Les caractéristiques physico-chimiques du $CO_2$ (incolore, inodore, non inflammable et non toxique, recyclable) font du $CO_2$ un solvant très approprié pour l'extraction à partir de matrices végétales ou animale. Par ailleurs, l'intérêt croissant de ces dernières décennies vis-à-vis des questions environnementales a contribué au développement de ce type d'extraction, qui présente le mérite d'être en plein accord avec les douze principes de la chimie verte dans les industries chimique, pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, afin de limiter l'utilisation de solvants organiques potentiellement toxiques et non recyclables.

#### *I.4.7.3.1 Fluide supercritique et diagramme de phase*

Un fluide supercritique est un corps pur qui possède un point critique, à une température critique noté Tc et une pression critique noté Pc. On parle d'un fluide supercritique lorsque le fluide est chauffé au-delà de sa température critique, et lorsqu'il est comprimé au-dessus de sa pression critique, le fluide supercritique devient de plus en plus dense, mais il ne passe jamais en phase liquide.

Au-delà des Tc et Pc, chaque corps présente un comportement intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux. Cet « état » dit supercritique est caractérisé par trois propriétés particulières :

- Une masse volumique pouvant être élevée comparable à celle des liquides,
- Une faible viscosité comparable à celle des gaz,
- Un coefficient de diffusivité intermédiaire entre celui des gaz et celui des liquides.

La variation continue de la densité et la constante diélectrique de chaque fluide supercritique permet de modifier le fluide pour optimiser la vitesse ou la sélectivité de la réaction et contrôler la solubilité des réactifs ou des produits *(Jessop, 1998)*.

La figure I.25 représente le diagramme de phase du $CO_2$.

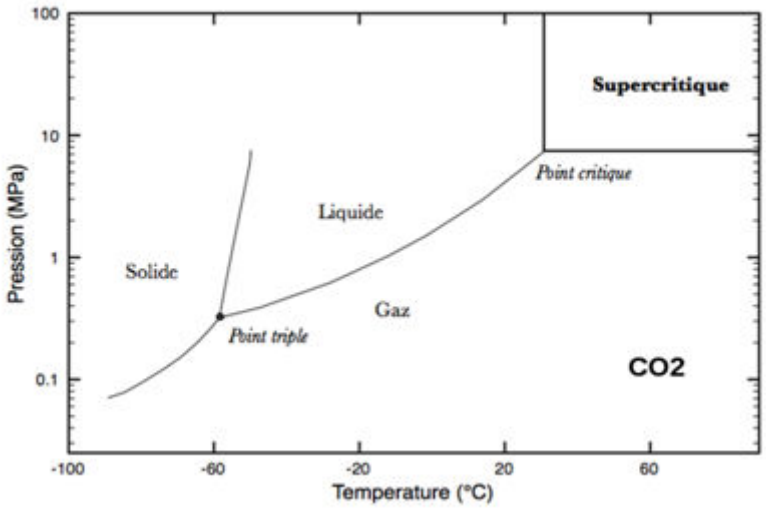



Figure I.25 : Diagramme de phase de $CO_2$

Le tableau I.10 présente et compare les propriétés des fluides supercritiques, des gaz et liquides.

Tableau I.10 : Comparaison des propriétés d'un gaz, d'un fluide supercritique et d'un liquide.

| | **Masse volumique ($g.cm^{-1)}$** | **Viscosité (µPa.s)** | **Diffusivité ($cm^2.s^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| **Gaz** | 0,6. $10^{-3}$ à $2.10^{-3}$ | 10 à 30 | $1.10^{-1}$ à $4.10^{-1}$ |
| **Fluide supercritique** | 0,2 à 1,1 | 10 à 30 | $0,1.10^{-3}$ à $1.10^{-3}$ |
| **Liquide** | 0,6 à 1,6 | 200 à 3000 | $0,2.10^{-5}$ à $2.10^{-5}$ |

Parmi les fluides supercritiques, les plus utilisés sont le dioxyde de carbone, l'eau, le fluide frigorigène $R_{134}a$, l'éthane, le propane, l'éthylène et le propylène. Le dioxyde de carbone et l'eau sont les deux fluides les plus utilisés car ils présentent l'avantage d'être des solvants verts, non polluants et inflammables. Les cordonnées critiques élevées de l'eau limitent son utilisation en extraction de biomolécules issues de matrices biologiques fragiles car thermosensibles (Tableau. I 11).

Tableau I.11 **:** Température et pression critiques de certains fluides supercritiques d'après *(Jessop, 1998)* et *(Lu et al., 2014)*.

| Fluide supercritique | Température critique (Tc) (°C) | Pression critique ($P_c$) (atm) |
|---|---|---|
| **$C_2H_4$** | 9,3 | 49,7 |
| **Xe** | 16,6 | 57,6 |
| **$CHF_3$** | 25,9 | 47,6 |
| **$CO_2$** | 31,1 | 72,9 |
| **$C_2H_6$** | 32,2 | 48,1 |
| **$C_3H_6$** | 91,8 | 45,5 |
| **$C_3H_8$** | 96,7 | 41,9 |
| **$NH_3$** | 132,3 | 112,0 |
| **$H_2O$** | 374,1 | 218,3 |
| **R $_{134a}$ ($C_2H_2F_4$)** | 101 | 400,7 |

### *I.4.7.3.2 Domaines d'applications du dioxyde de carbone supercritique*

Depuis la mise en œuvre de la technique d'extraction par fluide supercritique et l'industrialisation de ce procédé, l'utilisation de $CO_2$ comme solvant supercritique s'est intensifiée et multipliée dans divers procédés tels que la recristallisation des produits pharmaceutiques, le fractionnement des huiles et polymères, l'élimination des solvants résiduels et monomères à partir des polymères, les réactions de polymérisation, le traitement des déchets solides et liquides, les réactions enzymatiques, l'extraction du cholestérol à partir du beurre, du saindoux, du suif et des œufs, la décaféination du café, et l'extraction des composé amers (lupuline) du houblon *(Charpentier & Sevenants, 1998)* la micronisation *(Martin & Cocero, 2008)*, la chromatographie *(De Klerck et al., 2012)*. Depuis les deux dernières décennies, le procédé d'extraction par $CO_2$ s'est développé surtout dans les domaines agroalimentaire et biopharmaceutique.

L'extraction par $CO_2$ supercritique dans les 13 dernières années a été appliquée sur plus de 300 espèces de plantes du fait de la grande polyvalence du $CO_2$ dont les propriétés qui peuvent être modulées en vue d'une meilleure sélectivité des composés à extraire *(De Melo et al., 2014)*. Le $CO_2$ supercritique est largement utilisé dans l'extraction de plusieurs principes actifs et d'huiles essentielles à partir des matrices végétales comme la pomme *(Adil et al., 2007) (Halvorsen et al., 2000)(Massias et al., 2015)*, le raisin *(Passos et al., 2009)(Passos et al., 2010) (Ghafoor et al., 2010) (Cao & Ito., 2003)*, la tomate *(Kassama et al., 2008)(Ciurlia et al., 2009)(Vagi et al., 2007)*, l'abricot

*(Özkal et al., 2005) (Sanal et al., 2004) (Döker et al., 2004)(Sanal et al., 2005),* l'orange *(Mira et al., 1999)(Berna et al., 2000) (Mira et al., 1996)*, la carotte *(Sun et al., 2006) (Glisic et al., 2007)*, l'anacardier, *(Patel et al., 2006)*, la citrouille *(Shi et al., 2010)(Mitra et al., 2009)*, la pêche *(Sanchez-Vicente et al., 2009) (Mezzomo et al., 2009) (Ekinci & Gürü, 2014)*, le soja *(Rostagno et al., 2002)(Jokic et al., 2012) (Zuo et al., 2008)*, l'ail *(Del Valle et al., 2012)(Zalepugin et al., 2010)* et le gingembre *(Balachandran et al., 2006)(Mesomo et al., 2013)*.

#### *I.4.7.3.3 Principe de l'extraction par $CO_2$ supercritique*

L'extraction par $CO_2$ supercritique est une technique d'extraction intéressante du fait de sa diffusivité élevée combinée à un pouvoir solvant hautement modulable par action sur le coup ; la pression-température. Le $CO_2$ présente l'avantage d'être à l'état gazeux à température et à pression ambiante. En outre le $CO_2$ peut être facilement recyclé après dépressurisation partielle. Le principe de l'extraction par $CO_2$ se dérouler en deux étapes :

Etape 1 : extraction des substances solubles à partir de la matrice solide par le fluide supercritique.

Etape 2 : séparation des composés du solvant supercritique après son expansion par dépressurisation.

Au niveau de la matrice solide, (1) le substrat solide absorbe le solvant supercritique, favorisant la dilatation structurale des cellules de la matrice, (2) les composés solubles sont dissous dans le solvant supercritique, (3) les composés dissous sont ensuite transférés par diffusion à la surface du solide, (4) les composés sont entraînés par le fluide supercritique et enfin séparés *(Pereira et al., 2010)*.

L'extraction par $CO_2$sc est réalisée par pompage du fluide supercritique à travers un extracteur qui contient l'échantillon pour solubiliser les substances à extraire, et à travers la ligne de pressurisation de FS afin de collecter l'extrait (Figure I.26). Un pilote d'extraction par fluide supercritique peut contenir une ou deux pompes à haute pression pour faire circuler le $CO_2$ et si nécessaire un deuxième solvant polaire (cosolvant), un extracteur à haute pression pour contenir la matrice à extraire, un restricteur, et un système de collecte de l'extrait chauffé pour éviter la formation de carboglace par effet Joules-Thomson. La partie extracteur est placée dans un four qui permet de contrôler le paramètre température.

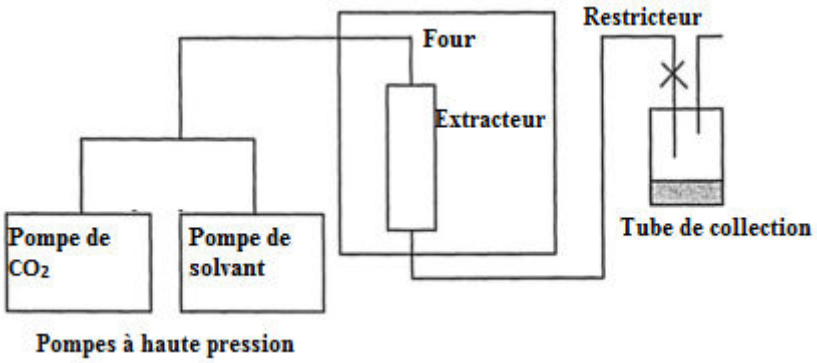



Figure I.26 : Schéma simplifié d'un pilote d'extraction par $CO_2$ supercritique d'après *(Turner, 2006).*

L'extraction peut être utilisée suivant deux modes, le mode dynamique ou mode statique. L'extraction en mode dynamique consiste en une extraction dans laquelle le fluide supercritique passe continuellement à travers la cellule d'extraction. Ce mode permet une récupération plus rapide de l'extrait par un écoulement continu du fluide supercritique frais dans l'échantillon à chaque instant. En mode statique, la cellule d'extraction est pressurisée avec le fluide supercritique et l'extraction est réalisée sans écoulement de fluide supercritique tant que l'extraction n'est pas achevée. En mode statique, il est possible d'ajouter une quantité connue de cosolvant. Il est souvent utilisé dans le cas des larges rendements d'extraction (> 10 g) puisque ce mode d'extraction permet d'économiser du fluide *(Lee & Markides, 1990)*.

#### *I.4.7.3.4 Influence des paramètres d'extraction*

La définition des conditions opératoires dans l'extraction par $CO_2$ supercritique dépend majoritairement du composé ou de la famille de composés à extraire, en particulier la solubilité du composé dans le $CO_2$ supercritique, l'interaction composé-matrice solide, la localisation du composé cible au niveau de la matrice. Les paramètres les plus influençant sur lesquels il est possible de jouer sont : la température, la pression, le cosolvant, le temps d'extraction, le débit du fluide supercritique mais aussi par exemple la manière dont l'échantillon soumis à l'extraction est préparé (poudre plus ou moins fine, morceaux, séchés ou pas…).

##### *I.4.7.3.4.1 Effet de la température et pression*

L'usage du $CO_2$ supercritique en tant que solvant non-conventionnel pour l'extraction de biomolécules émerge de plus en plus depuis une dizaine d'années. Peu cher, non-inflammable, non toxique, recyclable, avec une supercriticité atteinte à 31,1°C et 73,8 bars seulement (conditions compatibles avec la fragilité des matrices biologiques), le $CO_2$ présente donc de nombreux avantages par rapport aux solvants organiques. En jouant sur le couple pression-température, les propriétés du

$CO_2$ supercritique peuvent être facilement ajustées et son aptitude à solubiliser des substrats et des produits réactionnels plutôt apolaires et de faible poids moléculaire peut-être grandement modifiée selon que l'on fait appel à un $CO_2$ supercritique plus ou moins dense et plus ou moins chaud. Une haute densité du $CO_2$, en général associée à un bon pouvoir solvant, n'est d'ailleurs pas le seul facteur à considérer en procédé d'extraction. En effet, lorsqu'à pression constante un $CO_2$ supercritique chauffe, sa densité diminue et donc à priori son pouvoir solvant diminue (et ce d'autant plus vite que la pression est basse) mais la pression de vapeur des solutés dans le $CO_2$, elle, augmente et tend à favoriser la solubilisation du soluté dans le $CO_2$. C'est l'effet net de ces deux évolutions opposées qui va faire qu'une évolution du couple pression-température va favoriser ou non la solubilisation des molécules cibles dans le $CO_2$ *(De Melo et al., 2014)*. En guise d'illustration, *(Tomita et al., en 2013)* ont, par exemple, clairement observé sur l'huile de *Cannabis Sativa* L. que la solubilité dans le $CO_2$ supercritique augmente en fonction de la pression à température constante, et diminue en fonction de la température à pression constante.

#### *I.4.7.3.4.2 Effet du cosolvant*

Le $CO_2$ supercritique est un bon solvant d'extraction pour les composés lipophiles (non polaires). Son affinité avec les molécules polaires est très faible. Aussi, l'ajout de quantités faibles d'un cosolvant est nécessaire dans certains cas, afin de modifier le pouvoir de solvatation/d'augmenter la solubilité des composés polaires à extraire.

Le cosolvant est une substance qui se dissout dans la phase supercritique. Dans le cas du $CO_2$ supercritique, le cosolvant modifie les propriétés solvatantes du $CO_2$ en autorisant ou favorisant des interactions chimiques spécifiques.

L'effet de l'ajout d'un cosolvant sur le rendement d'extraction a été beaucoup étudiée *(Jeong & Chesney, 1999)(Veggi et al., 2011)(Huang et al., 2013)(Shi et al., 2009)*. Ces études montrent que l'effet prédominant dans l'extraction avec cosolvant dépend du type de solvant ajouté, de la matrice d'extraction et de la nature du composé à extraire.

#### *I.4.7.3.4.3 Effet du débit de $CO_2$ supercritique*

Généralement, un débit de $CO_2$ élevé augmente le rendement d'extraction (*Reverchon & Marrone, 2001)*. Lorsque le procédé d'extraction est contrôlé par une résistance de transfert de masse externe, ou par un équilibre de transfert de masse, la quantité de $CO_2$ qui parcourt la cellule d'extraction détermine le rendement d'extraction *(Reverchon & De Marco, 2006)*. Dans certains cas, l'effet inverse est observé. Ceci est dû à l'insuffisance du temps de contact entre le $CO_2$ et la matrice. Par

exemple, *Papamichail et al., (2000)* ont observé que le rendement d'extraction de l'huile des grains de céleri augmente en augmentant le débit du $CO_2$.

La vitesse de solvant ou débit est une variable indépendante qui influence de façon directe la dispersion axiale, le coefficient de transfert de masse et l'accumulation de l'extrait dans la phase supercritique *(De Melo et al., 2014)*.

#### *I.4.7.3.4.4 Influence du temps d'extraction*

Le temps d'extraction va être choisi en fonction de la nature du soluté à extraire, de la nature et quantité de la matrice, de la granulométrie, de la solubilité, de la diffusivité du soluté en milieu $CO_2$ supercritique, des interactions solvant-soluté-matrice ainsi que du débit de $CO_2$ supercritique. Par exemple, *(Reverchon & Teddeo, 1995)* ont extrait l'huile de soja à différents temps d'extraction, aux conditions d'extraction optimum. Ils ont montré que le rendement d'extraction des terpènes oxygénés et non oxygénés passe de 20% après 20 min d'extraction à 37% dans l'intervalle 200-350 min. Le rendement d'extraction des composés de masse moléculaire élevée (sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés) augmente avec l'augmentation du temps d'extraction, dû à des mécanismes différents de transfert de masse entre les composés de faible masse et ceux de masse moléculaire élevée.

*(Sanal et al., 2004)* ont étudié le temps d'extraction du β-carotène à partir de l'abricot à différentes pressions à 55°C (Figure I.27). Trois phases ont été définies (1) en 30 min seulement, un rendement de 62 µg/g est atteint à 40,5 MPa (405 bars) avec une augmentation quasi-linéaire. La solubilisation du β-carotène dans la phase $CO_2$ est à son maximum ; (2) de 30-60 min fort ralentissement de la croissance du rendement d'extraction qui n'atteint que 70 µg/g environ à 60 min ; (3) la troisième phase (60-150 min) est caractérisée par une variation du rendement d'extraction quasi nulle (plateau) permettant d'atteindre 72 µg/g au bout de 150 min. La question du coût matière ($CO_2$, cosolvant) et du coût de fonctionnement (pompes, cryostat, échangeurs) du procédé d'extraction est ici d'importance. Un arrêt de l'extraction entre la 30$^{ème}$ minute et la 60$^{ème}$ minute serait sans doute opportun afin d'essayer d'obtenir un procédé économiquement compétitif.

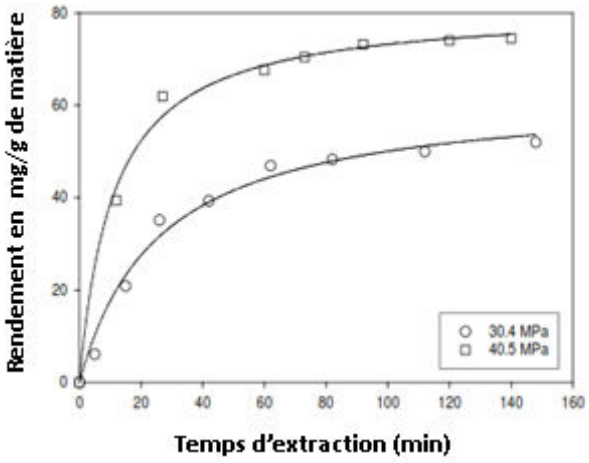



Figure I.27 : Effet du temps d'extraction sur l'extraction par $CO_2$ supercritique du β-carotène à 328 K (55°C), à deux pressions 30,4 et 40,5 MPa ; Débit 1mL/min, d'après *(Sanal et al., 2004)*.

### *I.4.7.3.4.5 Effet de la granulométrie et de la taille des particules de la matrice solide*

La granulométrie et la taille des particules de la matrice d'extraction jouent un rôle important dans l'extraction en relation avec le débit. Une granulométrie trop fine va avoir tendance à favoriser le passage du $CO_2$ *via* un chemin préférentiel à travers la matrice et entre la matrice et la face interne de l'extracteur, avec pour conséquence un faible contact entre le $CO_2$ (et son éventuel cosolvant) et la matrice et une extraction de faible efficacité. Ce passage du solvant par un ou plusieurs chemins préférentiels dans la matrice est appelé « channelling ». Afin de l'éviter, il est préférable d'avoir une taille de particules comprise entre 0,25 et 2 mm *(Reverchon & De Marco, 2006)*. Par ailleurs, l'usage de filtres de type frittés (*sintered filters*) à l'entrée du réacteur permet de répartir le flux de $CO_2$ sur toute la zone de contact de la matrice avec le filtre et donc de mieux répartir le flux de $CO_2$ à travers la matrice entière.

Dans le but d'augmenter le rendement d'extraction, la matrice solide doit être broyée pour augmenter les surfaces de transfert de masse *(Pereira et al., 2010)*. Un broyage trop fin peut néanmoins provoquer un colmatage au niveau de l'extracteur conduisant à une mise en défaut des pompes. La dimension optimum peut être choisie, cas par cas, en considérant la teneur en eau de la matrice solide et la quantité de composés liquides extractables qui produisent un phénomène de coalescence entre les particules. Ceci favorise une extraction irrégulière. Ainsi, une faible taille de particules engendre la perte des composés volatiles au cours du procédé d'extraction *(Reverchon & De Marco, 2006).*

*(Reverchon & Marrone, 2001)* ont modélisé l'effet du diamètre des particules sur l'extraction d'huiles végétales à partir de pépins de coriandre, raisin, tomate, tournesol, arachide, fenouil et amande (Figure I.28). A un temps d'extraction fixe, le rendement d'extraction en $CO_2$ supercritique est plus

élevé pour des particules de diamètre 0,1 mm par rapport à 0,5 et 2 mm. La simulation du rendement d'extraction montre que plus la taille des particules augmente, plus le rendement diminue.

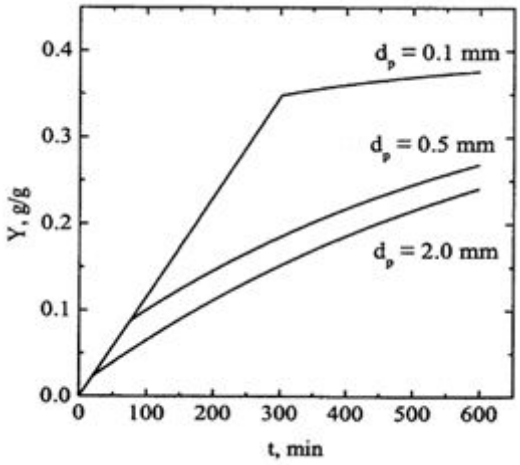



Figure I.28 : Simulation des courbes de rendement d'extraction d'huiles végétales pour des grains génériques à différents diamètres de particules d'après *(Reverchon & Marrone, 2001).*

Les mêmes observations ont été reportées par *(Salgin & Salgin, 2013)* sur l'extraction des lipides à partir des noyaux de pin. Le rendement d'extraction maximal est obtenu pour une taille de particule de 362,5 µm et le rendement est deux fois plus faible pour des particules de diamètre 725,0 µm.

### *I.4.7.3.5 Extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique*

L'extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique est une alternative nouvelle à l'extraction conventionnelle, qui présente différents avantages tel que l'utilisation de températures peu élevées, un procédé peu énergétique, une possibilité de recyclage du solvant, la prévention des réactions d'oxydation car on utilise des températures peu élevées et une qualité du produit final du fait de l'absence de traces de solvant dans la phase contenant le soluté *(Mezzomo et al., 2013).*

Beaucoup d'auteurs ont discuté l'utilisation de l'extraction par fluide supercritique (SFE : Supercritical Fluid Extraction) des caroténoïdes durant les deux dernières décennies. Il existe un intérêt croissant dans l'extraction du β-carotène et du lycopène dans les secteurs industriel, alimentaire et pharmaceutique. Cependant, la faible solubilité des caroténoïdes dans le $CO_2$sc permet d'utiliser le $CO_2$ comme anti-solvant de précipitation *(Mattea et al., 2009).*

Le premier facteur qui influence le rendement d'extraction des caroténoïdes est leur solubilité, qui augmente avec la pression et donc la densité du $CO_2$ *(Mendes et al., 1995)(Sovova et al., 2001), (Nang Lau et al., 2008)(Subra et al., 1998)(Mendes et al., 1999)(Saldana et al., 2010)(Saldana et al., 2006)*.

*(Nang Lau et al., 2008)* ont montré que la solubilité des carotènes extraits à partir des fibres de palme à 40°C, 30 MPa (300 bars) est de 0,212 mg/g $CO_2$, 23 fois plus élevé qu'à une pression de 10 MPa (0,009 mg/g $CO_2$). D'autre part, certains travaux ont montré que l'extraction des carotènes diminue quand la pression atteint 35-50 MPa *(Nobre et al., 2009)(Filho et al., 2008)(Sanal et al., 2004)*. A ces pressions élevées, la sélectivité du $CO_2$ supercritique diminue, ce qui contribue à la dilution du ou des carotènes ciblés parmi d'autres composés non souhaités dans l'extrait. La non-polarité des carotènes tend à favoriser leur solubilité dans le $CO_2$ supercritique. Cependant, leurs masses moléculaires élevées (536,87 g/mol pour le β-carotène et le lycopène) limite cette solubilité *(Pereira et al., 2010)*.

Afin de pallier à ce problème, l'utilisation de cosolvant est une alternative intéressante. L'usage de nombreux cosolvants tels que l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, le dichlorométhane, le diméthoxypropane, l'hexane, le méthanol, le chlorure de méthylène et l'éthanol a été étudié par divers auteurs. L'ajout de ces cosolvants permet d'améliorer le rendement d'extraction *(Cadoni et al., 2000) (Jaren-Galan et al., 1999)(Ollanketo et al., 2001)(Weathers et al., 1999)*. Du fait de leur toxicité, leur utilisation n'est pas recommandée pour des procédés verts. L'éthanol est le cosolvant le plus utilisé dans l'extraction des caroténoïdes. *(Jaren-Galan et al., 1999)* ont comparé l'utilisation de l'éthanol et de l'acétone à 1% en volume pour l'extraction des caroténoïdes à partir du paprika. Les résultats ont montré que l'éthanol améliore le rendement d'extraction de 1,8 fois. *(Vaughnet al., 2008)* ont évalué l'effet de l'éthanol (10 et 15%) sur l'extraction du lycopène à partir de la pastèque. Le rendement d'extraction le plus élevé (38 µg/g) a été observé pour des conditions de 70°C, 27,7 MPa et 15% d'éthanol. Les mêmes observations ont été rapportées par *(Kassama et al., 2008)*. En optimisant l'extraction du all-*trans*-lycopène à partir des pelures de tomate, la modélisation de l'effet de l'éthanol montre que l'utilisation de 14% d'éthanol à 62°C, 45 MPa donne le rendement le plus élevé comparé à 5% d'éthanol.

Comme vu précédemment, la température représente aussi un facteur déterminant dans l'extraction des caroténoïdes en milieu $CO_2$ supercritique. Cependant, l'augmentation de la température peut entraîner leur dégradation pendant l'extraction. Quand la température est élevée à pression faible, la densité du $CO_2$ supercritique diminue, ce qui diminue la solubilité du soluté dans le solvant. En augmentant la pression, la densité diminue et la solubilité augmente. Ce phénomène est le comportement rétrogradé ou le point de croisement. Ce point de croisement est observé entre 20 et 35 MPa et dépend de la matrice solide. *(Filho et al., 2008)* ont observé, dans l'extraction des caroténoïdes à partir du fruit de *Eugenia uniflora L*, que le point de croisement du rendement d'extraction apparaît entre 150 et 200 bars ; cependant, à une pression <150 bars le comportement de l'extraction est semblable à celui de la condensation rétrogradée de la solubilité, ce qui diminue la solubilité des caroténoïdes lorsqu'on augmente la température (Figure I.29).

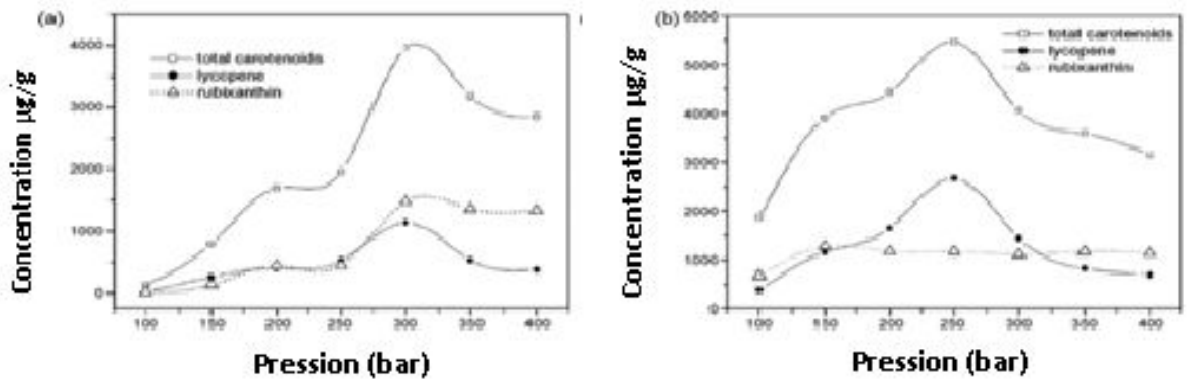



Figure I.29 : Profiles de concentrations des caroténoïdes en fonction de la pression à la température : (a) 40°C et (b) 60°C d'après *(Filho et al., 2008).*

*(Sanal et al., 2005)* ont étudié l'influence de couple (T, P) sur le rendement d'extraction du β-carotène à partir d'abricot (Figure I.30). A 65°C, le rendement ne varie guère lorsque la pression passe de 20 MPa à 40 MPa. A 70°C, le rendement est plus élevé qu'à 65°C mais diminue fortement à 55°C avec une augmentation de pression. Enfin, à 55°C, le rendement de 85% à 20 MPa passe par un maximum de 95%, à 30 MPa pour chuter à 78% à 40 MPa. La solubilité du β-carotène dépend d'un équilibre complexe entre la densité du $CO_2$ et la pression de vapeur du β-carotène au point de croisement.

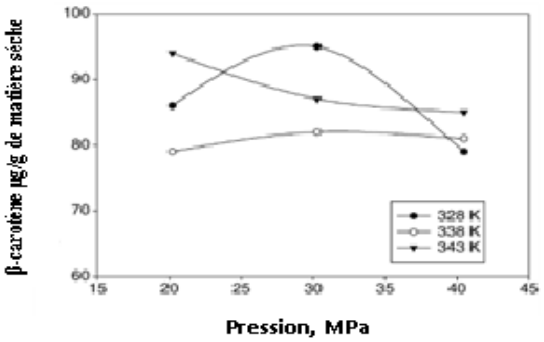



Figure I.30 : Effet de la température et de la pression sur l'extraction par $CO_2$ supercritique + éthanol du β-carotène (15%, v/v éthanol, t=90 min, Débit = 1 mL/min) d'après *(Sanal et al., 2005)*.

Lors d'une augmentation de la pression entre 200 et 400 bars, ce ne sont pas les couples (P-T) conduisant aux plus fortes densités de $CO_2$ qui permettent toujours d'obtenir les plus forts rendements d'extraction. A 200 bars, par exemple, le meilleur rendement est obtenu avec le $CO_2$ le moins dense (à 70°C, soit 343 K) dont la densité est de 628 kg/m$^3$, alors qu'à 65°C (338 K) la densité est de 662 kg/m$^3$, et à 55°C (328 K) la densité est de 730 kg/m$^3$. Ceci est sans doute dû au fait que, à 200 bars, une température de 70°C permet d'augmenter fortement la solubilité du β-carotène *via*

l'augmentation de sa pression de vapeur qui devient prépondérante sur la densité. A 300 bars, le meilleur rendement d'extraction est cette fois-ci obtenu avec le $CO_2$ le plus dense, c'est-à-dire le plus froid (55°C), dont la densité est de 857 kg/$m^3$. Un point de croisement, existe entre effet prédominant de la pression de vapeur et effet prédominant de la densité aux environ de 240 bars, quand on compare les extractions à 70°C et 55°C. Un second point de croisement est observé aux alentours de 370 bars si on considère ces deux températures. En effet à 400 bars, le $CO_2$ le plus dense, (55°C) dont la densité est de 934 kg/$m^3$ donne à nouveau un moins bon rendement que le $CO_2$ à 70°C dont la densité est de 874 kg/$m^3$. Ce second point de croisement, s'il ne résulte pas d'une imprécision de mesure, pourrait-être dû au fait qu'à trop haute pression, le $CO_2$ se met à solubiliser plus d'autres molécules (moins grande sélectivité d'extraction) entrant en compétition avec le β-carotène pour la solubilisation dans le $CO_2$.

Le temps d'extraction et le débit du $CO_2$ supercritique peuvent influencer aussi le procédé d'extraction : un temps d'extraction trop long peut entraîner une diminution du rendement d'extraction principalement due à la dégradation des composés *(Davarnejad et al., 2008)*.
Le temps d'extraction dépend majoritairement du type ou de la matrice végétale utilisée, de la concentration des caroténoïdes dans la matrice, du débit du $CO_2$ et les conditions opératoires (P et T). *(Machmudah et al., 2008)* ont étudié l'effet du débit sur l'extraction du lycopène, du β-carotène et de la lutéine. Les quantités extraites de ces trois pigments augmentent significativement en augmentant le débit du $CO_2$ mais le β-carotène montre un comportement différent lorsqu'on dépasse 3 mL/min de $CO_2$ : le rendement d'extraction diminue. D'une part, la forte interaction entre le $CO_2$ et les caroténoïdes, à fort débit, augmente leur solubilisation dans le $CO_2$, mais d'autre part, le faible temps de contact avec le fluide supercritique diminue le rendement massique. *(Saldana et al., 2010)* ont également suggéré que la diminution du rendement d'extraction du lycopène à partir des tomates, suite à l'augmentation du débit de $CO_2$ supercritique ou $CO_2$ supercritique + cosolvant, est justifiée par la diminution du temps du séjour du solvant avec la matrice, ce qui limite la diffusion du $CO_2$ à travers les pores de la matrice solide (Figure I.31). Cela peut aussi être dû, selon nous, à un éventuel phénomène de channelling provoqué par un trop gros débit de $CO_2$.

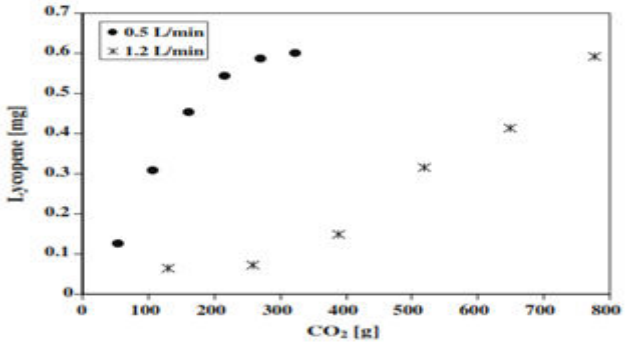



Figure I.31 : Extraction de lycopène à partir de pelure et pulpe du tomate à des débits de 0,5 et 1,2 mL/min, 70°C, et 400 bars pour le $CO_2$ et 5 % (v/v) d'huile de Canola d'après *(Saldana et al., 2010)*.

## I.4.8 Analyse des caroténoïdes

### *I.4.8.1 Séparation par chromatographie conventionnelle sur colonne et/ou couche mince à l'atmosphère*

La chromatographie unidimensionnelle, ou colonne chromatographique (CC) est utilisée comme méthode de séparation standard pour les caroténoïdes. Cependant, elle ne permet pas toujours une bonne séparation dans le cas d'extraits complexes. L'utilisation de la CC est souvent couplée à l'utilisation de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM). La CCM est utilisée dans le but de séparer et purifier les caroténoïdes *(Britton, 1991)*. La phase solide est souvent l'oxyde d'aluminium ($Al_2O_3$) et la silice $SiO_2$. La séparation sur de telles phases stationnaires dépend de la polarité, ce qui explique la faible adsorption des carotènes sur ces supports.

La CCM utilise aussi l'oxyde de magnésium comme phase stationnaire. La séparation dépend fortement du nombre de doubles liaisons et de leur arrangement dans la molécule. Les caroténoïdes présentant de longues chaînes polyènes conjuguées sont fortement adsorbés contrairement aux caroténoïdes cycliques.

Les adsorbants comme le $Ca(OH)_2$ et le $ZnCO_3$ sont utilisés principalement dans la séparation des isomères *(Britton, 1991).*

*(Gross et al., 1971)* ont isolé plus que 50 caroténoïdes de jus d'orange en utilisant une phase stationnaire MgO : Hyflo super-Cel pour séparer les carotènes, monols, diols et polydiols. Les caroténoïdes ont été séparés en utilisant différents adsorbants comme, ($Ca(OH)_2$ gel de silice) (6 /1) et un éluant binaire (éther de pétrole/benzène 98/2 ; v/v). Les monol-caroténoïdes ont été séparés sur une phase d'$Al_2O_3$ avec un mélange de solvant (acétone /éther de pétrole; 5 : 95 ; v/v). Les polyols et les diols ont été séparés en utilisant le gel de silice en variant le mélange d'éluants composé principalement d'acétone et d'éther de pétrole.

*(Stewart & Wheaton, 1973)* ont utilisé le $ZnCO_3$ sur plaque pour séparer les caroténoïdes non saponifiés à partir du jus d'orange. *(Ting & Roussef, 1986)* ont utilisé une colonne avec du MgO/ Hyflo Super-Cel (1 /1) pour la détermination des caroténoïdes de jus d'orange. *(Pascual et al., 1993)* ont séparé les caroténoïdes du jus d'orange par CCM en utilisant un gel de silice, les carotènes ont été séparés sur plaque d'alumine avec (hexane : diéthyle éther ; 97,5 /2,5 ; v/v) et les xanthophylles sur plaque de gel de silice utilisant du *t*-butanol et l'éther de pétrole.

La limite de l'utilisation de la CCM et la colonne chromatographique (CC) pour la séparation des caroténoïdes résulte de l'instabilité de ces molécules en présence de lumière et d'oxygène et d'éventuelles réactions de dégradation sur la phase stationnaire *(Meléndez-Martinez et al., 2007)*. Ces techniques de séparation nécessitent aussi de larges quantités de produits, ce qui présente des difficultés dans la phase de récupération des caroténoïdes *(Su et al., 2002)*.

### *I.4.8.2 Analyse des caroténoïdes par chromatographie liquide haute performance en phase inverse*

Au cours des deux dernières décennies, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse est devenue la méthode de choix pour l'analyse des caroténoïdes suite aux développements récents en CLHP. Des progrès majeurs ont été réalisés dans la conception des détecteurs qui fournissent le spectre d'absorption visible des caroténoïdes séparés en ligne *(Rodriguez-Amaya, 2010)*.

#### *I.4.8.2.1 Colonne*

La chromatographie liquide en phase inverse est la technique la plus utilisée pour l'analyse des caroténoïdes. Généralement, l'analyse des caroténoïdes par CLHP, utilisant les phases inverse C8, C18 et C30 est la meilleure option pour la séparation de caroténoïdes présents dans les extraits à partir de matrices biologiques *(Amorim -Carilho et al., 2014)*.

Les phases stationnaires monomériques octyle (C8) et octadécyle (C18) sont fréquemment utilisées pour la séparation. Cependant, ces phases ne sont pas adéquates pour séparer les isomères *cis* et *trans*. La phase C18 permet des bonnes séparation et résolution pour une grande gamme de composés possédant des petites chaînes carbonées et une faible masse moléculaire, tandis que la phase C30 donne des meilleures sélectivité et séparation pour les caroténoïdes avec de longues chaînes carbonées. La colonne C30 est le bon choix pour obtenir une séparation des isomères géométriques des caroténoïdes, les moins polaires, principalement les carotènes cycliques et acycliques mais reste également performante pour séparer xanthophylles.

La performance des colonnes dépend de plusieurs paramètres comme la longueur de la chaîne alkyles, la réactivité des groupements silanol, la densité des liaisons, le diamètre des pores du

substrat. *(Elper et al., 1992)* ont comparé 65 colonnes chromatographiques en phase inverse C18 afin de déterminer la sélectivité et le taux de récupération d'un mélange de caroténoïdes : lutéine, zéaxanthine, lycopène, échinone, β-cryptoxanthine, α-carotène et β-carotène, en utilisant comme phase mobile l'ACN et le MeOH modifié avec du THF ou de l'éthyle acétate. Les phases stationnaires C18 sont classées en 3 catégories de phase : monomérique, intermédiaire et polymérique. L'étude a montré que la lutéine et la zéaxanthine sont uniquement séparées sur des phases polymériques et quelques phases intermédiaires. Ils ont aussi observé que la taille de particule de la phase stationnaire affecte uniquement la sélectivité des caroténoïdes de différentes tailles (zéaxanthine et β-carotène).

*(Lin & Chen, 2003)* ont développé une méthode pour la détermination des caroténoïdes présents dans le jus de tomate. Ils ont séparé les all-*trans*-lutéine, all-*trans*-carotène, all-*trans*-lycopène et leurs 13-*cis*-isomères, en utilisant une colonne C30 *250 mm×4,6 mm d.i, 5 µm, et un gradient d'élution composé de (**A**) : (ACN/ butanol, 70 /30, v/v), et (**B)** : DCM. Le temps d'analyse était de 55 min à 2 mL/min de débit de la phase mobile, et détection UV à 476 nm.

*(Melendez-Martinez et al., 2003)* ont utilisé une Colonne C18 Kromasil (250 mm×4,6 d.i, 5 µm) pour l'analyse des caroténoïdes dans le jus d'orange congelé par un mélange quaternaire de phases mobiles (MeOH/ACN/Dichlorométhane /eau, 50 /30 /15 /5, v/v/v/v) à 0,1% de BHT et 0,1% TEA. *(Ruiz et al., 2005)* ont utilisé une colonne C18 LiChrocart (250 mm×4 mm d.i, 5µm) pour l'analyse des caroténoïdes de 37 variétés d'abricot, en utilisant un gradient d'élution composé d'acétone et d'eau à 1,5 mL/min de débit pendant un temps d'analyse de 22 min.

La séparation des caroténoïdes a souvent été assurée par des colonnes C18 avec 5 µm de taille de particule sphérique (250 mm × 4,6 mm) comme la phase polymérique C18 Vydac 201TP54 (250 nm× 4,6 mm, 5 µm taille de particule), jusqu'à l'apparition de la phase C30 proposée en 1994 par *Sander et al.* Ce n'est que ces 10 dernières années que des phases C30 sont couramment utilisées pour l'analyse et la séparation des caroténoïdes *(Aman et al., 2005)(Chandrika et al., 2006)(Giuffrida et al., 2007)(Matsumoto et al., 2007)(Davey et al., 2009)*.

#### *I.4.8.2.2 Phase mobile*

Différentes phases mobiles ont été utilisées pour l'analyse des caroténoïdes : eau, méthanol, acétonitrile, 2-propanol, acétone, éthyle acétate, tétrahydrofurane (THF), ter-butyle méthyle éther (MTBE), dichlorométhane (DCM) et chloroforme *(Rivera & Canela-Garayoa, 2012)* en mode gradient ou isocratique. Le choix de la phase mobile est une étape cruciale dans l'analyse des caroténoïdes.

L'acétonitrile et le méthanol ou le mélange des deux représentent les constituants majeurs des phases mobiles utilisées pour l'analyse des caroténoïdes. L'utilisation de l'ACN est due à sa faible viscosité, sa faible absorbance en UV *(Amorim-Carrilho et al., 2014)*.

La phase mobile peut être modifiée par d'autre solvants afin d'assurer l'augmentation de la solubilité des caroténoïdes et d'améliorer la résolution *(Amorim et al., 2014)*, comme l'eau *(Edelenbos et al., 2001), (Lee, 2001)*, l'acétone *(Englberger et al., 2003),* l'hexane *(Kachik et al., 1992)(Casal et al., 2001)(Chandrika et al., 2003)*, le DCM *(Heinonen et al., 1989)(Murkovic et al 2002),* le THF *(Baysal et al., 2000)(Englberger et al., 2003)*, le propanol *(Hentschel et al., 2002)(Rozzi et al., 2002)*, le chloroforme *(Huck et al., 2000)(Schmitz et al., 1989)*. L'addition de tampon d'acétate d'ammonium ou la triéthylamine (TEA) à la phase organique d'acétonitrile améliore la séparation des caroténoïdes et le THF représente le meilleur solvant organique à ajouter à la phase méthanolique pour modifier la polarité *(Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004)*.

*(Epler et al., 1993)* ont décrit une méthode pour la détermination des caroténoïdes majeurs dans le sérum humain (lutéine, zéaxanthine, β-cryptoxanthine, lycopène et α- et β-carotènes) en utilisant différentes colonnes analytiques et un gradient d'élution composé d'ACN, de MeOH et d'éthyle acétate.

#### *I.4.8.2.3 Méthodes de détection*

##### *I.4.8.2.3.1 Absorbance UV-visible*

Les détecteurs ultraviolets (UV)-visible sont beaucoup utilisés dans les systèmes CHLP pour la détection des caroténoïdes. La détection par absorbance visible permet d'avoir une sensibilité suffisante. Le couplage d'un détecteur à photodiode (PDA) au système CLHP, permet la détection continue et la collection des données spectrophotométriques au cours de l'analyse *(Su et al., 2002)*. Cependant la complexité des profils caroténoïdiques dans certains cas demande des méthodes plus sophistiquées.

##### *I.4.8.2.3.2 La détection électrochimique*

Cette technique est bien utilisée pour augmenter la sensibilité de la détection des caroténoïdes hydrocarboné et oxygéné. C'est une technique qui utilise des microéchantillons capillaires afin d'éviter les long temps d'analyse par CLHP *(Su et al., 2002)*.

*(Ferruzzi et al., 1998)* ont décrit deux méthodes utilisant la CLHP-ED sur une colonne C30 pour l'optimisation de la séparation du all-*trans*-lycopène et de ces formes *cis* isomères. 13 formes isomères du lycopène ont été identifiées, en utilisant deux modes d'élution isocratique et gradient, de MeOH, MTBE et eau à 1 M d'une solution tampon d'acétate d'ammonium. Cette méthode a été

utilisée pour l'analyse dans de petites quantités de plasma, cellules de la muqueuse buccale, tissu de prostate. La limite de détection des *trans*-lycopène par cette méthode est de 50 femto mole soit 100 fois plus élevée que la limite de détection enregistrée par la méthode de détection avec l'UV-visible.

#### *I.4.8.2.3.3 Spectrométrie à lentille thermique (TLS)*

La spectrométrie à lentille thermique est une méthode de détection utilisant un laser photo-thermique. Cette méthode peu courante se révèle être ultra sensible. La TLS a été appliquée pour la détection des caroténoïdes dans le plasma humain. *(Franko et al., 1998)* ont utilisé la CLHP couplé à la TLS afin de détecter l'all-*trans*-β-carotène, la β-cryptoxanthine, l'α-carotène et le lycopène dans le plasma sanguin. Les résultats ont montré une limite de détection diminuée d'un facteur 100 par rapport à la détection par UV-visible couplée à la CHLP. La même technique a été utilisée par *(Luterotti et al., 1999)* pour la détermination du β-carotène dans l'huile de poisson à usage pharmaceutique qui représente une matrice un peu complexe contenant des acides gras, vitamine et stérols.

*(Luterotti et al., 2000)* ont utilisé la CLHP-TLS pour la détermination du all-*trans*-β-carotène dans le foie de rat et de bœuf. La technique a permis une limite de détection de l'all-trans-β-carotène comprise entre 0,39 et 0,49 ng/mL, avec une précision de détermination comprise entre 2,8 et 7,2 %.

#### *I.4.8.2.3.4 Spectroscopie de masse (MS)*

La détection des caroténoïdes par spectroscopie de masse présente beaucoup d'avantages comparée à la détection UV. D'un point de vue analytique, la LC-MS et une technique récente mais mâture pour l'identification et la quantification des caroténoïdes : elle fournit des informations sur leur structure *(De Quiros & Costa 2006)* et bien sûr permet de les identifier selon leur masse moléculaire. Les différents motifs de fragmentation de la molécule contribuent à leur identification structurale. La spectrométrie de masse couplée à la spectrophotométrie UV-visible suffit souvent à identifier un caroténoïde sous sa forme *trans* et certaines formes isomériques en *cis* mais comme nombre de caroténoïdes différents ont la même masse molaire et des formes isomériques *cis* nombreuses et peu évidentes à séparer, les analyses ultra-détaillées de profils caroténoïdiques dans les matrices biologiques sont pour ainsi dire inexistantes dans la littérature.

Les motifs de fragmentations dépendent du mode d'ionisation et de la composition de la phase mobile. Différents modes d'ionisation ont été utilisés pour l'identification de principes actifs à partir des matrices biologiques, par CHLP-MS : (i) l'ionisation par électron (EI), (ii) le bombardement atomique rapide (connu sous le nom de *FAB, fast atom bombardment*), (iii) désorption/ionisation sur matrice assistée par laser (MALDI), (iv) ionisation par électro-spray (ESI), (v) ionisation chimique à

pression atmosphérique (APCI), (vi) photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) et (vii) analyse solide par sonde à pression atmosphérique (ASAP) *(Cacciola et al., 2012)*.

*(Osawa et al., 2010)* ont utilisé le mode FAB-MS pour la caractérisation de caroténoïdes spécifiques tel que la sarcinaxanthine ($C_{50}$) et sa forme monoglicoside dans *Micrososcus yunnanensis.* *(Maoka et al., 2011)* ont utilisé la même technique pour l'identification des caroténoïdes et leur forme ester d'acide gras dans les pétales de l'*Adonis aestivalis.* Récemment *(Maoka et al., 2012)* ont identifié les caroténoïdes dans 4 espèces de fruits de mer utilisant la FAB-MS. L'avantage de ce mode d'ionisation est la limitation de la dégradation des caroténoïdes pendant leur analyse.

Parmi les techniques d'ionisation compatibles avec la chromatographie liquide, on trouve les modes ESI et APCI. Généralement, l'ionisation par électro-spray positif (ESI+) est souvent utilisée avec des caroténoïdes polaires (xanthophylles) et carotènes qui répondent bien à ce mode d'ionisation. Les carotènes ne s'ionisent pas en mode négatif. Cependant, le mode APCI forme des ions moléculaires chargés négativement ou des molécules protonées ou déprotonées des carotènes ou xanthophylles *(Amorim-Carrilho et al., 2014)*, ce qui justifie l'utilisation fréquente de ce mode d'ionisation dans l'identification des caroténoïdes *(Inbaraj et al., 2008)(De Rosso & Mercadante, 2007)(Breithaupt & Bamedi, 2002)(Breithaupt et al., 2004)(Kao et al., 2012)(Lineau et al., 2003)(Liu et al., 2014)*.

#### *I.4.8.2.4 Identification des caroténoïdes par résonance magnétique nucléaire (RMN)*

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse souvent utilisée dans l'identification de caroténoïdes inconnus, cette technique étant couplée souvent à une analyse CHLP-MS. Elle nécessite néanmoins de réussir à obtenir l'espèce à identifier sous forme très pure et en quantité assez importante (quelques mg) ce qui n'est pas toujours aisé, surtout quand on travaille sur une matrice biologique complexe.

*(Aman et al., 2005)* ont utilisé la CLHP-PAD, CHLP-APCI-MS, 1D et 2D-CLHP-RMN pour l'identification et l'analyse des stéréo-isomères de la lutéine et la zéaxanthine à partir des épinards et du maïs. *(Sivathanu & Palaniswamy, 2012)* ont utilisé la CLHP-RMN et LC-MS-APCI dans la purification et la caractérisation des caroténoïdes à partir de l'algue verte *Chlorococcum humicola* 6 pigments ont été caractérisés et purifiés : la violaxanthine, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, l'α-carotène et le β-carotène.

Récemment, *(LaFontaine et al., 2013)* ont utilisé la RMN pour identifier six nouveaux caroténoïdes dans le plumage du Pompadour Cotinga (*Xipholena punicea*). La RMN a été utilisée dans la détermination des structures des six méthoxy caroténoïdes.

# Références


Adil I.H., Çetin H.I., Yener M.E., Bayindirly A. Supercritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. Journal of Supercritical Fluids. (2007). 43.55-63.

Akin E. B., Karabulut I., Topcu A. Some compositional properties of main Malatya apricot (Prunus armeniaca L.) varieties. Food Chemistry. (2008). 107. 039-948.

Ali A., Masud T., Abbasi K. S. Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca L*.) grown in Northen Areas of Pakistan. Scientia Horticulturae. (2011). 130. 386-392.

Aman R., Biehl J., Carle R., Conard J., Beifuss U., Schieber A. Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to analysis of lutein and zeaxanthin sterioisomers in thermally processed vegetables. Food Chemistry. (2005). 92. 753-763.

Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. Trends in analytical chemistry. (2014). 56. 49-73.

Aranzana M. J., Abbassi E. K., Howad W., Arus P. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. BMC Genetics. (2010). 11-69.

Asgar M.A., Yamauchi R., Kato K. Modification of pectin in Japanese persimmon fruit during the sun-drying process. Food Chemistry. (2003). 81. 555–560.

Badenes M. L., Bryne D. H. (2012). (eds). Fruit breeding. Handbook of plant breeding 8. Chapitre 14. Peach.

Bailey C.H. Hough L,F. (1975). Apricots. In: Janick J. and Moore J.N. (eds), Advances in fruits breeding. Purdue University Press. West Lafayette. Indiana USA. pp. 367-383.

Balachandran S., Kentish S.E., Mawson R. The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger. Separation and Purification Technology. (2006). 48. 94-105.

Barbero G.F., Palma M., Barroso C.G., Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. Journal of Agricultural and food chemistry. (2006). 54. 3231-3236.

Bartle K.D., Boddington T., Clifford A.A. The effect of solubility on the kinetics of dynamic supercritical-fluid extraction. The Journal of Supercriticta Fluids. (1992). 4. 207-212.

Basar H. Elemental composition of various peach cultivars. Scientia Horticulturae. (2006). 107. 259-263.

Baysal T., Ersus S., Starmans D.A.J. Supercritical $CO_2$ extraction of β-carotene and lycopene from tomato paste waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2000). 48. 5507-5511.

Berna A., Tarrega A., Blasco M., Subirats S. Supercritical $CO_2$ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. Journal of Supercritical Fluids. (2000). 18. 227-237.

Bourguiba H., Audergon J.M., Krichen L., Trifi-Farah N., Mamouni A., Trabelsi S., D'Onofrio C., Asma B. M., Santoni S., Khadari B. Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the mediterranean basin. BMC Plant Biology. (2012). 12:49.

Bourguiba H., Khadari B., Krichen L., Trifi-Farah N., Mamouni A., Trabelsi S., Audergon J.M,. Genetic relationships between local North African apricot (Prunus armeniaca L.) germplasm and recently introduced varieties. Scientia Horticulturae. (2013). 152. 61-69.

Breithaupt D.E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. (2004). 86. 449-456.

Breithaupt D.E., Bamedi A., Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (Solanum tuberosum L): New insights into an ancient vegetable. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2002). 50. 7175-7181.

Britton G. (1991). Carotenoids. In: Dey, P.M., Harborne, J.B.E.(Eds), Methods in plant biochemistry. Academic Press. London. pp. 473-518.

Britton G. (1996). Carotenoids. In Hendry, G.A.F., Houghton E.J.D. (Eds). Natural Food colorants. Blackie. Glasgow. London. pp. 197-243.

Britton G., Liaanen-Jensen S., Pfander H. (1996). Carotenoids. (Volume 2) Birkhäuser Verlag AG, Basel.

Britton G., Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. FASEB Journal. (1995). 9(15). 1551-1558.

Cacciola F., Donato P., Beccaria M., Dugo P., Mondello L. Advances in LC-MS for food analysis. LC GC Europe. (2012). 15-24 (special issue).

Cadoni E., De Giorgi M.R., Medda E., Poma G. Supercritical $CO_2$ extraction of lycopene and β-carotene from ripe tomatoes. Dyes and Pigments. (2000). 44. 27-32.

Cao X., Ito Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsquent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. (2003). 1021. 117-124.

Cardenas-Toro F.P, Alcazar-Alay S.C., Coutinho J.P., Godoy H.T., Forster-Carneiro T.F., A.Meireles M.A. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. Food and Bioproducts Processing. (2015). 94. 90-100.

Casal S., Macedo B., Oliveria M.B.P.P. Simultaneous determination of retinol, β-carotene and α-tocopherol in adipose tissue by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B. (2001). 763. 1-8.

Cha K. H., Koo S. Y., Lee D. U. Antiproliferative effects of carotenoids extracts from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2008). 56. 10521-10526.

Cha H.K., Lee H.J., Koo S.Y., Song D.G., Lee D.U., Pan C.H. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from Chlorella vulgaris. Journal of Agricultural and Food industry. (2010). 58. 793-797.

Chandrika U.G., Jansz E.R., Wickramasinghe S.M.D.N., Warnasuriya N.D. Carotenoids in yellow-and red-flesh papaya (carica papaya L). Journal of the Science of Food and Agriculture. (2003). 83. 1279-1282.

Chandrika U.G., Svanberg U., Jansz E.R., In vitro accessibility of β-carotene from cooked Sri Lankan green leafly vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirement. Journal of the Science of Food and Agriculture. (2006). 86. 54-61.

Colle I.J.P., Lemmens L., Van Buggenhout S., Van Loey A.M. Hendrickx M.E. Modeling lycopene degradation and isomerization in the presence of lipids. Food and Bioprocess Technology. (2013) . 6 (4). 909-918.

Turner C. (2006). Overview of modern extraction techniques for food and agricultural samples. Chapitre 1. In Modern Extraction Techniques. ACS Symposium Series : American chemical society : Washington DC.

Charpentier B.A., Sevenants M.R. Supercritical fluid extraction and chromatography, techniques and applications. (1998). In supercritical fluid extraction and chromatography. ACS Symosium Series. American Chemical Society : Washington. DC.

Ciurlia L., Bleve M., Rescio L. Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (lycopersicum esculentrum L.) and hazelnuts (Corylus avellana L): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. The Journal of supercritical Fluids. (2009). 49. 338-344.

Clark C.J, MacFall J.S. Quantitative magnetic resonance imaging of 'Fuyu' persimmon fruit during development and ripening. Magnetic Resonance Imaging. (2003). 21. 679–685.

Clement- Mullet, J.J. (1977). Le livre de l'agriculture. Ed. Bouslama. Tunis.

Collins R.J., Tisdell J.S. The influence of storage time and temperature on chilling injury in Fuyu and Suruga persimmon (Diospyros kaki L.) grown in subtropical Australia. Postharvest Biology and Technology. (1995). 6. 149-157.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. Plant secondary methabolites occurrence, structure and role in the human health.( 1st edition) (2006). Blackwell Publishing L.td.

D'Evoli L., Lombardi-Boccia G., Lucarini M. Influence of heat treatments on carotenoid content of cherry tomatoes. Foods. (2013). 2. 352-363.

Danish Food composition Databank, National Food Institute. Technical University of Denmark. (DTU). (2009), URL< (www.foodcomp.dk)> (Acces le 24 Mars 2015).

Daood H.G., Biacs P., Czinkotai B., Hoschke J. Chromatographic investigation of carotenoids, sugars and organic acids from Diospyros kaki fruits. Food Chemistry. (1992). 45. 151-155.

Davarnejad R., Kassim K.M., Zainal A., Sata S.A. Supercritical fluid extraction of β-carotene from crude palm oil using $CO_2$. Journal of Food Engineering. (2008). 89. 472-478.

Davey M.W., Melloudi I., Keulemans W. Considerations to prevent the breakdown and loss of fruit carotenoids during extraction and analysis in Musa. Journal of chromatography A. (2009). 57. 1742-1751.

De Klerck K., Mangelings D., Vander Heyden Y. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (2012). 69. 77-92.

De Melo M.M.R., Silvestre A.J.D., Silva C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. The journal of Supercritical Fluids. (2014). 92. 115-176.

De Quiros A. R.B., Costa H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. Journal of Food Composition and Analysis. (2006). 19. 97-111.

De Rosso V.V., Mercadante A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2007). 55. 5062-5072.

Del Bubba M., Giordani E., Pippucci L., Cincinelli A., Checchini L., Galvan P. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. Journal of Food Composition and Analysis. (2009). 22. 668–677.

Del Valle J.M., Glatzel V., Martinez J.L. Supercritical $CO_2$ extraction of allicin from garlic flakes: Screening and kinetic studies. Food Research International. (2012). 45. 216-224.

Denery J.R., Dragull K., Tang C.S., Li Q.X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina and Kavalactones from Piper methysticum. Analytica Chimica Acta. (2004). 501. 175-181.

Döker O., Salgin U., Sanal I., Mehmetoglu Ü., çalimli A. Modeling of extraction of β-carotene from apricot bagasse using supercritical $CO_2$ in packed bed extractor. Journal of Supercritical Fluids. (2004). 28. 11-19.

Edelenbos M., Christensen L.P., Grevsen K., HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (Pisum sativum L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2001). 49. 4768-4774.

Ekinci M.S., Gürü M. Extraction of oil and β-sitosterol from peach (Prunus persica) seeds using supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids. (2014). 92. 319-323.

Eldahshan O.A., B.Singab A. N. Carotenoids. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. (2013). Vol (2).

Elper K.S., Sander L.C., Ziegler R.G., Wise S.A., Craft N.E. Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. Journal of Chromatography. (1992). 595. 89-101.

Elper K.S., Ziegler R.G., Craft N.E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. Journal of Chromatography. (1993). 619. 37-48.

Englberger L., Shierle J., Marks G.C., Fitzgerald M.H. Micronesian banana, taro, and other food: newly recognized sources of provitamin A and other carotenoids. Journal of Food Composition and Analysis. (2003). 16. 3-19.

Evreinoff V.A. Le Plaqueminier du Japon ou Kaki. Fruits d'Outre-mer. (1948). 124-132.

Faust, M., Suranyi, D., Nyujto, F. 1998. Origin and dissemination of apricot. Hort. Rev. 22. 225-266.

Fernandez-Garcia E., Carvajal-Lerida I., Jaren-Galan M., Garrido-Fernandez J., Pérez-Galvéz A., Hornero-Méndez D. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. Food research international. (2012). 46. 438-450.

Ferruzzi M.G., Sander L.C., Rock C.L., Rock C.L., Schwartz S.J. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with colimetric electrochemical array detector. Analytical biochemistry. (1998). 256. 74-81.

Filho G.L., De Rosso V.V., A. Meireles M.A., Rosa P.T.V., Oliveira A.L., Mercadante A.Z., Cabral F.A. Supercritical $CO_2$ extraction of carotenoids from pitanga fruits (Eugenia uniflora L.). Journal of Supercritical Fluids. (2008). 46. 33-39.

Font I., Forcada C., Gogorcena Y., Moreno M. A. Fruit sugar profile and antioxidants of peach and nectarine cultivars on almond peach hybrid rootctoks. Scientia Horticulturae. (2013). 164. 563-572.

Food and Agriculture Organization of The United Nation. FOASTAT. (2013). URL. <www. http://faostat.fao.org/>, acces le 19 Février 2015.

Franko M., Van de Bovenkamp P., Bicanic D. Determination of trans-β-carotene and other carotenoids in blood plasma using high-performance liquid chromatography and thermal lens detection. Journal of Chromatography A. (1998). 718. 47-54.

Gaston Bonnier. (1990). La grande flore en couleurs. 4. p 740.

Gatti E., Defilippi B. G., Predieri S., Infante R., Apricot (prunus armeniaca L.) quality and breeding perspectives. Journal of Food, Agriculture & Environment. (2009). 7. 573-580.

Ghafoor K., Parck J., Choi Y.H. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (Vitis labrusca B.) peel by using response surface methodology. Innovative Food Science and Emerging Technologies. (2010). 11. 485-490.

Ghrab M.,Ben Mimoun M., Masmoudi M. M. Chulling trends in a warm production area and their impact on flowering and fruiting of peach trees. Scientia Horticulturae. (2014). 178. 87-94.

Giergielewicz-Mozajska H., Da browski L., Namiesnik J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental Solid samples-Some asspects of theory and practice. Critical Reviews in Analytical chemistry. (2001). 31 (3). 149-165.

Gil M. I., Tomas Barberan F. A., Hess-Pierce B. Kader A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2002). 50. 4976-4982.

Giuffrida D., Salvo F., Salvo A., Pera L.la., Dugo G. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. Food Chemistry. (2003). 101. 833-837.

Glisic S.B., Misic D.R., Stamenic M.D., Zizovic I.T., Asanin R.M., Skala D.U. Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. Food Chemistry. (2007). 105. 346-352.

Gorinstein S., Zemser M., Haruenkit R., Chuthakorn R., Grauer F., Martin-Belloso O., Trakhtenberg S. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. Journal of Nutritional Biochemistry. (1999). 10. 367–371.

Gross J., Gabai M., Lifshitz A. Carotenoids in juice of Shamouti orange. Journal of food science. (1971). 36. 466-473.

Haciseferogullari H., Gezer I., Özcan M. M., Asma B. M. Post harvest chemical and physical-mechanical properties of some apricot varieties cultivated in Turkey. Journal of Food Engineering. (2007). 79. 364-373.

Halvorsen BL., Thomsen C., Greibrokk T., Lundanes E. Determination of fenpyroximate in apples by supercritical fluid extraction and packed capillarynliquid chromatography with UV detection. Journal of chromatography A. (2000). 880. 121-128.

Hedrick U. P. Peaches of New York. (1917). Twenty fourth annual report. Vol (2). Part II.

Heinonen M.I., Ollilainen V., Linkola E.K., Varo P.T., Koivistoinen P.E. Carotenoids in finnish foods : vegetables, fruits and berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (1989). 37. 655-659.

Hentschel V., Kranl K., Hollmann J., Lindhauer M.G., Böhm V., Btsch R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2002). 50. 6663-6668.

Herrero M., Ibanez E., Senorans J., Cifuentes A. Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography A. (2004). 1047. 195-203.

Herrero M., Mendiola J.A., Plaza M., Ibanez E. Screening for bioactive compounds from algea. Chapitre 35. J.W.Lee (ed.) Advanced Biofluels and Bioproducts. (2013).

Hiranvarachat B., Devahastin S., Chiewchan N., Vijaya Raghavan G.S. Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of β-carotene from carrots. Journal of food Engineering. (2013). 115. 190-197.

Hiranvarachat B., Devahastin S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: extraction of carotenoids from carrot peels. Journal of food Engineering. (2014). 126. 17-26.

Huang Z., Li J.H., Li H.S., Teng L.J., Kawi S., Lai M.W. Effects of polar modifiers on supercritical extraction efficiency for organic template removal from mesoporous MCM-41 materials. Journal of Supercritical Fluids. (2013). 82. 96-105.

Huck C.W., Popp M., Scherz H., Bonn GK., Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS. Journal of Chromatographic Science. (2000). 38. 441-449.

Hussain P. R., Meena R. S., Dar M. A., Wani A. M. Gamma irradiation of sun-dried apricots (Prunus armeniaca L.) for quality maintenance and quarantine purposes. Radiation Physics and Chemistry. (2011).

Inbaraj B.S., Lu H., Hung C.F., Wu W.B., Lin C.L., Chen B.H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of lycium barbarum Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (2008). 47. 812-818.

Ishida B.K., Chapman M.H. Effects of a hydrodynamic process on extraction of carotenoids from tomato. Food Chemistry. (2012). 132. 1156-1160.

Itoo S. Persimmon in Tropical and Subtropical Fruits. AVI, Westport, Cf. (Nagy, S. and Shaw, P., eds.). (1980). p. 442.

Jaime L., Meizoso I.R., Cifuentes A., Santoyo S., Suarez S., Ibanez E., Senorans F.J. Pressurized liquid as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from Haematococcus pluvialis microalgae. Food science and technology. (2010). 43. 105-112.

Jaren-Galan M., Nienaber U., Schwartz S.J. Paprika (Capsicium annuum) oleoresin extraction with supercritical carbon dioxide. Journal of Agricultural Food Chemistry. (1999). 47. 3558-3564.

Jeana Gross. Carotenoid change in the mesocarp of the redhaven peach (prunus persica) during ripening. Z Pflanzenphysiol Bd. (1979). 461-468.

Jeong M.L., Chesney D.J. Investigation of modifier effects in supercritical $CO_2$ extraction from various solid matrices. Journal of Supercritical Fluids. (1999). 16. 33-42.

Jessop P.G. Homogeneously-catalyzed syntheses in supercritical fluids. Topics in Catalysis. (1998). 5. 95-103.

Jokic S., Nagy B., Zekovic Z., Vidovic S., Bilic M., Velic D., Simandi B. Effects of supercritical $CO_2$ extraction parameters on soybean oil yield. Food and Bioproducts Processing. (2012). 90. 693-699.

Jomova K., Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. European Journal of Medicinal Chemistry. (2013). 70. 102-110 .

Jules Janick. History of agricultural and horticultural technology in Asia. Lectures 12-13. Perdue University. West Lafayette. IN 47907-1165. USA.

Kadir Ugurtan Y., Kahraman G. (2012). Genetic diversity in apricot, genetic diversity in plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed), ISBN : 978-953-51-0185-7.

Kamarulzaman E.E., Vanderesse R., Mohd Gazzali A., Barberi-Heyob M., Boura C., Frochot C., Shawkataly O., Aubry A., Wahab H.A. Molecular modelling, synthesis and biological evaluation of peptide inhibitors as anti-angiogenic agent targeting Neuropilin-1 for anticancer application. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. (2015). accepted

Kamarulzaman E.E., Mohd Gazzali A., Acherar S., Frochot C., Barberi-Heyob M., Boura C., Chaimbault P., Sibille E., Wahab H.A., Vanderesse R. New peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 for anti-vascular targeted photodynamic therapy. International Journal of Molecular Sciences (2015). Sous presse.

Kan T., Bostan S. Z. Changes of contents of polyphenols and vitamin a of organic and conventional fresh and dried apricot cultivars (Prunus armeniaca L.). World Journal of Agricultural. (2010). 6 (2): 120-126.

Kao T.H., Loh C.H., Inbaraj B.S., Chen B.H. Determination of carotenoids in Taraxacum formosanum by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis. (2012). 66. 144-153.

Kassama L.S., Shi J., Mittal G.S. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. Separation and Purification technology. (2008). 60. 278-284.

Kazan A., Koyu H., Turu I. C., Celiktas O. Y. Supercritical fluid extraction of Prunus persica leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. The Journal of supercritical Fluid. (2014). 92. 55-59.

Khachik F., Goli M.B., Beecher G.R., Holden J., Lusby W.R., Tenorio M.D., Barrera M.R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (1992). 40. 390-398.

Knockaert G., Sudheer K.P., Lemmens L., Van Buggenhout S., Hendrickx M., Van Loey A. Carrot β-carotene degradation and isomerization kinetics during thermal processing in the presence of oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2012). 60. 10312-10319.

Koo S.Y., Cha K.H., Song D.G. Optimisation of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from Chlorella ellipsoidea. Journal of Applied Phycology. (2012). 24. 725-730.

Kostina K.F. (1969). The use of varietal resources of apricots for breeding. Trud. Nikiti. Bot. Sad. 40. 45-63.

Krichen L., Bourguiba H., Audergon J.M., Trifi-Farah N. Comparative analysis of genetic diversity in Tunisian apricot germplasm using AFLP and SSR markers. Scientia Horticulturae. (2010). 127. 54-63.

LaFontaine A.M., Pacheco C., Prum R.O., Frank H.A. Nuclear magnetic resonace analysis of carotenoids from the burgundly plumage of the pompadour cotinga (Xipholena punicea). Archives of biochemistry and biophysics. (2013). 539. 133-141.

Lee H.S. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara cara). Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2001). 49. 2563-2586.

Lee M.L., Markides K.E. Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. (1990). Chromatography Conferences, Inc. Provo, Utah.

Lemmens L., Tchuenche E.S., Van Loey A., Hendrickx M. Beta-carotene isomerisation in mango puree as influenced by thermal processing and high-pressure homogenisation. European Food Research and Technology. (2013). 236. 155-163.

Li Y., Fabiano-Tixier A.S., Tomao V., Cravotto G., Chemat F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. Ultrasonics Sonochemistry. (2013). 20. 12-18.

Lin C.H., Chen B.H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. Journal of chromatography A. (2003). 1012. 103-109.

Lin C.H., Chen B.H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. Food chemistry. (2005). 90. 837-846.

Lineau A., Glaser T., Tang G., Dolnikowski G.G., Grusak M.A., Albert K. Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. Journal of Nutritional Biochemistry. (2003). 11. 663-670.

Liu H.L., Chen B.H., Kao T.H., Shiau C.Y., carotenoids composition in Scultellaria barbata D.Don as detected by high performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry-atmospheric pressure chemical ionization. Journal of Functional Foods. (2014). 8. 100-110.

Lu J., Feng X., Han Y., Xue C. Optimization of supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from Laminaria japonica aresch by response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture. (2013). 94. 139-145.

Luque de Castro M.D, Priego-Capote F. Soxhlet extraction : Past and present panacea. Journal of chromatography A. (2010). 1217. 2383-2389.

Luterotti S., Franko M., Bicanic D. Ultrasensitive determination of β-carotene in fish oil-based supplentary drugs by HPLC-TLS. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis. (1999). 21. 901-909.

Luterotti S., Sikovec M., Bicanic D. Ultrasensitive determination of trans-β-carotene in rat and beef livers by means of high-performance liquid chromatography coupled with thermal lens detection. Talanta. (2000). 53. 103-113.

Machmudah S., Goto M. Methods for extraction and analysis of carotenoids. (2013). K.G Ramawat, J.M. Mérllion (eds). Natural products. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Machmudah S., Kawahito Y., Sasaki M., Goto M. Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical $CO_2$. Journal of Supercritical Fluids. (2008). 44. 308-314.

Macias-Sanchez M.D., Mantell C., Rodriguez M., Martinez de la Ossa E., Lubian L.M., Montero O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina. Talanta. (2009). 77. 948-952.

Mahhou A., Aziz A., Ayello M. Modes de conduite du pêcher (Prunus persica L.) cv : July Lady. Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc). (1996). 16(3). 23-35.

Manzoor M., Anwar F., Mahmoud Z., Rashid U., Ashraf M. Variation in minerals, phenolics and antioxidant activity of peel and pulp of different varieties of peach (prunus persica L.) fruit from Pakistan. Molecules. (2012). 17. 6491-6506.

Maoka T., Etoh T., Kishimoto S., Sakata S. Carotenoids and their fatty acid esters in the petals of Adonis aestivalis. Journal of Oleo Science. (2011). 60. 47-52.

Maoka T., Ochi J., Mori M., Sakagami Y. Identification of carotenoids in the freshwater shellfish unio douglasiae nipponensis, anodonta lauta, Cipangopaludina chinensis latea, and semisulcospira libertina. Journal of Oleo Science. (2012). 61. 69-74.

Martin A. Cocero M.J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. Advanced Drug Delivery Reviews. (2008). 60. 339-350.

Massias A., Boisard S., Baccaunaud M., Calderon F.L., Subra-Paternault P. Recovery of phenolics from apple peels using $CO_2$ + ethanol extraction: Kenetics and antioxidant actvity of extracts. The Journal of Supercritical Fluids. (2015). 98. 172-182.

Matsumoto H., Ikoma Y., Kato M., Kuniga T., Nakajima N., Yoshida T. Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparaison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2007). 55. 2356-2368.

Mattea F., Martin A., Cocero M.J. Carotenoid processing with supercritical Fluids. Journal of Food Engineering. (2009). 93. 255-265.

Mdellel L. and Ben Halima M. K. Aphids on almond and peach: preliminary results about biology areas of Tunisia. Redia, XCV. (2012). 3-8.

Mehlenbacher S.A., Cociu V.Hough L.F. Apricots (Prunus), in genetic resources of temperate fruit and nut crops. Acta Hort. (1990). 290. 65-107.

Meizoso I.R., Jaime L., Santoyo S., Cifuentes A., Garcia-Blairsy Reina G., Senorans F.J., Ibanez E. Pressurized fluid extraction of bioactive compounds from Phormidium species. Journal of agricultral and food industry. (2008). 56. 3517-3523.

Meléndez-Martinez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J. Review. Analysis of carotenoids in orange juice. Critical review. (2007). 20. 638-649.

Meléndez-Martinez A. J., Britton G., Vicario I. M., Heredia F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. Food chemistry. (2007). 101. 1145-1150.

Melendez-Martinez A.J., Vicario I.M., Heredia, F.J. A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003). 51. 4219-4224

Mendes R.L., Fernandez H.L., Coelho J.P., Reis E.C., Cabral J.M.S., Novais J.M., Palavra A.F. Supercritical $CO_2$ extraction of carotenoids and other lipids from Chorella vulgaris. Food Chemistry. (1995). 53. 99-103.

Mendes R.L., Nobre B.P., Coehlo J.O., Palavra A.F. Solubility of β-carotene in supercritical carbon dioxide and ethane. Journal of Supercritical Fluids. (1999). 16. 99-106.

Mendes R.L., Nobre B.P., Cardoso M.T., Pereira A.P., Palabra A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. Inorganica Chimica Acta. (2003). 356. 328-334.

Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. Use of compressed fluids for sample preparation : Food applications. Journal of chromatography A. (2007). 1152. 234-246.

Mesomo M.C., Corazza M.L., Ndiaye P.M., Dalla Santa O.R., Cardozo L., De Paula Scheer A., Supercritical $CO_2$ extracts and essential oil of ginger (Zingiber officinale R.) : Chemical composition and anti bacterial activity. The Journal of Supercritical fluids. (2013). 80. 44-49.

Messer D.C., Davies G.R., Rosselli A.C., Prance C.G., Algaier J.W. Supercritical fluid extraction instrumentation. In Analytical supercritical fluid extraction techniques. (1998). E.D. Ramsey (ed). Kluwer Academic Publichers.

Mezzomo N., Maestri B., Lazzaris dos Santos R., Maraschin M., R.S Ferreira S. Pink shrimp (P. brasiliensis and P. paulensis) residue : influence of extraction method on carotenoid concentration. Talanta. (2011). 85. 1383-1391.

Mezzomo N., Martinez J., Ferreira S.R. Supercritical fluid extraction of peach (Prunus persica) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. The Journal of Supercritical Fluids. (2009). 51 .10-16.

Mezzomo N., Martinez J., Maraschin M., R.S. Ferreira S. Pink shrimp (P. brasiliensis and P. paulensis). Residue : Supercritical fluid extraction of carotenoid fraction. The Journal of Supercritical Fluids. (2013). 74. 22-33.

Milosevic T., Milosevic N., Glisic I., Mladenovic J., Fruit quality, phenolics content and antioxidant capacity of new apricot cultivars from Serbia. Acta Sci Pol., Hortorum Cultus. (2012). 11 (5). 3-15.

Mira B., Blasco M., Subirats S. Supercritical $CO_2$ extraction of essential oil from orange peel. Journal of Supercritical Fluids. (1996). 9. 238-243.

Mira B., Blasco M., Berna A., Subirats S. Supercritical $CO_2$ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on extract composition. Journal of Supercritical Fluids. (1999). 14. 95-104.

Mitra P., Ramaswamy H.S., Chang K.S. Pumpkin (Cucurbita maxima) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. Journal of Food Engineering. (2009). 95. 208-213.

Montevecchi G., Simone G. V., Masino F., Bignami C., Antonelli A. Physical and chemical characterization of Pescabivona, a Sicilian white flesh peach cultivar [Prunus persica (L) Batch]. Food Research International. (2012). 45. 123-131.

Moretti V.M., Mentasti T., Bellagamba F., Luzzana U., Caprino F., Turchini G.M., Giani I., Valfrè F. Food additives and contaminants. (2006). 23 (11). 1056- 1063.

Murkovic M., Mülleder U., Neunteufl H. Carotenoids content in different varieties of pumpkins. Journal of Food Composition and Analysis. (2002). 15. 633-638.

Mustafa A., Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approch in food and herbal plants extraction: A review. Analytica Chimica Acta. (2011). 703. 8-18.

Mustafa A., Tervino L.M., Turner C. Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. Molecules. (2012). 17. 1809-1818.

Nang Lau H.L., Choo Y.M., Ma A.N. , Chuah C.H. Selective extraction of palm carotene and vitamin E from fresh palm-pressed mesocarp fiber (Elaeis guineensis) using supercritical $CO_2$. Journal of Food Engineering. (2008). 84. 289-296.

Nicoletia J.F., Silveira-Jra V., Telis-Romero J., Telis V.R.N. Viscoelastic behavior of persimmons dried at constant air temperature. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. (2005). 38. 143–150.

Nobre B., Marcelo F., Passos R., Beirao L., Palabra A., Gouveia L., Mendes R. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalgae *Haematococcus pluvialis*. European Food Research and Technology. (2006). 223. 787-790.

Nobre B.P., Palavra A.F., Pessoa F.L.P., Mendes R.L. Supercritical $CO_2$ extraction of trans-Lycopene from Portuguese tomato industrial waste. Food Chemistry. (2009). 116. 680-685.

Oliveira A., Pintado M., Almeida D. P.F. Phytochemical compostion and antioxidant activity of peach as affected by pasteurization and storage duration. LWT Food Science and Technology. (2012). 49. 202-207.

Ollanketo M., Hartonen K., Riekkola M.L., Holm Y., Hiltunen R. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene from tomato skins. Eur Food Res Technol. (2001). 212. 561-565.

Orhan I. E., and Kartal M. Insights into research on phytochemistry and biological activities of Prunus armeniaca L. (apricot). Food Research International. (2010). 44. 1238-1243.

Osawa A., Ishii Y., Sasamura N., Morita M., Kasai H., Maoka T., Shindo K. Characterization and antioxidative activities of rare $C_{50}$ carotenoids-Sarcinaxanthin, Sarcinaxanthin monoglucoside, and Sarcinaxanthin diglucoside obtained from Micrococcus Yunnanensis. Jounal of Oleo Science. (2010). 59. 653-659.

Özkal .G., Yener M.E., Bayindirli L. Mass transfer modeling of apricot kernel oil extraction with supercritical carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids. (2005). 35. 119-127.

Papamichail I., Louli V., Magoulas K. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. Journal of Supercritical Fluids. (2000). 18. 213-226.

Park Y.S., Jung S.T., Kang S.G., Delgado-Licon E., Martinez Ayala A.L., Tapia M.S., Martin-Belloso O., Trakhtenberg S., Gorinstein S. Drying of persimmons (Diospyros kaki L.) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities. LWT-Food Science and Thechnology. (2006). 39. 748–755.

Pascual, M., Mallent, D., Cunat, P. Estudio de los carotenoids de naranja cv, Navelina. Revista Espanola de Ciencia Y Tecnologia de Alimentos. (1993). 33. 179-196.

Passos C.P., Silva R.M., Da Silva F.A., Coimbra M.A., Silva C.M. Enhancement of supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. The Journal of Supercritical Fluids. (2009). 48. 225-229.

Passos C.P., Silva R.M., Da Silva F.A., Coimbra M.A.,Silva C.M. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant activity. Chemical Engineering Journal.(2010).160.634-640.

Patel R.N., Bandyopadhyay S., Ganesh A. extraction of cashew (Anacardium occidentale) nut shell liquid using supercritical carbon dioxide. Bioresource Technology. (2006). 97. 847-853.

Pereira C.G., Angela M., Meireless A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. Food Bioprocess Technol. (2010). 3. 340-372.

Plaza M., Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. Innovative natural fonctional ingredients from microalgae. Journal of Agricultural Food Chemistry. (2009). 57. 7159-7170.

Prado J.M., Veggi P.C., Meireles M.A.M. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables-Review. Current Analytical Chemistry. (2014). 10. 29-66.

Quan C., Turner C. Extraction of astaxanthin from shrimp waste using pressurized hot ethanol.Chromatographia. (2009). 70.247-251.

Radi M., Mahrouz M., Jaouad A., Tacchini M., Aubert S., Hugues M., Amiot M. J. Phenolic composition, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. HortiScience. (1997). 32 (6). 1087-1091.

Rao A.V., Rao L.G. Carotenoids and human health. Pharmacological Research. (2007). 55. 207-216.

Reverchon E., De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. Journal of Supercritical Fluids. (2006). 38. 146-166.

Reverchon E., Marrone C. Modeling and simulation of the supercritical $CO_2$ extraction of vegetable oils. Journal of Supercritical Fluids. (2001). 19. 161-175.

Reverchon E., Taddeo R. Extraction of sage oil by supercritical $CO_2$ : Influence of some process parameters. Journal of Supercritical Fluids. (1995). 8. 302-309.

Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C. Accelerated solvent extraction : a technique for sample preparation. Analytical Chemistry. (1996). 68 (6). 1033-1039.

Rivera S.M., Canela-Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. Journal of chromatography A. (2012). 1224. 1-10.

Rodriguez-Amaya D. B, Kimura, M. (2004). HarvestPlus handbook for carotenoids analysis. HarvestPlus technical monograph 2. Washington. DC. Cali : International Food Policy Research Institut (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

Rodriguez-Amaya D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in food ($1^{st}$ ed). Washington: International Life Science Institute Press.

Rodriguez-Amaya D.B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxydant activity of food carotenoids-A review. Journal of Food Composition and analysis. (2010). 23. 726-740.

Rodriguez-Amaya D.B., Rodriguez E. B., and Amaya-Farfan J. Advances in food carotenoids research: chemical and technological aspects, implications in human health. Mal J Nutr. (2006). 12 (1). 101-121.

Rostagno M.A., Araujo J.M.A., Sandi D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section. (2002). 78. 111-117.

Rozzi N.L., Singh R.K., Vierling R.A. Watkins B.A. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2002). 50. 2638-2643.

Ruiz D., Egea J.,Tomas-Barberan F.A., Gil M. Carotenoids from new apricot (Prunus armeniaca L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2005). 53. 6368-6374.

Safia Belhadj. The peach industry in Algeria: state of art, resarch and development. 1st Mediterranean Peach Symposium. (2003). Agrigento. Italy.

Saha S., Walia S., Kundu A., Sharma K., Paul R.K. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Food chemistry. (2015). 177. 369-375.

Saldana M.D.A., Sun L., Guigard S.E., Temelli F. Comparaison of the solubility of β-carotene in supercritical $CO_2$ based on a binary and a multicomponent complex system. Journal of Supercritical Fluids. (2006). 37. 342-349.

Saldana M.D.A., Temelli F., Guigard S.E., Tomberli B.,Gray C.G. Apparent solubility of lycopene and β-carotene in supercritical $CO_2$, $CO_2$ + ethanol and $CO_2$ +canola oil using dynamic extraction of tomatoes. Journal of Food Engineering. (2010). 99. 1-8.

Salgin U., Salgin S. Effect of main process parameters on extraction of pine kernel lipid using supercritical green solvents: Solubility models and lipid profiles. The Journal of Supercritical Fluids. (2013). 73. 18-27.

Sanagi M.M., See H.H., Wan Ibrahim W.A., Abu Naim A. Determination of carotene, tocopherols and tocotrienols in residue oil from palm pressed fiber using pressurized liquid extraction-normal phase liquid chromatography. Analytica chimica Acta. (2005). 538. 71-76.

Sanal I. S., Güvenç A., Salgin U., Mehmetoglu U., Çalimli A. Recycling of apricot pomace by supercritical $CO_2$ extraction. Journal of supercritical fluid. (2004). 32. 221-230.

Sanal I. S., Bayraktar E., Mehmetoglu U., Çalimli A. Determination of optimum conditions for SC-($CO_2$+ethanol) extraction of β-carotene from apricot pomace using response surface methodology. Journal of supercritical fluid. (2005). 34. 331-338.

Sanchez-Vicente Y., Cabanas A., Renuncio J.A.R., Pando C. Supercritical fluid extraction of peach (Prunus persica) seed oil using carbon dioxide and ethanol. The Journal of Supercritical Fluids. (2009). 49. 167-173.

Sander L.C., Sharpless K.E., Craft N.E., Wise S.A. Development of engineered stationary phases for separation of carotenoid isomers. Analytical Chemistry. (1994). 66. 1667-1674.

Saracoglu S., Tuzen M., Soylak M. Evaluation of trace element contents of dried apricot samples from Turkey. Journal of Hazardous Matrerials. (2009). 167. 647- 652.

Schmitz H.H., Artz W.E., Poor C.L., Dietz J.M., Erdman Jr., J.W. High-performance liquid chromatography and capillary supercritical-fluid chromatography separation of vegetable carotenoids and carotenoid isomers. Journal of Chromatography. (1989). 479. 261-268.

Shahidi F., Metusalach, Brown J.A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. (1998). 38 (1). 1-67.

Shi J., Yi C., Xue S.J., Jiang Y., Ma Y., Li D. Effets of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical $CO_2$. Journal of Food Engineering. (2009). 93. 431-436.

Shi J., Yi C., Ye X., Xue S., Jiang Y., Ma Y., Liu D. Effets of supercritical $CO_2$ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. Food Science and Technology. (2010). 43. 39-44.

Shinichi Takaichi. Carotenoids in algea: distributions, biosyntheses and functions. Mar Drugs. (2011). 9. 1101-1118.

Sivathanu B., Palaniswamy S. Purification and characterization of carotenoids from green algae Chlorococcum humicola by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. Biomedicine & Preventive Nutrition. (2012). 2. 276-282.

Solis-solis H.M., Calderon-Santoyo M., Gutierrez-Martinez P., Schorr-Galindo S., Ragazzo-Sanchez J. A. Discrimination of eight varieties of apricots (Prunus armeniaca) by electronic nose, LLE and SPME using G-C-MS and mumtivariate analysis. Sensors and Actuators B. (2007). 125. 415-421.

Sovova H., Stateva R.P., Galushko A.A. Solubility of β-carotene in supercritical $CO_2$ and the effect of entrainers. Journal of Supercritical Fluids. (2001). 21. 195-203.

Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular aspects of medicine. (2003). 24. 345-351.

Stange C., Flores C. (2012). Carotenoids and Photosynthesis-Regulation of carotenoid Biosynthesis by photoreceptors, Advances in Photophsynthesis-Fundamental Aspects. ISBN: 978-953-928-8.

Stewart I., Wheaton T.A. Conversion of β-citraurin to reticulataxanthin and β-apo-8'-carotenal to citranaxanthin during the isolation of carotenoids from citrus. Phytochemistry. (1973). 12. 2947-2951.

Strati I.F., Oreopoulou V. Process optimisation for recovrey of carotenoids from tomato waste. (2011). Food Chemistry. (2011). 129. 747-752.

Strati I.F., Oreopoulou V. Recovery of carotenoids from tomato processing by-products-a review. Food research International. (2014). 65. 311-321.

Su Q., Rowley K.G., Balazs N.D.H. Carotenoids : separation methods applicable to biological samples. Journal of chromatography A. (2002). 781. 393-418.

Subra P., Castellani S., Jestin P., Aoufi A. Extraction of β-carotene with supercritical fluids experiments and modelling. Journal of Supercritical Fluids. (1998). 12. 261-269.

Sun M., Temelli F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. Journal of Supercritical Fluids. (2006). 37. 397-408.

Suzuki T., Someya S., Hu F., Tanokura M. Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (Diospyros kaki). Food Chemistry. (2005). 93. 149–152.

Telis V.R.N., Gabas A.L., Menegalli F.C., Telis-Romero J. Water sorption thermodynamic properties applied to persimmon skin and pulp. Thermochimica Acta. (2000). 343. 49-56.

Ting S.V., Rouseff R.L. (1986). Citrus Fruits and their Products. Marcel Dekker.

Tomita K., Machmudah S., Quitain A.T., Sasaki M., Fukuzato R., Goto M. Extraction and solubility evaluation of functional seed oil in supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids. (2013). 79. 109-113.

Tsao R., Deng A. Separation procedures for naturally occuring antioxidant phytochemicals. Journal of chromatography B. (2004). 812. 85-99.

Uzelac V. D, Pospisil J., Levaj B., Delonga K. The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity. Food Chemistry. (2005). 91. 373-383.

Uzelac V. D., Levaj B., Mrkic V., Bursac D., Boras M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. Food Chemistry. (2007). 102. 966-975.

Vaji E., Simandi B., Vasarhelyine K.P., Daood H., Kéry A., Doleschall F., Nagy B. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from indistrial tomato by-products. Journal of Supercritical Fluids. (2007). 40. 218-226.

Vaughn Katherine L.S., Edgar C.C., Jerry W.K., Luke R.H., Julie C.D. Extraction conditions affecting supercritical fluid extraction (SFE) of lycopene from watermelon. Bioresource Technology. (2008). 99. 7835-7841.

Vavilov N.I. (1992). Origin and geography of cultivated plants (tr.L. Storr-best), CUP, Cambridge, UK.

Veberic R., Jurhar J., Mikulic-Petkovsek M., Stampa F.r, Schmitzer V. Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (Diospyros kaki L.). Food Chemistry. (2009).

Veggi P.C., Cavalcanti R.N., A.Meireless M.A. Modifier effects on supercritical fluid extraction (SFE) of some Brazilian plants: Antioxidant activity and economical evaluation. Procedia Food Science. (2011). 1. 1717-1724.

Weathers R.M., Beckholt D.A., Lavella A.L., Danielson N.D. Comparaison of acetals as in situ modifiers for the supercritical fluid extraction of β-carotene from paprika with carbon dioxide. J.Liq. Chrom & Rel. Technol. (1999). 22 (2). 241-252.

Wu Z., Wu S., Shi X. Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Food process engineering. (2007). 30. 174-185.

Yamagishi M., Matsumoto S., Nakatsuka A., Itamura H. Identification of persimmon (Diospyros kaki) cultivars and phenetic relationships between Diospyros species by more effective RAPD analysis. Scientia Horticulturae. (2005). 105. 283–290.

Yokozawa T., Kim Y.A., Kim H.Y., Lee Y.A., Nonaka G. Protective effect of persimmon peel polyphenol against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. Food and Chemical Toxicology. (2007). 45. 1979–1987.

Zalepugin D.Y., Tilkunova N.A., Chernyshova I.V., Mishin V.S., Mulyukin A.L. Application of supercritical fluid extraction to the development of new potential on the basis of garlic (Allium sativum L.). Russian Journal of Physical Chemistry. (2010). 4(7). 1103-1111.

Zhao L., Chen G., Zhao G., Hu X. Optimisation of microwave-assisted extraction of astaxanthin from haematococcus pluvialis by response surface methodology and antioxidant activities of the extracts. Separation science and technology. (2009). 44. 243-262.

Zuo Y.B., Zeng A.W., Yuan X.G., Yu K.T. Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous mesthanol modified supercritical carbon dioxide. Journal of Food Engineering. (2008). 89. 384-389.

# Chapitre II : La Thérapie photodynamique (PDT) et les caroténoïdes en PDT

# II Contexte général

## II.1 Histoire du cancer

L'histoire du cancer est bien plus ancienne que certains le pensent. La relation entre le cancer et les caractéristiques génétiques de l'hôte est un peu complexe, due aux conditions environnementaux et les caractéristiques de la population humaine qui ont changé à travers l'histoire *(Capasso, 2005).*

Des analyses paléo-pathologiques de restes pré-humains et de restes anciens, ainsi que de fossiles, ont permis de tracer l'existence du cancer dans l'antiquité, avant même l'apparition de l'espèce humaine. Ces observations restent cependant sujettes à controverse. La première hypothèse concerne la présence de néoplasme dans un fossile de *Dinichthys* (un poisson pacoderme) qui revient à l'ère primaire datant de 350 millions d'années. La présence d'une tumeur a été décelée en découvrant une lésion au niveau de la mâchoire inférieure du *Dinichthys*. Le Dinichthys ou le poisson placoderme, d'une façon générale, représente l'une des premières espèces de vertébrés apparue sur terre. Une autre observation, effectuée sur le fossile d'un poisson, le *Phanerosteon mirabile*, datant d'environ 300 millions d'années, a montré une hyperostose focale. Les observations effectuées sur des fossiles datant de l'ère paléozoïque montrent ainsi que le néoplasme est bien présent chez les vertébrés aquatiques. D'autres confirmations ont été rapportées sur des fossiles d'un reptile de mosasaure de l'ère Jurassique et de Crétacé, qui présente un ostéome au niveau d'une vertèbre, ainsi que chez d'autres reptiles de la même espèces, *Platecarpus sp*, et le *Pachyrhinosaurus (Capasso, 2005)( Ming-Tu, 2010), (Olszewski, 2010)*.

L'hyperostose focal a été observée chez les dinosaures datant de l'âge du Jurassique et du Crétacée. Un cas de métastase bien documenté est celui observé chez un dinosaure théropode *(Allosaurus fragilis),* au niveau de l'un de ces humérus: une large masse osseuse a été découverte autour d'un os sain, et ce cas a été interprété comme un chondrosarcome (une tumeur maligne du cartilage). Le traçage de la présence des tumeurs à travers les espèces vivantes sur des millions de fossiles a permis ainsi de détecter des cas de néoplasmes chez des animaux (mammifères, vertébrés aquatiques,…) durant les ères ternaire et quaternaire *(Capasso, 2005)*.

Le premier vrai cas de néoplasme observé par des paléo-pathologistes chez l'être humain à été découvert chez un *Homo erectus* nommé *Kanam mandible* le 29 mars 1932, au Kenya, qui date d'environ 1,5 millions d'années (Figure II.1). La région symphysaire présentant une croissance pathologique anormale et cette lésion a été attribuée à un possible lymphome de Burkitt's ou à un sarcome osseux. Cependant, d'autres chercheurs ont attribué cette lésion à une surabondance osseuse suivie d'une fracture *(Capasso, 2005)(Tu, 2010)(Olszewski, 2010)*.



Figure II.1 : Reste de Kanam mandible.

Un autre reste fossilisé appartenant à un *Homo erectus* (appelé Java man) a été trouvé en Indonésie, datant d'environ 500000 années et présente une croissance au niveau de l'os postérieur du fémur gauche, attribuée à un début de prolifération osseuse (Figure II.2.) *(Tu, 2010)(Olszewski, 2010)( David & Zimmerman, 2010)(Capasso, 2005)*.



Figure II.2 : Reste fossilisé de Java Man.

Une tumeur a été découverte après une étude sur des milliers d'os fossilisés appartenant à l'homme de Néandertal en Europe par des anthropologistes, qui ont identifié une lésion au niveau d'un os pariétal datant d'environ 35000 années BP sur le site de Stetten II en Allemagne. Cette lésion a été attribuée à un méningiome (tumeur cérébrale) *(Tu, 2010)(Olszewski, 2010)(Capasso, 2005)*.

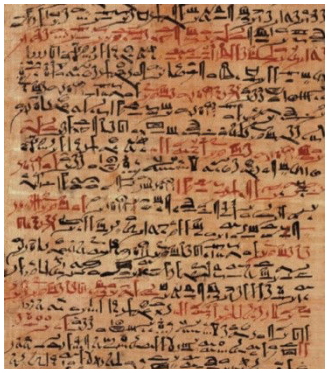
Les travaux et les recherches des archéologues et des paléontologues sur des restes fossilisés humains ou animaux n'ont pas été le seul chemin pour tracer l'étendue du cancer à travers le temps, l'apparition de l'écriture à rendu cette tâche plus facile. En effet, le plus vieux texte décrivant à cette époque le cancer date de 1600 année avant J.C, alors que les traitements médicaux étaient un mélange de magie et de religion *(Olszewski, 2010)(Tu, 2010)*. Cette ancienne référence au cancer a été citée dans le Papyrus de Edwin Smith, dans le quel le sens hiéroglyphique du terme tumeur de la poitrine a été dépeint (Figure. II.3).



Figure II.3 : Sens hiéroglyphique du terme tumeur *(Tu, 2010)*.

Deux types de traitements tumoraux étaient réalisés à cette époque : pour une tumeur chaude et rouge, l'élimination était assurée par cautérisation utilisant du fer rouge, tandis que pour une tumeur froide, non purulente, aucune intervention n'était prévue *(Olszewski, 2010)*. Un grand nombre de traitements est décrit dans le papyrus de George Ebers (Figure. II.4) qui date d'environ 1550 av. J.-C. Ce papyrus contient environ 876 remèdes médicaux et 500 substances pour le traitement des maladies. Un cas intéressant est celui décrit pour traiter le cancer de l'utérus, approche palliative consistant à insérer un mélange de dattes dans le vagin *(Olszewski, 2010)*.

La confirmation de la présence du cancer pendant cette période est apparue vers 2006 lorsqu'environ 39 tumeurs malignes ont été identifiées dans des restes de squelettes egyptiens datant de différentes périodes.



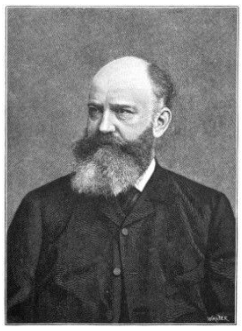


Figure II.4 : A gauche le Papyrus de George Ebert, à droite George Ebert.

La première différenciation entre tumeur bénigne et maligne a eu lieu pendant la période gréco-romaine (460-370 av. J.-C). Hippocrate le physicien grecque, considéré comme le père de la médecine, est le premier qui a clairement identifié la différence entre les tumeurs bénignes et malignes. Hippocrate a remarqué que les vaisseaux sanguins entourant une tumeur maligne ressemblent aux griffes de crabe, d'où l'attribution du terme *Karkinos* (en grecque crabe) afin de décrire ces tumeurs, la traduction de ce terme en anglais deviendra ensuite *carcinos* ou *carcinoma (Tu, 2010)*.

Les dix-sept livres écrits par Hippocrate de Cos et autres physiciens, connus comme le *Corpus hippocratum*, sont les premiers textes dans lesquels sont utilisés les termes *Karkinos* ou *karkinoma* pour décrire une forme de grosseur inguérissable. Hippocrate a aussi utilisé le terme '*schirrus* ' pour décrire les tumeurs difficiles à traiter *(Olszewski, 2010).*

Les grecs ont préconisé des interventions chirurgicales dans le cas de tumeurs superficielles alors que ces interventions n'étaient pas recommandées dans le cas des tumeurs oculaires *(David & Zimmerman, 2010).* Certaines tumeurs devraient être traitées par des onguents externes, faits à partir de cuivre, plomb, soufre ou d'arsénique, ainsi que d'autres produits naturels.

Pendant l'époque romaine, le savoir en médecine a été préservé par Aulus Cornelius Celsus (25 avant J.C- 50 après J.C) un encyclopédiste médical qui écrit un texte *De Medicina,* décrivant le cancer et son traitement. D'après Celsus, les tumeurs cancéreuses sont difficiles à traiter et c'est pour cette raison qu'il faut utiliser la médecine caustique dès qu'elles apparaissent *(Olszewski, 2010).*

Pendant le deuxième siècle, les travaux d'Hippocrate ont été repris par Claudius Galen (129 après J.C-199 après J.C), qui a utilisé pour la première fois le terme cancer dans ses textes, du latin *« cancrum* ». Il a aussi introduit le terme « *sarcoma* » pour décrire les tumeurs qui présentaient une apparence transversale. Galen a repris le concept décrit par Hippocrate en l'affinant, par la classification des tumeurs en trois types majeurs *(Olszewski, 2010)(Tu, 2010).*

- Tumores secundum naturam (selon la nature des tumeurs, ex : croissance des seins pendant la puberté),
- Tumores supra naturam (tumeurs dessus de la nature ex : abcès et inflammations),
- Tumores praeter naturam (tumeurs au-delà de la nature).

Après la chute de l'empire Romain en 476 après J.C, la médecine a connu une stagnation pendant le moyen âge (500 - 1400 après J.C). Cette période a été caractérisée par le retour aux sorts magiques et autres superstitions qui ont dominé la médecine du temps des Pharaons.

Ce n'est qu'à la fin du moyen âge qu'il y eu un retour à l'utilisation du terme cancer pour décrire différents sorte de gangrènes, tumeurs, abcès… avec Guy de Chauliac (1300-1370), le chirurgien français qui définit le cancer comme « une tumeur dure, vascularisée et de forme arrondie de couleur foncée, et qui présente une croissance rapide ».

Pendant le 17$^{ème}$ et le 18$^{ème}$ siècle, la théorie de la lymphe a été proposée par René Descartes (1596-1650) suivie par Henry François le Dran (1685-1770), expliquant que la prolifération de certains cancers ne se fait pas par l'intermédiaire des humeurs mais par le système lymphatique. Plusieurs travaux du physicien anglais John Hill (1761) et Giovanni Battista Morgagni (1761) ont été réalisés sur le cancer du sein, de l'estomac, du rectum et du pancréas basés sur des résultats compilés à partir de 700 autopsies *(Olszewski, 2010).* Ce n'est que pendant le 19$^{éme}$ siècle que les physiciens et les

scientifiques ont commencé à étudier intensivement et systématiquement le cancer, profitant de l'invention du microscope par van Leeuwenhoek fin du 17$^{éme}$ siècle. Le chirurgien-pathologiste Français Marie François-Xavier Bichat décrit l'anatomie de plusieurs néoplasmes et suggère qu'ils sont dûs à une formation accidentelle de membranes ou de tissus au niveau des organes. Son travail a été étendu par Johannes Müller utilisant le microscope, démontrant que les tissus du cancer sont formés de cellules *(Tu, 2010).*

L'étudiant de Müller Rudolf Virchow (1821-1902), un physicien pathologiste désapprouva les résultats de Müller et stipula que la cellule est la petite unité à partir de laquelle la maladie doit être localisée, et que le cancer est localisé dans la cellule et non dans des fibres ou des fluides corpulaires. En 1865, Karl Thiersch (1822-1925) désapprouva l'idée de Virchow en étudiant les métastases de tumeur épithéliale au niveau de la peau, et conclut que les cellules malignes des ganglions lymphatiques atteignent un site secondaire par embolie cellulaire *(Olszewski, 2010)*. Karl von Rokitansky (1804-1878) identifia les deux principaux composants cellulaires du cancer qui détermine son type : la masse du cancer ou le parenchyme composé par le noyau et les cellules nucléées, et le stroma (le réseau conjonctif de support d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe). D'après Rokitansky, si le stroma est principalement fait de fibres, on parle d'un cancer fibreux tandis que si parenchyme prédominé, on parle d'un cancer médullaire ou gélatineux *(Olszewski, 2010)*. Les travaux de Müller, Virchow et Rokitansky, pendant le 19 $^{ème}$ siècle, ont construit la classification moderne des tumeurs utilisées dans la pathogenèse du cancer.

### II.1.1 Définition du cancer

Comme nous l'avons mentionné, le terme cancer, vient du mot latin "crabe". Il désigne une prolifération anormale de cellules. La totalité des tissus de l'organisme humain peut être affectée par un déséquilibre physiologique dont les causes sont multiples (tabagisme, organismes infectieux, produits chimiques, produits radiologiques…). On peut définir le cancer comme un groupe de maladies caractérisées par une prolifération anarchique de cellules anormales. Dans le cas où la propagation n'est pas contrôlée, elle peut entraîner la mort. Au niveau de l'organisme humain, les cellules (qui sont de l'ordre de 100 000 milliards) se multiplient et meurent suivant un équilibre mort/naissance, connu sous le terme "apoptose". Cependant, dans le cas des cellules cancéreuses, la prolifération se fait d'une façon anarchique et une série de mutations génétiques chez une cellule anormale provoque le processus de cancérisation. Ceci est traduit par une insensibilité à l'apoptose et une incapacité de réparation d'erreur au niveau de l'ADN, donc la cellule perd ses caractéristiques initiales et ses fonctions cellulaires. La cellule à l'origine du cancer va se multiplier d'une façon irrégulière et forme un amas de cellules qui va ensuite détruire les cellules normales voisines, et

envahir ensuite les tissus et les organes environnants. On parle alors de métastases (apparition des nouvelles tumeurs).

### II.1.2 Comment guérir le cancer?

Le traitement du cancer varie suivant la nature du cancer, son emplacements, son type ainsi suivant son stade. De nos jours, il existe différents stratégies pour le traitement du cancer:

- La chirurgie ou l'ablation. Cette stratégie est la première qui est appliquée ; elle consiste à enlever la masse tumorale et ses extensions,
- La radiothérapie : cette stratégie fait intervenir des rayons X, qui permettent d'irradier la tumeur afin de provoquer la mort cellulaire. Cette stratégie peut être utilisée avant l'exérèse d'une tumeur pour la destruction de la masse tumorale ou après pour détruire les cellules résiduelles,
- La chimiothérapie : il s'agit de l'administration par voie intraveineuse de substances (molécules) chimiothérapeutiques, ciblant la destruction des cellules néoplasiques qui présentent une croissance anarchique,
- L'immunothérapie : c'est une stratégie qui vise la stimulation des défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses,
- L'hormonothérapie : cette stratégie consiste à empêcher l'action stimulante des hormones sur les cellules cancéreuses souvent observé dans le cas du cancer du sein, cancer des ovaires et de prostate,
- Le traitement anti-angiogéniques : cette stratégie consiste à bloquer et inhibée les facteurs de croissance de la vascularisation tumorale,
- La thérapie photodynamique, que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.

## II.2 La thérapie photodynamique

### II.2.1 Rappel historique

#### *II.2.1.1 Photothérapie et photo-chimiothérapie*

Les effets thérapeutiques de la lumière ou la photothérapie sont connus depuis l'antiquité, l'utilisation de la lumière comme un agent thérapeutique revient à des milliers d'années. Elle a été utilisée depuis 3000 ans pendant l'ancien Egypte, l'Inde et la Chine pour traiter des maladies cutanées, comme le psoriasis, le vitiligo (maladie de l'épiderme), le cancer, le rachitisme et la psychose *(Aycord et al., 2001) (Moan & Peng, 2003)*.

Pendant le deuxième siècle avant J.-C, les grecs anciens utilisaient les rayons solaires dans le traitement des maladies par exposition du corps entier. Pendant les 18 ème et 19 ème siècles, c'est en France que les rayons solaires furent utilisés pour la première fois pour traiter la tuberculose, le rachitisme, le scorbut, le rhumatisme, la paralysie, l'œdème et la faiblesse musculaire. La photothérapie a été développé par le physicien Danois Niels Finsen qui a décrit le traitement pour la variole. En 1903, Finsen reçoit le Prix Nobel pour son travail sur le traitement du *lupus vulgaris,* une tuberculose cutanée en utilisant la lumière de l'arc au carbone *(Moan & Peng, 2003)(Aycord et al., 2001)*.

Cependant, les premiers cas d'utilisation de l'interaction molécule-lumière date depuis 1400 ans avant JC, mentionnée dans le livre indien sacré (*Atharva Veda*) décrivant comment les pépins de la *Psoralea corylifolia* qui contiennent des psoralènes (formes de coumarine), peuvent être utilisés pour traiter le vitiligo. La *Psoralea corylifoila* et l'*Ammi majus* (Figure II.5) qui poussent sur les bords du Nil, ont été utilisés par les Égyptiens pour traiter le vitiligo. En exposant le corps aux rayons solaires après ingestion de *l'Ammi majus*, un effet de dépigmentation artificielle est observé *(Pearl & Crimes, 1997) (Aycord et al., 2001)(Moan & Peng, 2003)*.



Figure II.5 : L'Ammi majus (à gauche), la Psoralea corylifolia et ses pépins (à droite).

### *II.2.1.2 Les premiers jours de la thérapie photodynamique*

Le concept de la PDT est connu depuis environ 100 ans. Les premiers travaux ont été publiés en allemand, français et Danois *(Aycord et al., 2001).*

Le terme « action photodynamique » ou « photodynamische Wirkung » a été introduit par le photobiologiste allemand, le Professeur Hermann von Tappeiner et son groupe, pour différencier les réactions photosynthétiques en biologie des processus physicochimiques qui se produisent dans les films photographiques *(Dougherty et al., 1998).*

L'histoire du groupe allemand commença par Oscar Raab, étudiant de Von Tappeiner. En 1900, Raab observa accidentellement que l'irradiation de paramécies par la lumière blanche en présence

d'acridine orange (Figure II.6) induisait la perte rapide de leur mobilité et de leur division. En effet, la mort de ces organismes unicellulaires intervient après une heure et demie d'exposition, alors qu'il faut attendre 15 heures pour le même résultat par temps orageux, donc couvert. Ceci l'a amené à penser que la lumière est nécessaire, en plus de l'acridine, pour détruire les paramécies. Après quelques années, il démontra par ailleurs le rôle primordial de l'oxygène dans l'effet photodynamique *(Aycord et al., 2001)(Moan & Peng, 2003)(Gannon & Brown, 1999)(Denis & Hamblin, 2013)*.

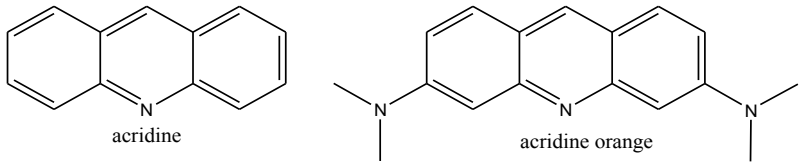



Figure II.6 : Structure chimique de l'acridine et l'acridine orange.

### *II.2.1.3 L'utilisation de l'éosine*

En même temps que Raab fait sa découverte en 1900, le neurologiste français Prime utilise l'éosine pour la première fois pour traiter l'épilepsie. Il découvre qu'après administration orale de l'éosine (Figure II.7), une dermatite apparaît à la surface de la peau après exposition aux rayons solaires. Cette découverte amena la première application médicale faisant intervenir un composé photosensible et la lumière *(Aycord et al., 2001) (Moan & Peng, 2003).*

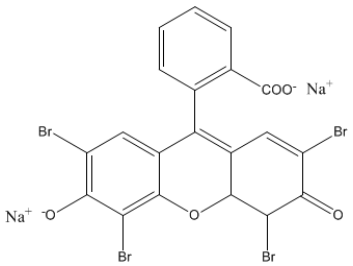
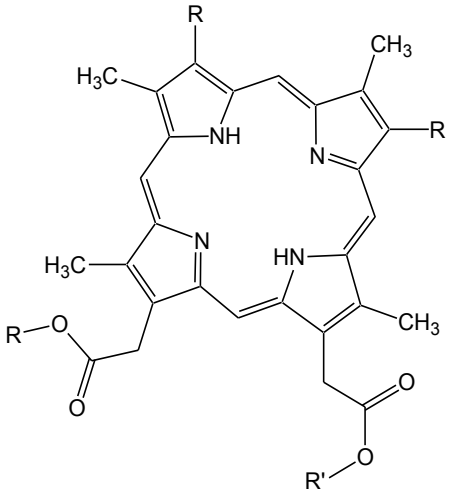



Figure II.7 : Structure chimique de l'éosine.

Dans les années 1903-1905, le groupe de Von Tappeiner étudia l'interaction molécule-lumière de plusieurs colorants : l'éosine, la fluorescéine, le di-chloro-anthracène et de disulfonate sodium pour traiter des tumeurs cancéreuses et d'autres maladies cutanées comme le lupus et les condylomes. *(Aycord et al., 2001) (Baltazar et al., 2015)(Dougherty et al., 1978)*.

### *II.2.1.4 L'hématoporphyrine et ces dérivées*

On peut dire que l'histoire de la PDT contemporaine a commencé avec l'hématoporphyrine (Figure II.8). Ce composé a été isolé sous forme impure par Scherer en 1841, par élimination du fer par attaque acide ($H_2SO_4$) d'un échantillon de sang séché suivie d'un traitement par l'alcool. En 1867, Thudichum décrit pour la première fois ses propriétés de fluorescence et Hoppe-Seyler lui attribue le nom d'hématoporphyrine (Hp) en 1871 *(Baltazar et al., 2015)(Aycord et al, 2001)(Moan & Peng, 2003)*.




I : R= $CH(OH)CH_3$ R'= H

II : R= $CH(OCH_3)CH_3$ R'= H

III : R= $CH(OH)CH_3$ R'= $CH_3$

IV : R=$CH(OCH_3)CH_3$ R'=C $H_3$

Figure II. 8 : Structure chimique d'un monomère de l'hématoporphyrine.

Il a fallu attendre la période 1908-1913 pour que l'hématoporphyrine soit testée en photobiologie, les premiers travaux étant réalisés par Hausmann. En 1911, il publia son premier rapport décrivant l'effet phototoxique de l'hématoporphyrine sur les paramécies chez des souris après administration et exposition à la lumière *(Hausmann, 1911)*.

La mise en évidence des résultats publiés par Hausmann sur l'effet photosensibilisateur de l'hématoporphyrine fut faite en 1913 par le docteur allemand Friedrich Meyer-Betz. Il démontra l'effet de l'hématoporphyrine (Hp) comme photosensibilisateur en s'injectant 200 mg de Hp, et en s'exposant aux rayons solaires. Il resta sensible à la lumière pendant deux mois (Figure II.9). Il observa divers symptômes (brûlures…) liés à une hypersensibilité à la lumière au niveau des surfaces de son corps *(Baltazar et al., 2015)(Aycord et al, 2001)(Moan & Peng, 2003)(Svanberg et al., 2010)*.

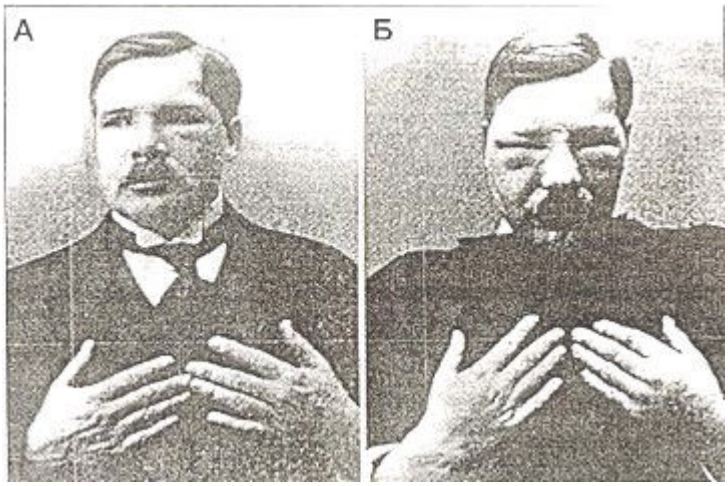



Figure II.9 : Photographie de Meyer-Betz à droite juste après injection, à gauche après diminution des symptômes d'hypersensibilité 5 jours après.

En 1924, Policard publia la tendance de ces molécules à s'accumuler au nivaux des tumeurs. Il utilisa une lampe de Wood pour détecter une fluorescence rouge d'un sarcome chez des rats après l'application de Hp *(Svanberg et al., 2010)(Baltazar et al., 2015)*.

Après les travaux de Policard, Auler et Banzer montrent que l'hématoporphyrines dans certaines tumeurs se situent au niveau de la peau, décrivant la localisation et la fluorescence des Hp après son administration dans des tumeurs malignes *(Aycord et al, 2001)(Moan & Peng, 2003)*.

Ces travaux ont servi à Figge et Weiland en 1948 à l'étude de la localisation des tumeurs. Ils ont montré qu'un certain nombre de porphyrines présentent une affinité non seulement pour les tissus néoplasiques, mais aussi pour les tissus embryonnaires chez les rats. Ils ont suggéré l'utilisation des porphyrines comme outil de diagnostic et de traitement des tumeurs chez l'homme *(Figgie & Witherman, 1955)*.

En 1955, Schwartz et ces collaborateurs montrent que l'hématoporphyrine commerciale est impure. Après purification, ils découvrent que la forme pure présente une faible sélectivité tumorale. Le traitement de l'Hp avec un mélange d'acide acétique et sulfurique donne alors de nouveaux composés qui présentent, eux, une forte sélectivité tumorale. Ces composés sont présentés comme les dérivés de l'hématoporphyrine (HpD) *(Gregorie et al., 1968)(Baltazar et al., 2015)(Aycord et al., 2001)(Moan & Peng, 2003)*.

Ce travail a été repris par Lipson et son groupe en 1960, et en 1967, Lipson et al., publièrent leurs travaux sur l'effet des HpD dans la détection du cancer *(Lipson et al., 1967)*. L'hématoporphyrine fut brevetée et ensuite commercialisée sous le nom de Photofrin® *(Philippe & Roberts, 2000)*. Elle est toujours utilisée de nos jours.

En 1972, Diamond et son équipe publièrent que l'hématoporphyrine activée par une lumière blanche provoque une diminution de la taille d'un gliome chez les rats. En 1975, Dougherty et son équipe administrèrent de l'HpD chez des rats activés par de la lumière rouge. En 1978, la même équipe réalisa les premiers essais chez l'homme, en utilisant l'HpD et la lumière rouge sur 113 tumeurs cutanées et sous-cutanées *(Figgie & Witherman, 1955)(Aycord et al., 2001)(Dougherty et al., 1978)*.
En 1985, la présence de l'oxygène singulet dans le mécanisme de la PDT en présence de HpD fut confirmée par Moan et Sommer, en étudiant la photo-activation des cellules à différentes concentrations en oxygène *(Moan & Sommer, 1985)*.
En 1993, le Photofrin® fut le premier photosensibilisateur approuvé pour des usages cliniques au Canada suivit par autres pays *(Baltazar et al., 2015)*. Depuis, d'autres PS ont été approuvés pour des usages cliniques (Tableau II.1).

Tableau II.1 : Les photosensibilisateurs appliqués en traitement clinique *(Agostinis et al., 2011)*.

| Photosensibilisateur | Structure | Longueur d'onde (nm) | Approuvé | essais | Type de cancer |
|---|---|---|---|---|---|
| Photofrin (HPD) | **Porphyrine** | 630 | Monde entier | | **Poumon, œsophage, voie biliaire, Vessie, cerveau, ovaire** |
| ALA | **Porphyrine précurseur** | 635 | Monde entier | | Peau, Vessie, cerveau, œsophage |
| ALA esters | **Porphyrine précurseur** | 635 | Europe | | Peau, Vessie |
| Temoporfin (Foscan) (mTHPC) | **Chlorine** | 652 | Europe | US | Poumon, peau, voie biliaire, cerveau, tête et cou, vessie |
| Verteporfin | **Chlorine** | 690 | Europe | UK | ophtalmique, pancréatique, peau |
| MPPH | **Chlorine** | 665 | Monde entier | US | Tête et cou, œsophage, vessie |
| SnEt2 | **Chlorine** | 660 | | US | peau, sein |
| Talaporfin (LS11, MACE, NPe6) | **Chlorine** | 660 | | US | Foie, côlon, cerveau |
| Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 dérivées (Radachlorin, Photodithazine | **Chlorine** | 660 | | Russie | cerveau, sarcome, |
| Silicon Phthalocyanine (Pc4) | **Phthalocyanine** | 675 | | US | Lymphome cutané à cellule T |
| Padofrin (TOOKAD) | **Bactériochlorine** | 762 | | US | Prostate |
| Motexafin lutetium (Lutex) | **Texaphirine** | 732 | | US | Sein |

## II.2.2 Principe de base

La thérapie photodynamique (PDT) (Figure II.10) fait intervenir trois composants clés : le photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène. Après administration du PS et un temps nécessaire

à une biodistribution adéquate (de l'ordre de quelques heures à deux jours), l'activation du PS est assurée par irradiation lumineuse à une longueur d'onde et une puissance données, menant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, les EROs, qui engendrent la destruction des tissus tumoraux par nécrose ou apoptose *(Splanger et al., 2008)(Thomas et al, 1998)(Oleinick et al., 2001)(Huang et al., 2013)*.

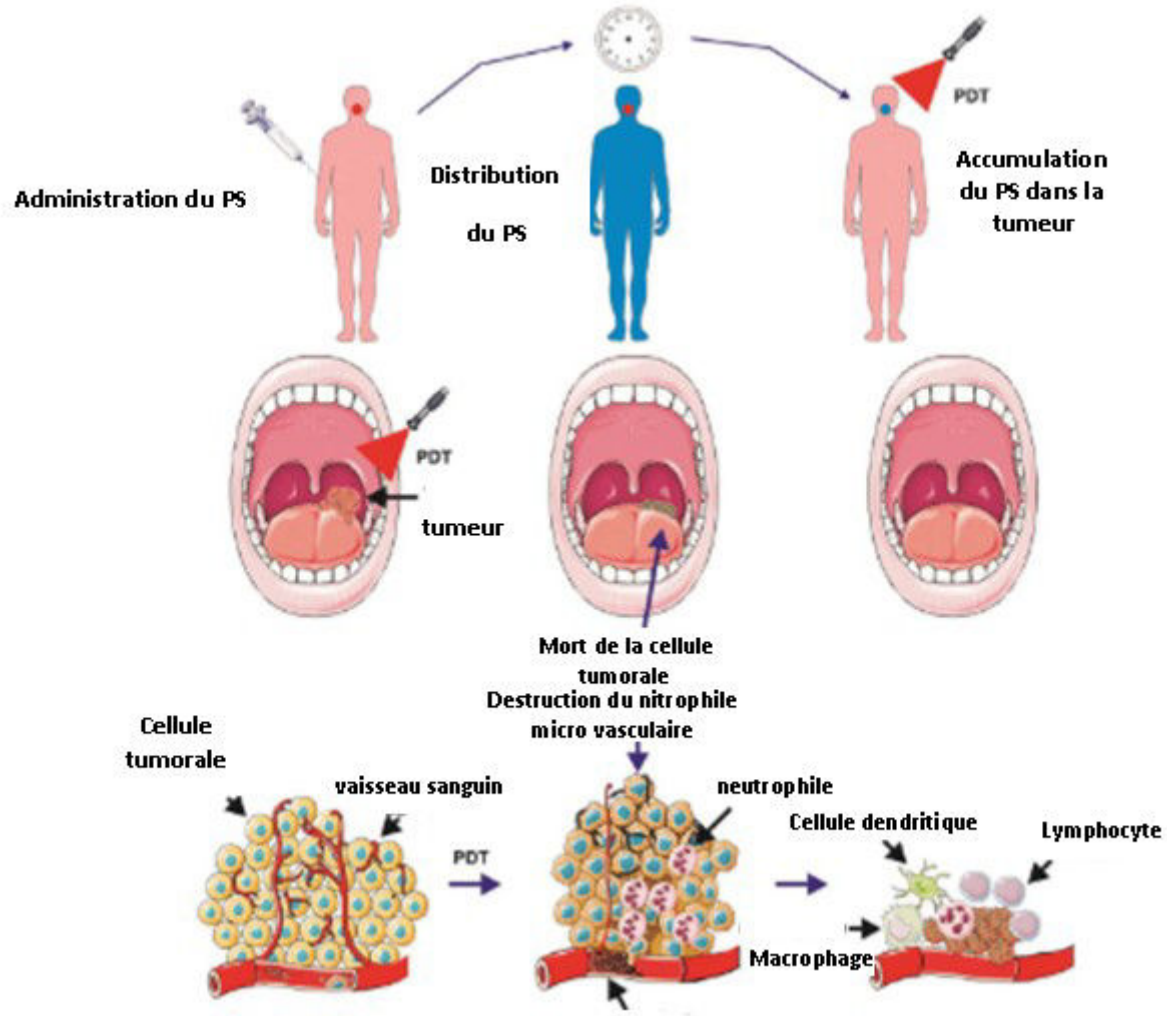



Figure II. 10 : Principe de la PDT suivant *(Agostinis et al., 2011)*.

## II.2.3 Applications courantes et espoirs de la PDT

### *II.2.3.1 Dermatologie*

La PDT fut appliquée en premier lieu sur différents types de cancers cutanés. Dougherty et son équipe sont les premiers à traiter des cancers cutanés par PDT en 1970, en utilisant comme PS l'HpD et de la lumière rouge, sur des patients souffrant de cancers de peau primaires et secondaires. Cette

étude a démontré que le cancer cutané en phase primaire montre une réponse complète, y compris le carcinome à cellules squameuses, ainsi que le carcinome à cellules basales et les mélanomes malins. La PDT peut donc être une option pour le traitement des tumeurs cutanées et sous-cutanées de larges volumes *(Dougherty et al., 1978) (Lowdell et al., 1993)*.

La découverte de l'acide aminolévulinique (ALA) et de l'acide méthyle aminolévulinate (MAL), qui se transforment en protoporphyrine IX (PpIX, Figure II.11) a entraîné une recrudescence de l'utilisation de la PDT en dermatologie. Ces molécules ont été approuvées par l'US Food and Drug Administration en 2000 pour application en dermatologie *(Wan & Lin, 2014)*.

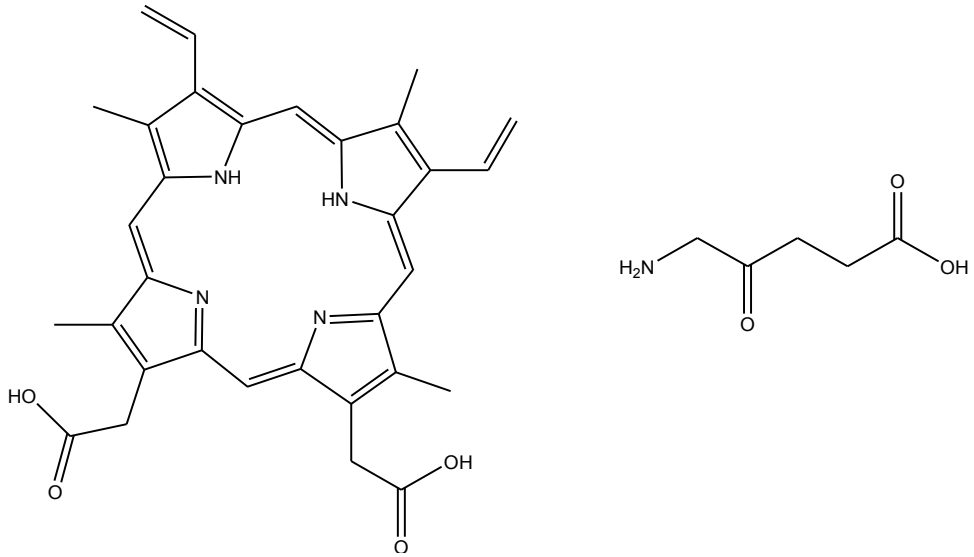



Figure II.11 : Structures chimiques de la protoporphyrine IX (PpIX) à gauche et de l'acide aminolévulinique (ALA) à droite.

Les lésions pré-malignes et malignes de la peau sont devenus la cible d'application de l'ALA-PDT, à l'exception des mélanomes malins pigmentés en raison de la pénétration limité de la lumière. Le traitement de la kératose actinique hypertrophique au niveau du visage et du cuir chevelu devient la première application approuvée en dermatologie par PDT en Amérique du Nord *(Huang, 2005) (MacCormack*, 2008)*(Wan & Lin, 2014)*.

En dermatologie, la PDT et aussi appliquée pour le traitement des cancers cutanés non mélaniques, tel que le carcinome baso-cellulaire mais n'est pas encore approuvée par la FDA. Différents travaux ont montré l'efficacité de la PDT en utilisant 20% d'ALA dans une solution d'huile et d'eau, avec activation par de la lumière rouge. Le carcinome baso-cellulaire superficielle (sBCC) présente une bonne réponse vis-à-vis du traitement PDT avec un taux de réponse compris entre 50 et 100% *(Cairnduff et al., 1994)(Svanberg et al., 1994)(Lui et al., 1995)*.

### II.2.3.2 Ophtalmologie

La thérapie photodynamique est utilisée en ophtalmologie et approuvée pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, depuis 2000. La Verteporfin (BPD-MA, dérivé de benzo-porphyrine monoacide) ou Visudyne® (Figure II. 12) est le PS utilisé par administration intraveineuse, suivie d'une activation à l'aide d'une diode laser à 690 nm. L'application de la PDT utilisant la Visudyne pour le traitement de la maladie néovasculaire choroïdienne (CNV) a prouvé son efficacité dans la prévention de la perte de vue dans le cas d'une rétrofovéolaire classique ou dans le cas de la néovascularisation choroïdienne causée par la dégénérescence maculaire liée à l'âge *(Huang, 2005) (Lim, 2002)(Keam et al., 2003)(Bessler, 2004)*.

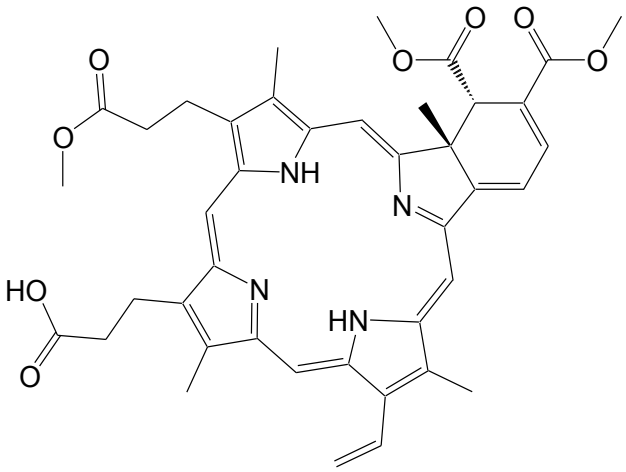



Figure II. 12 : Structure chimique de la Visudyne.

### II.2.3.3 Cancer de la tête et du cou

Il existe divers tumeurs malignes qui se développent au niveau de la cavité orale, le pharynx, la cavité nasale et le larynx. Le Foscan® et le Photofrin® sont les photosensibilisateurs les plus utilisés pour le traitement du carcinome à cellules squameuses qui apparaissent au niveau de la tête et du cou. L'application de la PDT utilisant le Foscan® pour le traitement de ces cancers à été approuvé en Europe en 2001 pour un traitement palliatif. Dans ce cas, l'application de la PDT est recommandée car elle présente un effet mineur sur les structures fonctionnelles sous-jacentes et un excellent résultat esthétique *(Lou et al., 2003)*.

### II.2.3.4 Tumeur cérébrale

Les glioblastomes et les astrocytomes ont tendance à former des foyers tumoraux qui se propagent au-delà du site tumoral principal. Le problème majeur rencontré par les cliniciens est de pouvoir

retirer non seulement la tumeur mais les parties infiltrantes, en prélevant les fonctions vitales du patient. La première application de la PDT a été introduite par Muller et Wilson en 1990. Ils ont utilisé du Photofrin®, irradié à l'aide d'une fibre optique immédiatement après résection de la tumeur pour traiter les patients atteints de glioblastome et l'astrocytome anaplasique. Ceci permet de traiter les zones infiltrantes sans retirer des tissus sains. L'application de la thérapie photodynamique a amélioré l'espérance de vie des patients après traitement, 10 semaines dans le cas des patients ayant un glioblastome avec application PDT, 24 semaines dans le cas d'un astrocytome malin et 41 semaines pour les patients traités présentant des oligodendrogliomes *(Huang, 2005)*.

L'utilisation del'acide aminolévulinique (ALA) a été réalisée par Stummer *et al.* en 1990, qui ont montré que la fluorescence de la PPIX permettait un diagnostique des tissus du gliome malin. La fluorescence de la PPIX peut être utilisée pour guider le geste chirurgical et de nombreuses études sont en cours *(Stummer et al., 2003)(Uzdensky et al., 2015).*

### *II.2.3.5 Cancer des poumon et mésothéliome*

La première application de la PDT dans le traitement du carcinome bronchique a été réalisée en 1980 au Japon, en utilisant un dérivé d'hématoporphyrine HpD, par Kato et son équipe *(Kato et al., 1985)*. Depuis, la thérapie photodynamique bronchoscopique est devenue une thérapie curative pour le cancer de poumon de cellules à petite taille (>1 cm) au Japon *(Kato et al., 2004)*.

Le mésothéliome pleural maligne (MPM), souvent lié à l'amiante, présente une faible réponse aux thérapies conventionnelles. Le Photofrin® a été testé comme une modalité per-opératoire adjuvante dans plusieurs pays, principalement aux Etats Unis par l'équipe de Friedberg. Les patients après chirurgie, chimiothérapie et PDT ont vu leur survie globale moyenne s'élever à 54 mois (contre 10 mois sans PDT) *(Friedberg et al., 2012)*.

### *II.2.3.6 Cancer gastro-entérologique*

La PDT endoscopique est une thérapie efficace en gastroentérologie, du fait de l'accessibilité aux lésions malignes ou pré-malignes localisées au niveau de l'œsophage, de l'estomac, de la voie biliaire. Le traitement du rectum est difficile et le geste chirurgical est risqué *(Ell et al., 1998)(Berr, 2004) (Webber & Fromim, 2004)(Wiedmann & Caca, 2004)*.

Le premier photosensibilisateur approuvé dans plusieurs pays est le Photofrin®. Le Photofrin® est utilisé pour l'éradication du cancer de l'œsophage à un stade précoce et l'œsophage de Barrett. Dans ces cas, la thérapie photodynamique est assistée avec un diffuseur en pointe ainsi une lumière centrée (Xcell PDT Balloon ; Wilson-Cook Medical Inc). Des résultats préliminaires ont confirmé que

l'utilisation de l'endoscopie des voies biliaires est une alternative efficace pour traiter le cholangiocarcinome non opérable *(Huang, 2005)*.

#### *II.2.3.7 Cancers urologiques*

En 1993, le Photofrin® a été utilisé avec succès au Canada pour traiter une tumeur de la vessie *(McBridge, 2002)*.

D'autres photosensibilisateurs ont ensuite été utilisés pour le traitement des tumeurs de la vessie comme l'ALA et ses dérivées estérifiés. Plusieurs travaux ont montré que l'ALA-PDT est efficace dans le traitement des cancers superficiels de la vessie *(Kriegmair et al., 1996)(Berger et al., 2003)* et il a été démontré que l'application répétitive d'un traitement PDT inhibe la progression de la tumeur *(Waidelich et al., 2001).*

Par ailleurs, la PDT est également étudiée pour traiter le cancer de la prostate. Les premières études utilisant le Photofrin® *(Muschter, 2003)*, le Foscan® et l'ALA ont été ont également montré une diminution du gène spécifique de la prostate (PSA) *(Nathan et al., 2002)(Zaak et al., 2003)*. L'effet PDT de la motexafine lutétium a été aussi utilisé pour l'ablation de la glande prostatique entière *(Stripp et al., 2004)(Gertner et al., 2004)*.

Le développement d'un nouveau PS, le Pd-bactériophéophorbide ou Tookad® (WST09 ; Negma Lerads/ Steba Biotech) a permis une grande avancée de la PDT dans le traitement du cancer de la prostate. La phase III est terminée et les résultats de l'étude sont attendus pour fin 2015.

#### *II.2.3.8 Gynécologie*

En gynécologie, l'intérêt de la PDT s'est concrétisé dans le traitement de la dysplasie du col de l'utérus après une administration intraveineuse de Photofrin® et excitation à 630 nm au niveau du canal cervical assisté par coloscopie *(Huang, 2005)*. D'autre part, l'ALA-PDT est une bonne alternative dans le traitement de la néoplasie intra-épithéliale cervicale *(Hillemanos et al., 1999)*.

Notre équipe s'intéresse également au développement de PS couplés à l'acide folique pour traiter les carcinomes péritonéaux induits par le cancer de l'ovaire.

### II.2.4 Mécanisme et mode de fonctionnement

La PDT se base sur un photosensibilisateur, la lumière et l'oxygène. Aucun de ces trois composants n'est toxique individuellement, mais ensemble ils initient une réaction photophysique qui mène à la formation des produits hautement réactifs et cytotoxiques, les espèces réactives d'oxygène (EROs) dont l'oxygène singulet *(Agostinis et al., 2011)*. Les photosensibilisateurs, ou plus généralement les

molécules photosensibles, ont la capacité d'absorber des photons. L'état fondamental des PS est un état singulet $S_0$, possédant 2 électrons non appariés avec des spins opposés (antiparallèles). L'irradiation lumineuse la formation d'un PS à un niveau d'énergie plus élevé (transition de l'état fondamental $S_0$, à un état singulet excité ($S_n$ avec n= 1, 2, 3) de courte durée de vie, suivi d'une désexcitation non radiative pour passer à l'état excité le plus stable ($S_1$). Plusieurs voies de désexcitation sont alors possibles : (1) afin de retourner à son état fondamental $S_0$ le PS va émettre de la fluorescence (émission d'un photon), (2) le PS retourne à son état $S_0$ par désexcitation non radiative, (3) le photosensibilisateur peut aussi passer à un état triplet T d'une durée de vie plus longue, par un croisement intersystème (CIS) *(Agostinis et al., 2011) (Baltazar et al., 2015)*. A partir de l'état triplet $T_1$, le PS peut se désexciter de façon non radiative et revenir à l'état stable $S_0$ ($T_1 \rightarrow S_0$) ou il peut se désexciter par émission de phosphorescence (Figure II.13). Il peut également céder son énergie par transfert d'énergie à des molécules environnantes (par exemple l'oxygène, qui passera à son tour à l'oxygène singulet $^1O_2$) (réaction de type II). Des transferts d'électrons ou de protons donnent lieu, quant à eux, à des réactions de type I, que nous allons détailler.

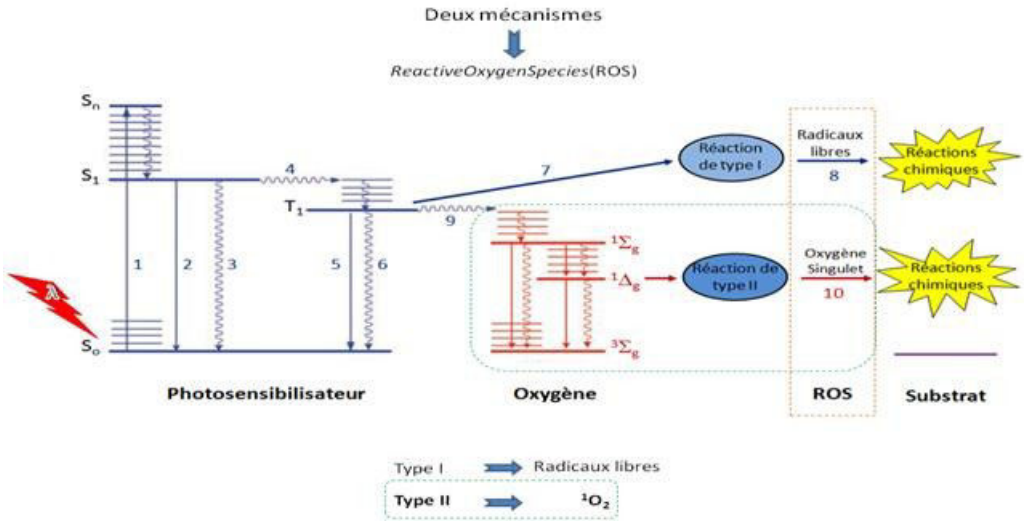



Figure II. 13 : Diagramme de Jablonski simplifié décrivant les transferts énergétiques conduisant à la formation d'$^1O_2$.

Comme nous l'avons mentionné, deux types de réactions peuvent intervenir dans l'état triplet :

- Réactions de type I
- Réactions de Type II

Dans la réaction de **type I,** le PS à l'état triplet va transférer des électrons et/ou des atomes d'hydrogène au biomolécules organiques qui se situent au niveau micro-cellulaire environnant, conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) tels que l'anion super oxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde de dihydrogène ($H_2O_2$), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) et le nitrate peroxyde ($ONOO^{\cdot}$) *(Hamblin & Hassan, 2004) (Baltazar et al., 2013)*.

Dans la réaction de **type II,** le PS à l'état triplet $T_1$ transfert son énergie à une molécule d'oxygène. A l'état fondamental, l'oxygène se trouve en triplet $^3O_2$. Le transfert d'énergie venant du PS va former l'oxygène singulet ($^1O_2$), qui est un oxydant hautement réactif avec une faible durée de vie, qui peut réagir avec différents biomolécules tels que les lipides et les protéines *(Hamblin & Hassan, 2004) (Foote, 1968)*. La production d'oxygène singulet et de radicaux libres dépend de la nature du PS, de la concentration du milieu en $O_2$, et du type du PS.

Il est admis qu'en majorité, c'est l'oxygène singulet qui est responsable de l'action photodynamique. Nous allons à présent nous focaliser sur l'oxygène singulet.

## II.3 L'oxygène singulet

### II.3.1 Historique

L'oxygène dans la nature représente le troisième élément le plus abondant en masse de l'univers après l'hydrogène et l'hélium, il constitue ainsi 86 % de la masse des océans, 46,4 % de la masse de l'écorce terrestre sous forme d'oxydes et de silicates et 23,1 % de la masse de l'air sous forme de dioxygène ou d'ozone, soit près de 21% du volume total de l'atmosphère.

La découverte de l'oxygène singulet fut en 1927, mais le terme oxygène actif a été introduit par Shönbein qui a découvert l'ozone entre 1839 et 1868. Le principe et le concept des mécanismes d'activation de l'oxygène participant à des processus biologiques et chimiques sont apparus au cours du XIX$^{éme}$ siècle. En 1897, Bach et Engler ont postulé la théorie de la peroxydation, qui a représenté une étape importante dans la compréhension des mécanismes d'activation de l'oxygène singulet. Batch s'est intéressé aux mécanismes de la fixation du $CO_2$ et de l'évolution de l'oxygène dans les mécanismes de photosynthèse en étudiant la formulation de l'oxygène peroxyde dans les plantes, et il a proposé que la lumière engendre une réaction entre le $CO_2$ et le $H_2O$ pour donner un composé type peroxyde « l'acide per carbonique et le formaldéhyde ». Il a ensuite proposé que les réactions primaires de l'oxygène avec des composés organiques oxydés engendrent une accumulation des peroxydes *(Krasnovsky, 2007)*. Trois ans après, Oscar Raab et Hermann von Tappeiner découvrent le nouveau phénomène qu'ils ont appelé ensuite « action photodynamique » *(Krasnovsky, 2007)*.

Ce n'est qu'en 1928 que la première théorie d'orbitales moléculaires de l'oxygène fut postulée par Mulliken *(Krasnovsky, 2007)*. Il décrit l'oxygène comme une molécule présentant deux états singulet

et un état triplet. En 1933-1934, Mulliken confirme la théorie en étudiant le spectre d'absorption de l'atmosphère terrestre et l'oxygène, et il observe une nouvelle bande d'absorption à 1270 nm.
En 1931, Hans Kautsky propose que l'oxygène singulet, en raison d'un transfert d'énergie d'une molécule photosensible, puisse initier une réaction photodynamique. Au cours de ces expériences conduites avec Bruijin, ils ont montré que les molécules de $H_2O$ dans la réaction engendrée par la trypaflavine et le *leucomalachite green* ne sont pas la source de l'$O_2$ intervenant dans la réaction *(Greer & Foote., 2006)*. Ils ont démontré que la fluorescence de la trypaflavine diminue en l'irradiant en présence d'une quantité croissante d'oxygène tandis que la *leucomalachite green* devient fluorescente lorsque la trypaflavine est irradiée en présence d'oxygène.
Entre 1933 et 1935, Jablonski revendique que les deux états excités d'une seule molécule existe : (i) un état de fluorescence de durée de vie faible et (ii) un état métastable plus long appelé phosphorescence *(Krasnovsky, 2007)*.

Les travaux sur les mécanismes impliqués dans la réactivité d'oxygène ont pris une autre tournure lorsque Khan et Kasha ont interprété la chimioluminescence rouge observée lors de la réaction du peroxyde hyper-chlorite avec le peroxyde d'hydrogène en 1963, comme conséquence de la libération d'oxygène singulet *(Khan & Kasha., 1963)*. En 1964, Foote et Wexler mènent des expériences sur le mélange de $ClO^-$ et $H_2O_2$ et trouvent que les produits oxygénés formés sont les mêmes que ceux formés au cours d'une réaction photochimique. Ils prouvent ainsi la possibilité d'obtenir de l'oxygène singulet suivant deux voies : soit par photo-oxydation d'une molécule photosensible, soit par réaction chimique entre l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène *(Greer & Foote, 2006)* (*Krasnovsky, 2007)*.

## II.3.2 Propriétés photophysiques

### II.3.2.1 Structure électronique de l'oxygène singulet

L'oxygène moléculaire ($O_2$) présente deux états excités singulet, un premier état $^1\Delta_g$ (95 KJ $mol^{-1}$) soit 22,5 Kcal $mol^{-1}$ et un deuxième état excité $^1\Sigma^+_g$ (158 KJ $mol^{-1}$) soit 31,5 Kcal $mol^{-1}$ au dessus de l'état triplet. La configuration électronique de ces deux états diffère uniquement par la structure des orbitales π antiliantes. L'oxygène singulet correspond donc à plusieurs états excités électroniques ($^1\Delta_g$ et $^1\Sigma^+_g$ ). Cependant, le niveau de géométrie Σ se désexcite vers le niveau Δ très rapidement (Figures II. 14 et II. 15) ; La transition de l'état $^1\Delta_g$ à l'état $^3\Sigma^-_g$, est interdite ce qui justifie le temps de vie long de l'état $^1\Delta_g$, alors que la transition de $^1\Sigma^+_g \rightarrow {}^1\Delta_g$ est permise avec un temps de vie est très court *(Herzberg, 1950)(Arnold et al., 1968)(Merkel & Kearns, 1972)*.

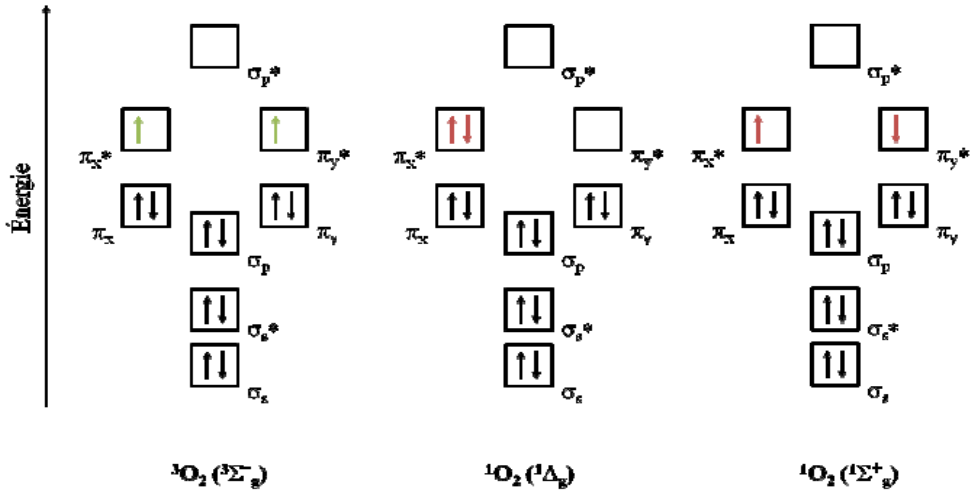



Figure II.14 : Les orbitales moléculaires de l'oxygène à l'état triplet ou singulet.

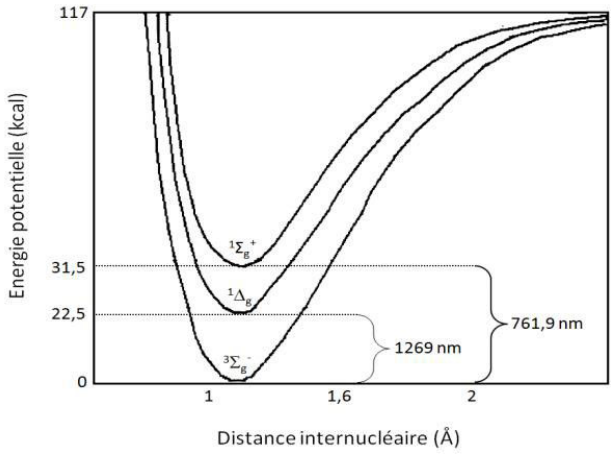



Figure II. 15 : Diagramme d'énergie potentielle des trois états électroniques de l'oxygène moléculaire.

La désexcitation de l'oxygène singulet vers son état fondamental peut s'accompagner de l'émission d'un photon de phosphorescence. L'énergie d'excitation de l'$^1O_2$ $^1\Delta_g$ par rapport à l'état fondamental est de 22,4 Kcal $mol^{-1}$. La relaxation correspondante se situe donc dans le proche infrarouge à 1269 nm (Figure II.15).

### *II.3.2.2 Inhibition de la production de l'oxygène singulet*

Outre la luminescence, lorsque l'oxygène moléculaire passe à son état excité singulet, sa désactivation peut se faire suivant deux mécanismes : soit par quenching physique, soit par quenching chimique.

#### II.3.2.2.1 Quenching physique de $^1O_2$

Ce mécanisme permet une désactivation de $^1O_2$ en oxygène à l'état triplet sans consommation d'$O_2$ ou formation de produits de réaction. Ce mécanisme résulte d'un transfert d'énergie non radiatif de l'oxygène singulet vers une molécule tierce, sans réaction chimique (équation 1).

$$^1O_2 + A \xrightarrow{k_p} {}^3O_2 + A^* \quad (1)$$

#### II.3.2.2.2 Quenching chimique de $^1O_2$

Au cours de ce mécanisme d'inhibition, le quencher réagit avec l'$^1O_2$ pour donner un nouveau produit suivant la réaction (2).

$$^1O_2 + A \xrightarrow{k_c} P \quad (2)$$

Ce mécanisme d'oxydation est observé en présence de composés insaturés, au cours des réactions d'addition d'$^1O_2$ sur un diène (1,3 addition), de cycloaddition [4+2], de réactions de Diels –Alder. Un autre intérêt de ce type de réaction est donné par la synthèse de dibenzol benzène à partir du 1,3-diphény-lisofurane *(Rawls & Vansanten, 1970)*. Il peut aussi réagir en présence d'oléfines qui possèdent deux substituant allyliques ou plus pour donner des hydroperoxide allyliques.

Au niveau des systèmes biologiques, ce mécanisme de réaction a lieu principalement sur le tryptophane, l'histidine et des acides gras insaturés (*Rawls & Vansanten, 1970)*. L'oxydation des phénols peut donner des hydroperoxides. En présence d'oxygène singulet, les sulfides s'oxydent également pour donner des sulfoxides (*DeRosa & Crutchley, 2002)*.

## II.4 Le ciblage en PDT

Une des pistes actuelles pour améliorer le traitement par PDT est de cibler l'action photodynamique. Ce ciblage peut se faire de différentes façons :

- Cibler la lumière,

-Améliorer l'accumulation du PS au sein de la tumeur ou des néovaisseaux en greffant au PS un module d'adressage spécifique de récepteurs membranaires surexprimés dans la zone à traiter,

- Cibler la formation de l'$^1O_2$.

### II.4.1 La lumière en PDT et son ciblage

La majorité des PS couramment utilisés en PDT sont excités par de la lumière visible proche infrarouge. La lumière présente une pénétration limitée dans les tissus biologiques. En effet, les PS entrent en compétition avec les constituants (Hémoglobine, les flavines, mélanines…..) des tissus vivants qui absorbent de la lumière visible entre 400 nm et 700 nm (Figure II.16). La lumière bleue pénètre faiblement à travers les tissus tandis que les radiations rouge et infrarouge pénètrent plus profondément. La région située entre 650 et 900 nm est appelé fenêtre thérapeutique, zone où les tissus biologiques absorbent peu *(Agostinis et al.,2011)*. Pour traiter des tumeurs profondes, il est donc intéressant d'utiliser de la lumière rouge ou la lumière NIR qui présente une meilleure pénétration *(Juzeneine et al., 2006)*.

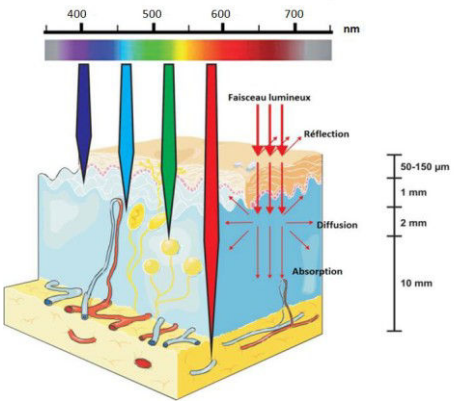



Figure II.16 : Pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde (nm) *(Agostinis et al.,2011).*

Pour un PS donné, il n'existe pas de source de lumière unique ou idéale, le choix de la lumière d'activation va dépendre principalement des caractéristiques photophysiques du PS et du type de la pathologie (localisation, taille de la lésion, accessibilité). L'effet photodynamique dépend aussi de la dosimétrie, du temps d'exposition à la lumière et du mode de délivrance de la lumière (continue, fractionnée, métronomique) *(Agostinis et al., 2011)*.

Afin d'améliorer le ciblage de la lumière en PDT, de nouvelles techniques se développent comme l'utilisation de la lumière NIR par excitation biphotonique. Dans cette technique, le PS est excité par une absorption simultanée de deux photons NIR de faible énergie donc de grande longueur d'onde. L'excitation à deux photons requière l'utilisation d'un laser pulsé comme source lumineuse, ce qui peut présenter un frein à l'utilisation chimique d'une telle technique. Il faut cependant signaler que les lasers sont les sources de lumières les plus utilisées en PDT, puisqu'ils produisent une lumière

monochromatique d'une puissance élevée à une longueur d'onde avec une bande passante étroite pour un PS spécifique *(Huang, 2005)*.

Une autre approche pour avoir une pénétration plus profonde à travers les tissus, est l'utilisation de nanoparticules excitables dans le proche infrarouge et qui peuvent faire de l'upconversion (NIR excitable upconversion nanoparticles). Dans ce cas, deux photons sont également nécessaires mais leur absorption n'est pas simultanée *(Liu et al., 2014)*. Ces nanoparticules sont souvent des nano-cristaux dopés par des lanthanides, qui émettent des photons de forte énergie après excitation par une lumière NIR (Figure II.17, Figure II.18). Cette nouvelle approche présente un potentiel remarquable en biomédecine. Durant les dernières années, l'UCNPs s'est principalement développée pour l'imagerie des tissus profonds. Des nanoparticules dopées par du $Tm^{3+}$ peuvent être détectées par fluorescence à plus de 3,2 cm de profondeur. En outre, les nanoparticules dopées par les ions $Ln^{3+}$ présentent des propriétés optiques uniques de multi-bandes à conversion ascendante de luminescence (UCL) allant de l'ultraviolet à l'infrarouge (NIR) et le spectre peut être modulé en variant les ions de dopage Er, Tm, HO…*(Liu et al., 2014)(Wang et al., 2013)(Wang & Liu., 2008)(Li et al., 2008)(Chen et al., 2013)(Cheng et al., 2011)*.

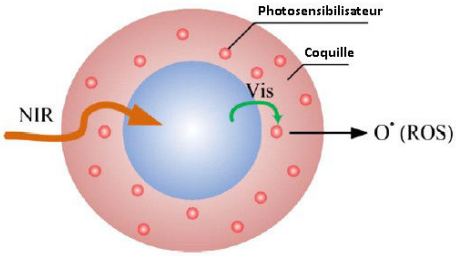



Figure II.17 : UCNPs doppé avec des lanthanides, les ions dopants confinés à l'interieur d'une structure noyau/enveloppe par surface de revêtement *(lin et al., 2012)*.

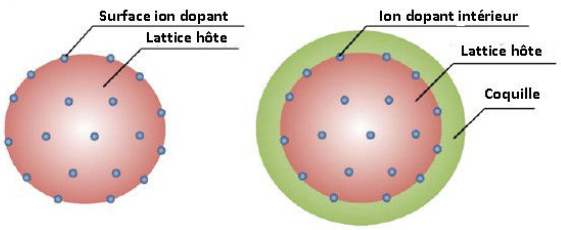



Figure II.18 : UCNPs comme support de photosensibilisateur pour application en PDT *(lin et al., 2012)*.

Le ciblage passe également par le développement de fibres avec des cônes de diffusion, de tissus lumineux (développés à Lille, INSERM U 1081).

Afin, d'autres études s'intéressent à l'utilisation de rayons X plus pénétrants à la place de la lumière.

### II.4.2 Ciblage du photosensibilisateur : passif et actif

Les stratégies de ciblage du PS sont souvent divisées en deux catégories : le ciblage actif et le ciblage passif.

### II.4.2.1 Le ciblage actif

Le ciblage actif s'intéresse aux interactions spécifiques entre le PS et les cellules cibles, par le biais d'interactions spécifiques ligand-récepteurs. Le ciblage actif est un guidage du PS vers le site à traiter *(Beduneau et al., 2007)(Deckert, 2009)(Hong et al., 2009)(Zensi et al., 2009)*.

L'accumulation des PS au niveau de la zone cible est rendue possible par l'utilisation de molécules d'adressage qui présentent une grande affinité pour des récepteurs cellulaires surexprimés au niveau des cellules cibles. Différents vecteurs peuvent être utilisés. Les peptides présentent une grande affinité pour des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules comme le H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD) et le H-Asn-Gly-Arg-OH(NGR) qui sont utilisés pour cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61) et l'aminopeptidase N(C13) respectivement. L'acide folique peut se lier à des récepteurs de folate, récepteurs membranaires surexprimés dans divers tumeurs cancéreuses *(Leamon & Reddy, 2004)*. Les anticorps monoclonaux sont des glycoprotéines capables de reconnaître une variété de cibles avec une forte affinité. Les récepteurs EGFR et VEGFR sont surexprimés dans diverses malignités et sont liés à la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase de cellules tumorales *(Fay & Scott, 2011)*. L'acide hyaluronique (AH) est aussi reconnu par un récepteur membranaire spécifique, le CD44, qui est surexprimé dans diverses tumeurs des cancers du poumon, intestins, sein, côlon et cerveau *(Ossipov, 2010)*.

Nous allons décrire les principaux récepteurs qui intéressent les chercheurs en PDT.

### II.4.2.2 Le ciblage actif direct

- **Les récepteurs à l'œstrogène**

Plusieurs stratégies de ciblage ont été adoptées en PDT, parmi lesquelles le ciblage des récepteurs à l'œstrogènes (ER : nuclear receptor for oestrogen) surexprimés dans le cancer du sein, du cerveau et de l'ovaire *(Ferguson et al., 1998)(Murphy et al., 1998)*. La première étude ciblant les récepteurs à l'œstrogène, mené par *(Swamy et al., 2002)* a montré que l'internalisation d'un PS formé d'une porphyrine P1-COOH et d'un motif œstradiol couplés par un bras-espaceur (Figure II.19) dans des cellules sur-exprimant des récepteurs à œstrogène (MCF-7) est supérieure à son internalisation dans des cellules saines qui n'expriment pas ce récepteur.

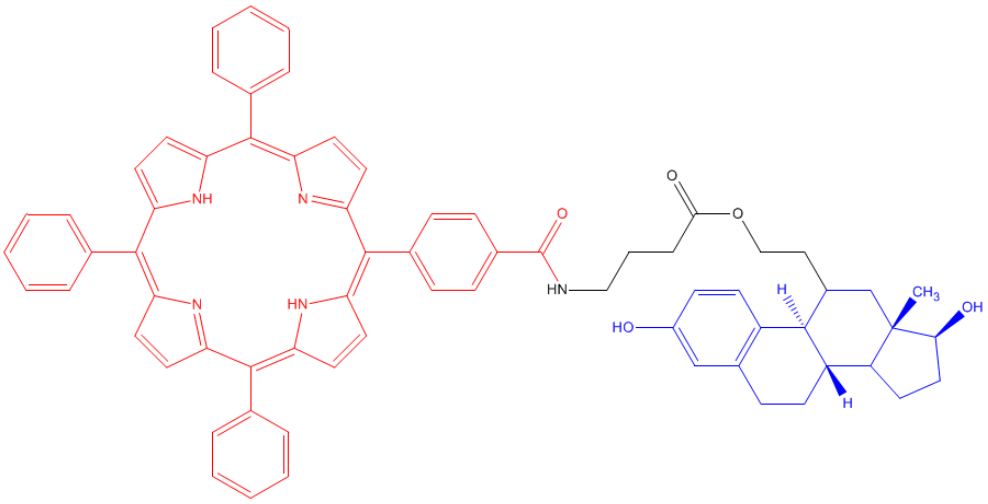



Figure II.19 : Structure chimique d'un composé porphyrine-œstradiol d'après *(Swamy et al., 2002)*.

Une autre étude qui fait intervenir le phéophorbide-a conjugué à l'œstradiol a démontré, en utilisant la microscopie confocale, que ce conjugué se localise préférentiellement au niveau des cellules tumorales, engendrant un effet photodynamique sept fois supérieur à celui du PS seul *(El-Akra et al., 2006)*.

- **Le récepteur à l'acide folique**

Le ciblage du récepteur à l'acide folique représente une autre stratégie en PDT, ce récepteur étant surexprimé dans certaines cellules cancéreuse (l'ovaire, l'utérus, le cerveau, le rein, le poumon, et les cellules myéloïdes) *(Schneider et al., 2005)*. Cette stratégie présente plusieurs avantages. En effet l'acide folique est : (i) capable de reconnaître son récepteur *in vitro* avec une grande constante d'affinité, (ii) la petite taille de l'acide folique n'induit pas d'encombrement à la surface du vecteur, (iii) le complexe acide folique/récepteur de l'acide folique est internalisé par endocytose dès sa formation au niveau des endosomes (la libération du ligand à travers le cytoplasme cellulaire permet le recyclage du récepteur à la surface membranaire) et (iv) l'acide folique est peu cher et est déjà utilisé comme agent de ciblage en clinique *(Vandam et al., 2011)*.

Le ciblage par l'acide folique a fait l'objet de plusieurs publications dans notre équipe, lors des thèses de Julien Gravier (2004-2008), Vincent Morosini (2007-2010). Cette étude se poursuit avec des cliniciens de Lille (H. Azaïs et S. Mordon).

Les résultats ont montré que des PS de type porphyrine couplés à de l'acide folique *via* un bras espaceur de type PEG ont une activité photodynamique sur des cellules KB (+) 3 fois supérieure à leur activité sur les cellules saines. *In vivo*, la sélectivité du composé s'est révélé être 9 fois supérieure pour les tissus cancéreux que les tissus sains *(Azaïs et al., 2015)*.

- **Les récepteurs aux sucres : les lectines**

Les récepteurs aux sucres, les lectines, représentent une autre voie de ciblage, puisqu'il a été prouvé que dans les cellules cancéreuses du cancer du sein, du foie, des poumons et de la prostate, les récepteurs aux sucres sont surexprimés à la surface des cellules *(Medina & Owen., 2002)*.

Cette voie de ciblage consiste à coupler un PS avec des sucres, les photosensibilisateurs résultants sont appelés des PS glycoconjugués. Certains ont été synthétisés par notre équipe de recherche lors de la thèse de Benoît Di Stasio (2003-2007). Un PS glycoconjugué a été synthétisé, formé d'une porphyrine et de motifs glucosamine. L'étude menée a montré que le PS vectorisé s'incorpore préférentiellement dans les cellules HT29 sur-exprimant des lectines, par rapport au PS seul *(Frochot et al., 2003)(Di Stasio et al., 2005)*.

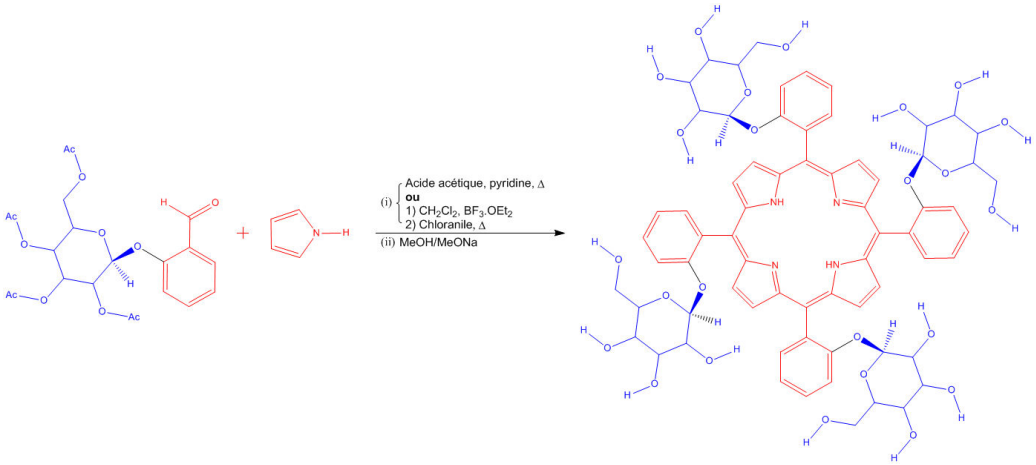



Figure II.20 : Schéma de synthèse d'une tétraphénylporphyrine glycosylée *(Maillard et al., 1989)*.

L'équipe de P. Maillard développe des composés glycosylés depuis des années (Figure II.20) *(Laville et al., 2003)(Laville et al., 2004)(Maillard et al., 2007)*. Les travaux ont montré que les PS triglycosylés présentent une activité photodynamique plus grande que les conjugués tétra-glycosylés, les conjugués tri-glycosylés possèdent une meilleur internalisation dans les cellules de carcinome humain HT29 avec un effet photodynamique 4 fois supérieur au PS seul (*m*-THPC), grâce au mécanisme d'endocytose *(Momenteau et al., 1999)(Laville et al., 2003)*. L'équipe de J. O. Durand utilise le α-*D*-mannopyranose couplé à des nanoparticules méso-poreuses pour des applications en thérapie photodynamique mono et biphotonique *(Brevet et al., 2009)(Gary-Bobo et al., 2012)(Gary-Bobo et al., 2012a)*.

- **Le ciblage des métabolites cellulaires**

Contrairement aux voies de ciblage déjà décrites (ciblage des récepteurs à l'œstrogène, des récepteurs de l'acide folique, des lectines), le ciblage des métabolites cellulaires n'utilise pas les récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses mais leur hyperactivité métabolique. Ainsi, au niveau des cellules cancéreuses en développement, un métabolisme favorise l'accumulation des polyamines qui interviennent dans leur croissance, par l'intermédiaire d'un système de transport appelé PAT (polyamine transport system). Les polyamines sont des petites molécules organiques cationiques qui sont essentielles pour la croissance et le développement des cellules. Au niveau des tumeurs, le métabolisme des polyamines est déséquilibré et des concentrations élevées en polyamines (spermine, spermidine et putrescine) ont été associées aux divers cancers (cancer du sein, du côlon, du poumon, de la prostate et de la peau) *(Shannon et al., 2013)*.

Des travaux utilisant des PS conjugués à des polyamines ont été développés par l'équipe de V. Sol *(Sol et al., 2006)*. Le PS utilisé est la protoporphyrine IX (PpIX) couplée à un motif de spermine et un motif de spermidine. L'étude biologique de ce conjugué sur des cellules K562 de leucémie miélogène humaine a révélé qu'il présente une internalisation et une cytophototoxicité supérieure à celle du Photofrin®. Récemment, il a été également montré que les conjugués à base de protoporphyrine IX (PpIX) couplés à 2 ou 4 spermidines ou spermines en position *cis* ou *trans* possèdent une bonne internalisation dans les cellules HaCat et MCF7 *(Sarrazy et al., 2011)*.

### *II.4.2.3 Ciblage actif indirect*

#### II.4.2.3.1 Ciblage de la néovascularisation

Il est connu que les tumeurs solides ne peuvent pas dépasser 1 à 2 $mm^3$ sans développer un réseau vasculaire spécifique *(Siemman et al., 2004)*, afin de satisfaire leurs besoins nutritionnels et apport en l'oxygène, tout en éliminant des déchets métaboliques. Ce phénomène est appelé néoangiogenèse. Il est défini comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Ce phénomène de vascularisation est indispensable dans plusieurs processus physiologiques (réparation tissulaire (cicatrisation), régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta, etc.) *(Reynolds et al., 2001)(Kojda et al.,2005)*.

Il y a plus que 30 ans, Folkman postula que les tumeurs solides étaient dépendantes de l'angiogenèse et qu'un traitement antiangiogénique pouvait être une thérapie anticancéreuse efficace, par inhibition de la néovascularisation. Dans le cas de la PDT, cette stratégie de ciblage est nommée VTP pour *Vascular Targeted Photodynamic therapy*, qui vise la destruction de la néovascularisation *(Chen et al., 2006)*.

L'angiogenèse tumorale est le résultat d'un déséquilibre entre facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques favorisant la prolifération de la tumeur et stimulant la croissance des cellules cancéreuses. Ce processus présente différentes étapes : (i) étape d'initiation, conduisant à la sécrétion des gènes angiogéniques, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), (ii) étape de dégradation au cours de laquelle la sécrétion des facteurs angiogéniques, majoritairement le VEGF, vont activer les cellules endothéliales des capillaires préexistants pour produire des métalloprotéinases matricielles, qui vont assurer la dégradation de la membrane basale ce qui va permettre la migration des cellules endothéliales vers le stimulus, (iii) étape de prolifération, au cours de laquelle les cellules endothéliales prolifèrent et forment des germes vasculaires, enfin (iv) la dernière étape, dite de remodelage vasculaire, permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *(Weiss et al., 2012)(Hanahan et al., 1996)*. La figure II.21 résume les différentes étapes de l'angiogenèse tumorale.

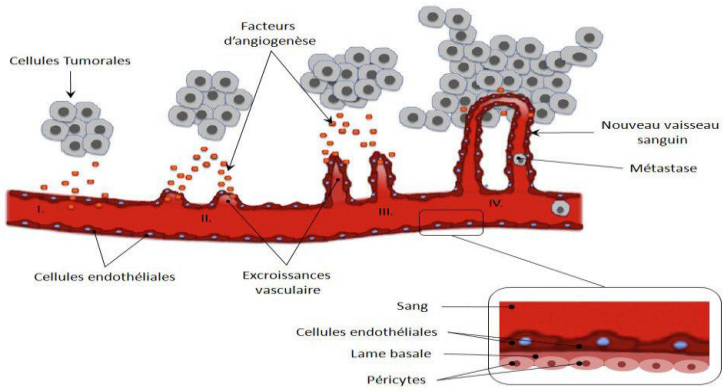



Figure II.21 : Les différents étapes de l'angiogenèse *(Weiss et al., 2012)*.

Les cellules endothéliales dans une tumeur expriment des marqueurs différents des cellules endothéliales normales parmi lesquelles : les intégrines $\alpha_v \beta_3$, les récepteurs des tyrosine kinases, les récepteurs des éphrines et ceux au VEGF.

- **Ciblages des intégrines $\alpha_v\beta_3$**

Les intégrines représentent une famille de récepteurs de la matrice extracellulaire qui sont exprimées au niveau des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse *(Brooks et al., 1994)*. Ce sont des protéines hétérodimères. Il existe environ 24 intégrines hétérodimères différentes qui se forment par la combinaison de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β. Certaines intégrines spécifiques se lient préférentiellement à des protéines de la matrice extracellulaire. Une grande variété d'intégrines contribue à la progression tumorale (comme $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_2\beta_1$, et $\alpha_3\beta_1$).

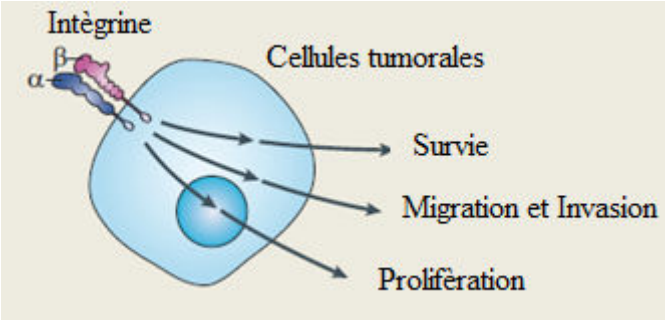



Figure II.22 : La contribution des intégrines dans la progression et la métastase tumorale *(Desgroellier & Cheresh, 2010)*

Les intégrines jouent le rôle d'un régulateur de plusieurs fonctions au sein des cellules tumorales, y compris leurs migration, invasion, prolifération et survie. Dans certains types de tumeurs l'expression de certains intégrines spécifiques ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_6$) est en corrélation avec la progression tumorale *(Desgroellier & Cheresh., 2010)*.

Une intégrine spécifique, la $\alpha_v\beta_3$ se lie au H-tri-peptide Arg-Gly-Asp-OH (RGD) et est surexprimée au niveau des cellules endothéliales angiogéniques. Le ciblage des intégrines a fait l'objet de certains travaux au sein de notre équipe. Au cours de ces études, des PS conjugués à deux motifs de type RGD ont été synthétisés utilisant la tétraphénylchlorine et la tétraphénylporphyrine comme PS, et un bras espaceur (Ahx) *(Boisbrun et al., 2008)(Frochot et al., 2007)*. L'étude *in vitro* a révélé une bonne internalisation des conjugués synthétisés dans des cellules HUVEC, ainsi qu'une incorporation cellulaire très élevée de PS couplé au motif linéaire RGD par rapport au PS seul.

- **<u>Les récepteurs au VEGF (VEGFRs et NRPs)</u>**

*- Les récepteurs au VEGF*

Le VEGF est un facteur qui intervient dans l'activation des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). En inhibant l'apoptose, il favorise la survie des cellules endothéliales, leur prolifération et leur migration, en se liant à des récepteurs localisés à la surface des cellules endothéliales. Il induit la transduction du signal responsable de la prolifération et la migration des cellules. Ainsi il favorise la croissance des cellules vasculaires endothéliales qui dérivent des artères, veines et des vaisseaux lymphatiques *(Sawano et al., 2001) (Huang et al., 2001)*.

Parmi ces récepteurs, on trouve les VEGFR-1 et VEGFR-2 qui sont des récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK), ainsi que le VEGFR-3. Le VEGFR-2 est exprimé dans la majorité des cellules endothéliales, d'où l'intérêt de son ciblage.

*- Les neuropilines (NRP)*

Les neuropilines sont des corécepteurs au VEGF. Elles sont connues comme des facteurs de la guidance axonale qui participent au développement des vaisseaux sanguins et à la progression tumorale. Elles présentent une affinité élevée envers la famille des sémaphorines de classe 3 qui jouent un rôle essentiel pour la motilité et la migration cellulaires.

Les NRPs sont des glycoprotéines transmembranaires qui sont classées en deux familles, les NRP1 et les NRP2. Les NRP1 sont identifiées comme des récepteurs qui présentent une grande affinité envers les sémaphorines de classe 3 (SEMA) et comme corécepteurs au VEGF ce qui explique ainsi leur localisation au niveau des cellules endothéliales. Quant aux NRP2, ils sont situés au niveau de l'endothélium veineux et lymphatique, ce qui explique leur rôle régulateur de croissance des vaisseaux sanguins lymphatiques *(Djordjevic & Driscoll, 2013)(Thomas, 2009)(Raimondi & Ruhrberg., 2013)*.

Notre équipe s'est investie dans le ciblage des récepteurs NRP1. Au cours de ces études, un conjugué sélectif du corécepteur NRP1 a été synthétisé ; il est constitué d'une chlorine et d'un peptide (H-ATWLPPR-OH) reliés entre eux par l'acide aminohexanoïque (Ahx). Ce conjugué a montré une bonne incorporation dans les cellules endothéliales et dans l'endothélium tumoral de tumeur cérébrales xénogreffées chez des souris mais il présente une stabilité insuffisante *in vivo (Thomas et al., 2009)*. Depuis, d'autres peptides de ciblage ont été étudiés par modélisation moléculaire *(Kamarulzaman et al., 2015a)* et leur affinité *in vitro* et biodistribution *in vivo* ont été décrites *(Kamarulzaman et al., 2015b)*.

### II.4.2.3.2 Le ciblage de l'oxygène singulet

**- Ciblage passif de l'oxygène singulet (pH)**

Une autre stratégie consiste à élaborer des macromolécules qui ne vont produire de l'$^1O_2$ qu'au niveau de la zone tumorale. L'accumulation du PS dans divers organites est affectée par le pH interne. Il a été montré que le pH des tissus cancéreux est légèrement acide <6,4. *Koo et al., (2010)* ont utilisé le pH pour cibler la production d'oxygène singulet. L'approche consiste à développer des micelles chargées en PpIX. A l'intérieur de la micelle, les photosensibilisateurs s'agrègent inhibant ainsi l'émission de fluorescence et la production d'oxygène singulet. Après dégradation de la micelle, la PpIX est relarguée dans le milieu et ses propriétés photophysiques sont restaurées. Cette étude a montré qu'à un pH= 7,3 le pourcentage de relargage de la PpIX est de 23 % après 24h, tandis qu'en milieu acide (pH= 6,4 après 6h), 60 % de relargage est observé. Les tests *in vivo* et *in vitro* ont prouvé l'accumulation du PS au niveau des cellules tumorales en raison de leurs pH acide (Figure II.23).

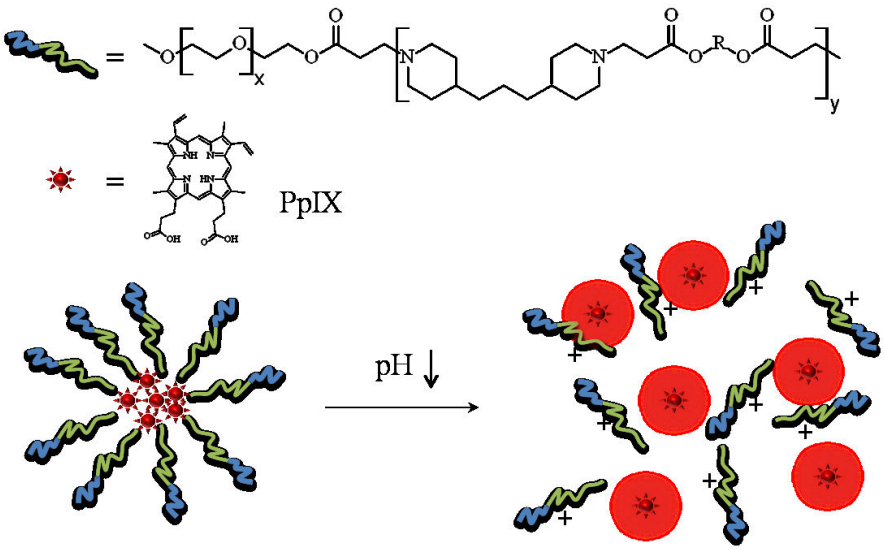



Figure II.23 : Schéma de la micelle polymérique MPEG poly-(acides β–aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide.

Une autre stratégie consiste à contrôler l'agrégation et la désagrégation des photosensibilisateurs. Le principe repose sur le couplage des PS à des polymères, qui en milieu aqueux, s'agrègent et forme une nanoparticule dégradable. Les PS enfermés dans la nanoparticule perdent leur activité photophysique et ce n'est qu'après internalisation au niveau des cellules cancéreuses que la nanoparticule formée se dégrade et libère les PS qui retrouvent leurs phototoxicité et propriété de fluorescence (Figure II.24).

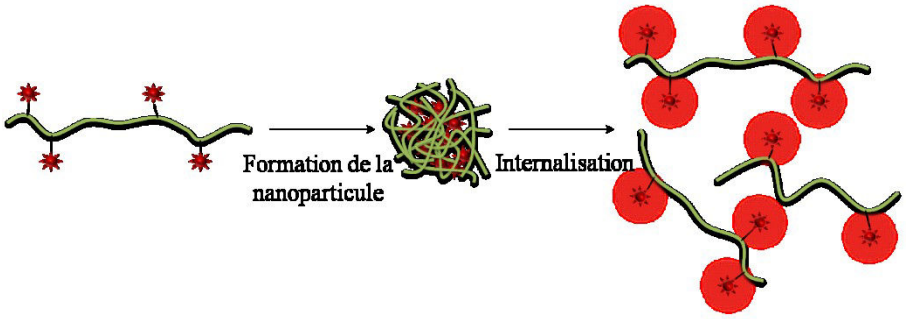



Figure II. 24 : Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables.

*(Lee et al., 2011)* ont utilisé le glycol chitosane comme polymère et la PpIX comme PS. En milieu aqueux, ces molécules s'auto-assemblent pour former des nanoparticules de 280 nm, qui ne présentent aucune production d'oxygène singulet. Ces nanoparticules ont été testées *in vitro* et *in vivo* et ont engendré un taux élevé de nécrose avec une bonne sélectivité envers des cellules tumorales chez les souris.

La même stratégie a été utilisée par *(Li et al., 2011)*. Les nanoparticules sont composées d'un polymère de sulfate de chondroïtine acétylée et de chlorine e6 comme PS, la taille des nanoparticules est de 140 nm. L'action photodynamique a été restaurée après internalisation au niveau des cellules cancéreuses.

**- Régulation active de l'oxygène singulet (PMB)**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'effet photodynamique est dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) plus particulièrement l'oxygène singulet. Une autre piste pour améliorer la sélectivité du traitement est donc de cibler la formation d'$^1O_2$. Pour ce faire, des constructions moléculaires particulières, appelées PMBs, peuvent être élaborées.

De point de vue structural, les *photomolecular beacons* ou PMBs sont des édifices moléculaires, caractérisés par leur capacité à produire l'oxygène singulet uniquement dans la zone tumorale.

On peut définir un PMB comme un assemblage de 3 composants chimiques : (i) un photosensibilisateur (PS), (ii) un quencheur (Q) qui va jouer le rôle d'un accepteur d'énergie afin d'empêcher le PS de former de l'$^1O_2$ et/ou de la fluorescence, et (iii) un lien peptidique sensible à un stimulus endogène spécifique de la zone tumorale (Figure. II.25). En inhibant l'état excité du PS (par le quencheur Q), la production d'oxygène singulet est inhibée et la restauration des propriétés photocytotoxiques du PS se fait lorsqu'il atteint la cible biologique.

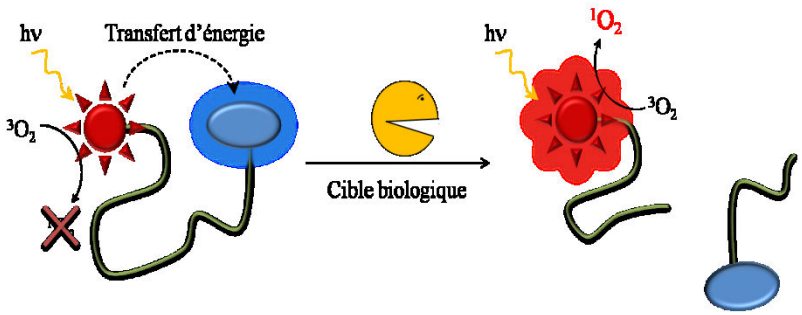



Figure II.25 : Schéma simplifié du principe d'action d'un *photomolecular beacon.*

Le principe des *molecular beacons* est largement utilisé pour l'imagerie de l'ADN, l'ARN, l'analyse génétique des erreurs au niveau des séquences d'oligonucléotides, et les interactions protéines-ADN. Le premier modèle d'un molecular beacon a été proposé en 1996 par Tyagi et Kramer *(Tyagi et al., 1998) (Marras et al., 1999) (Li et al., 2000).*

De nombreuses études ont utilisé l'hybridation spécifique des brins d'ADN ou d'ARN pour observer l'évolution, la présence ou la localisation du brin complémentaire ciblé, grâce à des *molecular*

*beacons* ce qui représente une révolution dans le domaine du marquage biomoléculaires. On peut citer :

- ✓ La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel *(Tyagi et al., 1998) (Tyagi et al., 1996)*,
- ✓ L'analyse génétique, notamment dans la détection et l'identification d'une erreur dans une séquence d'oligonucléotides *(Marras et al., 1999)*,
- ✓ Les « *DNA biosensors* » *(Liu & Tan, 1999)*,
- ✓ Les interactions protéine – ADN *(Li et al., 2000)*,
- ✓ La détection de l'ARN *in vivo* *(Matsuo, 1998)*,
- ✓ La détection d'enzymes.

Divers *molecular beacons* ont été synthétisés pour des applications en imagerie. Par exemple, l'équipe de Weissleder a synthétisé un MB constitué d'une polylysine sur laquelle sont greffés des peptides substrat de la MMP-2 et des fluorescéines pour réaliser l'imagerie des MMP-2 (Figure II.26) *(Bremer et al., 2001)*.

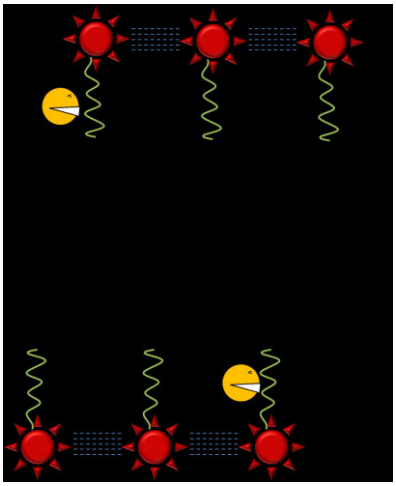


Figure II.26 : Schéma du *molecular beacon* clivé par les MMP-2 et MMP-9. Sur le squelette de polylysine est attaché le peptide GPLGVRGKC (en vert). Sur la lysine du peptide est greffé le fluorophore FITC (en rouge).

La même stratégie a été utilisée par *Chen et al.,* en 2005 utilisant le peptide SGKPRQITA substrat des MMP-2 et MMP-9 *(Chen et al., 2005)(Kridel et al., 2001)*.

Une autre stratégie ciblant les MMPs utilise une cyanine 5.5 (CY5.5), le peptide GPLGVRGKGG substrat des MMPs sur lequel est greffé le BHQ-3 (le Black Hole Quencher) *(Ryu et al., 2010)*.

Si les *molecular beacons* sont largement décrits dans la littérature, les photomolecular beacon pour des applications en PDT sont très peu étudiés et toutes les études décrites dans la litérature sont résumées dans le tableau II.2. Seules quatre équipes développent ces structures, dont la notre.

TableauII.2 : Les PMBs

| PS | Q | Lien | Cible | Ref. | Equipe |
|---|---|---|---|---|---|
| Pyrophéophorbide | Caroténoïde | GDEVDGSGK | Caspase-3 | **2004** *(Chen et al., 2004)* | **Zheng (Canada)** |
| Pyrophéophorbide | BHQ-3 | GDEVDGSGK | Caspase-3 | **2006** *(Steffolva et al., 2006)* | |
| Pyrophéophorbide | BHQ-3 | GPLGLARK | MMP-7 | **2007** *(Zheng et al., 2007)* | |
| Pyrophéophorbide | BHQ-3 | TSGPNQEQK | Fibroblastes | **2009** *(Lo et al., 2008)* | |
| Pyrophéophorbide | BHQ-3 | GPLGLARK – structure hairpin | MMP-7 | **2009** *(Chen et al., 2009)* | |
| Pyrophéophorbide | BHQ-3 | Phospholipide | Phospholipases | **2010** *(Popov et al., 2010)* | **Delikatny (Etats-Unis)** |
| Pyrophéophorbide | nanoparticules d'or | GPLGVRG | MMP-2 | **2012** *(Jang & Choi, 2012)* | **Choi (République de Corée)** |
| TPC-COOH | BBQ-650 | GPLGIAGQK | MMP-2 et MMP-9 | **2012** *(Verhille et al., 2012)* | **Notre équipe (France)** |

Le premier PMB développé par *(Chen et al., 2004)* est constitué d'une molécule de pyrophéophorbide-a liée à un caroténoïde grâce à un peptide spécifique de la caspase-3. La même équipe a continué le développement des PMBs et a synthétisé un PMB qui présente une structure en épingle de cheveux, ciblant l'ARN messager cRAF-1 avec le pyrophéophorbide-a comme photosensibilisateur et un caroténoïde comme *quencher* (Figure II.27) *(Chen et al., 2008)*. Par la suite, *(Lovel et al., 2010)* ont utilisé ce principe en améliorant la partie quencher et en synthétisant un PMB de structure épingle à cheveux (Figure II.28) utilisant le pyrophéophorbide-a comme PS et des BBQ comme quencher liés par le biais de liaisons phosphodiester. Cet assemblage permet une diminution

de fluorescence de 300 fois et une restauration de fluorescence d'environ 90 fois. D'autre part, la production d'oxygène singulet du PMB s'est révélée inférieure au seuil de détection.

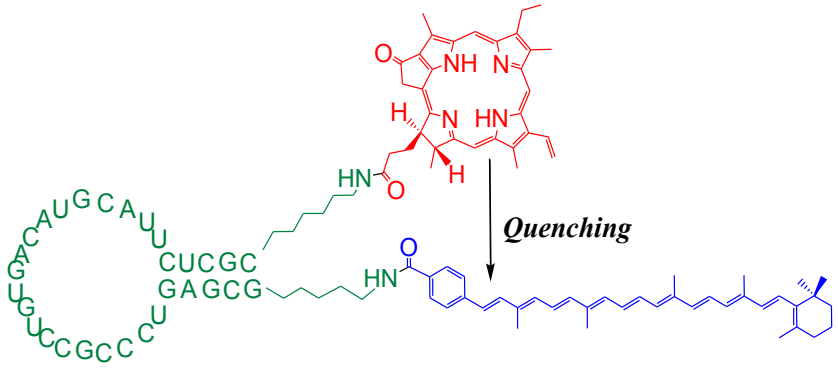



Figure II.27 : Oligonucléotide d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1.

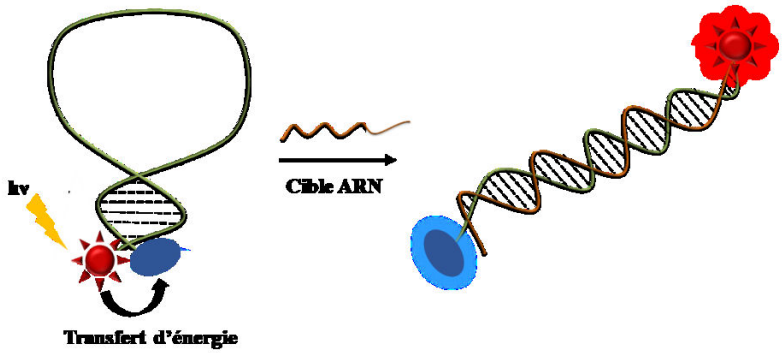



Figure II.28 : Oligonucléotides d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1.

Un autre PMB a été développé par l'équipe de Zheng de l'Université de Toronto ciblant les MMP-7 ; il est composé d'un PS (le pyrophéophorbide-a), un peptide GPLGLARK substrat de la MMP-7 et le BHQ-3 comme quencher. Ce PMB a été utilisé aussi pour la détection des métastases dans la colonne vertébrale issues du cancer du sein *(Liu et al., 2011)*.

D'autres PMBs ont été synthétisés gardant la structure épingle à cheveux ciblant l'ARNm de la survivine. *(Gao et al., 2011)* ont synthétisé un PMB comportant une chlorine e6 « quenchée» par le BHQ-3, et un deuxième PMB comportant deux entités chlorine e6 s'inhibant mutuellement. L'étude de la toxicité de ces deux PMBs sur une lignée cellulaire SK-BR-3 a révélé que le PMB comportant les deux chlorines présente l'efficacité photodynamique la plus élevée.

Une autre approche utilise les propriétés de quenching de nanoparticules d'or pour l'inhibition de la production d'oxygène singulet *(Jang & Choi., 2012)*. Le *molecular beacon* synthétisé (Figure II.29) est

formé d'une nanoparticule en or sur laquelle sont greffés des pyrophéophorbide-a *via* le peptide H-GPLGVRG-OH, spécifique de la MMP-2. Le PMB synthétisé présente une inhibition efficace de la fluorescence et de l'oxygène singulet. L'étude *in vitro* de l'effet photodynamique de ce PMB sur des cellules (-) BT20 et (+) HT1080 a révélé une survie cellulaire de 63% et 16 % respectivement.

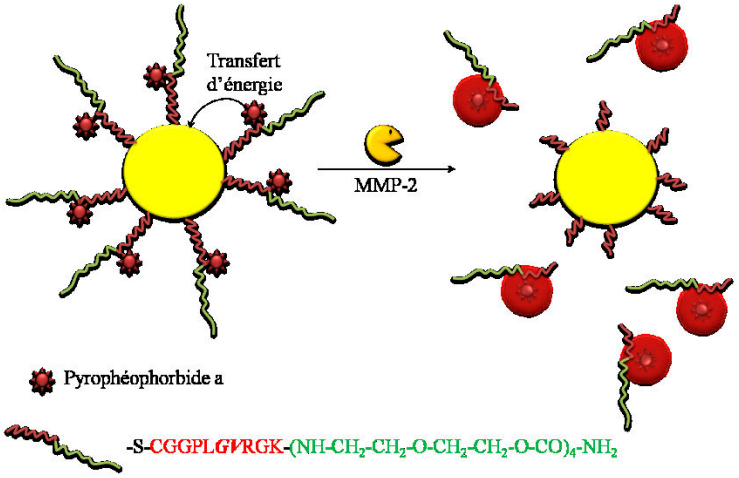



Figure II.29 : Schéma du PMB utilisant le pyrophéophorbide-a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPL*GV*RGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique).

Notre équipe s'est investie dans l'étude et l'amélioration du couple PS/quencher permettant une meilleure inhibition de la production d'oxygène singulet, pendant la thèse de M. Verhille (2008-2012) et la thèse d'A. Stallivieri (2012-2015). Au cours de ces travaux, une famille de PMB ciblant les MMP-2, 9 et 14 a été synthétisée à partir de différents PS, peptides et quenchers. L'utilisation d'espaceur sa été également abordée pour évaluer l'influence de la distance entre le PS et le quencher sur les propriétés photophysiques et l'activation enzymatique des PMB. La recherche de meilleurs quenchers est le sujet principal de cette thèse, qui vise à isoler de nouveaux caroténoïdes comme quenchers potentiels d'oxygène singulet pour des applications en particulier en PDT.

## II.5 Les caroténoïdes

### II.5.1 Propriétés anti-radicalaire des caroténoïdes

Les caroténoïdes ont un rôle clé dans la photosynthèse, transférant l'énergie lumineuse à la chlorophylle. Ces pigments participent aussi dans la photo-protection de l'appareil photosynthétique, en quenchant l'état triplet des chlorophylles, l'oxygène singulet et en inhibant les radicaux libres *(Böhm et al., 2012)*. La propriété caractérisant les caroténoïdes probablement la plus connue est leur

capacité d'absorber la lumière pour la transférer sous forme d'énergie radiative *(Krinsky, 1994)*. Les couleurs des fruits, légumes, la coloration du plumage de certains oiseaux ainsi chez certains invertébrés sont dues aux caroténoïdes.

### II.5.2 Les caroténoïdes comme antioxydants

Les caroténoïdes sont sensibles à l'oxydation mais relativement résistants à la réduction. La formation de radicaux peut être dûe soit à un effet quencher réducteur d'un état excité, soit à l'inhibition directe de radicaux libres. Les radicaux issus des caroténoïdes présentent une durée de vie courte. En général, la production de ces radicaux s'effectue selon quatre mécanismes : l'oxydation, la réduction, l'élimination d'un atome d'hydrogène et l'addition d'un autre atome d'hydrogène.

**(i) Par oxydation**

Les radicaux qui présentent un potentiel red/ox élevé peuvent arracher un électron à partir du caroténoïde pour donner un cation radical (équations 3 et 4).

$$CAR\text{-}e^- \rightarrow CAR^{\bullet +} \quad (3)$$

$$CAR + R^{\bullet +} \rightarrow CAR^{\bullet +} + R \quad (4)$$

**(ii) Par réduction**

L'addition d'un électron à une molécule de caroténoïde donne un anion radical par réaction de réduction (équation 5).

$$CAR + e^- \rightarrow CAR^{\bullet -} \quad (5)$$

**(iii) Par transfert d'un atome d'hydrogène**

L'élimination d'un atome hydrogène à partir d'un carbone saturé en position allylique de la chaîne polyène d'un caroténoïde peut générer un radical stabilisé par résonance, neutre, par clivage homolytique de la liaison C-H (équation 6).

$$CAR + ROO^{\bullet} \rightarrow CAR(-H)^{\bullet} + ROOH \quad (6)$$

**(iv) Par addition**

L'addition d'un radical, comme le radical peroxyde $ROO^{\cdot}$ ou le radical hydroxyle, sur la chaîne polyène peut générer un radical caroténoïde adduit (équation 7).

$$CAR + ROO^{\cdot} \rightarrow CAR^{\cdot}\text{-}OOR \qquad (7)$$

La chaîne polyène des caroténoïdes est hautement réactive ; ceci est dû au système conjugué riche en électrons. Ce chromophore est donc susceptible de subir des attaques électrophiles, généralement responsables de l'instabilité des caroténoïdes en solution en présence d'oxygène. *(Burton et Ingold, 1984)* ont proposé l'hypothèse que le β-carotène réagit avec les radicaux peroxydes en solution. Une réaction d'addition directe prend place pour former un radical avec un carbone asymétrique, qui peut ensuite réagir avec un autre radical peroxyde pour donner un produit non radical.

Dans un milieu où la concentration en oxygène est faible, ce mécanisme d'addition va consommer le peroxyde radical et le caroténoïde va se comporter comme un antioxydant. Cependant, à des concentrations élevées en oxygène, le radical caroténoïde peut réagir avec l'oxygène pour donner un caroténoïde radical peroxyde : on parle alors d'un processus d'auto-oxydation, le $CAR\text{-}OO^{\cdot}$ réagit comme un pro-oxydant (par exemple l'oxydation des lipides insaturés en présence des caroténoïdes) (équation 8).

$$CAR\text{-}OO^{\cdot} + LH \rightarrow CAR\text{-}OOH + L^{\cdot} \qquad (8)$$

$$L^{\cdot} O_2 \rightarrow L\text{-}OO^{\cdot}$$

La réaction des caroténoïdes avec les radicaux libres dépend de la nature du radical, la polarité du solvant et la nature du caroténoïde (nombre de doubles liaisons, présence de groupes hydroxyles).

### *II.5.2.1 Réaction des caroténoïdes radicaux*

- **Radical caroténoïde cation ($CAR^{\cdot +}$)**

a) Réaction avec les agents nucléophiles

On peut observer des réactions avec des agent nucléophiles pour les $CAR^{\cdot +}$ issues des caroténoïdes de petite chaîne polyène comme les rétinoïdes. La constante de vitesse de ces réactions diminue lorsque la chaîne polyène conjuguée augmente *(Bobrowski & Das, 1987)(Bobrowski & Das, 1985)*.

b) Réaction de dé-protonation

$$CAR^{\bullet+} \rightleftharpoons CAR^{\bullet} + H^{+} \quad (9)$$

c) Réactions avec les acides aminés et les peptides

Divers $CAR^{\cdot+}$ sont capables d'oxyder la tyrosine et la cystéine. Certains $CAR^{\cdot+}$ peuvent réagir réversiblement avec le tryptophane pour former le cation radical $TyrO^{\cdot+}$ *(Burke et al., 2001) (Edge et al., 2000)*.

$$CAR^{\bullet+} + TyrOH \longrightarrow CAR + TyrO^{\bullet} + H^{+} \quad (10)$$

$$CAR^{\bullet+} + CysH \longrightarrow CAR + Cys^{\bullet} + H^{+} \quad (11)$$

$$CAR^{\bullet+} + TrpH \rightleftharpoons CAR + Trp^{\bullet+} + H^{+} \quad (12)$$

d) Réaction avec les porphyrines

Certains dérivés de porphyrines comme la chlorophylle a, peuvent êtres oxydés en présence du $CAR^{\cdot+}$ suivant l'équation 13.

$$CAR^{\bullet+} + POR \longrightarrow CAR + POR^{\bullet+} \quad (13)$$

- **<u>Radical anion caroténoïde ($CAR^{\cdot-}$)</u>**

a) Réaction avec l'oxygène

Le anion radical caroténoïde est inhibé par l'oxygène, *via* un transfert d'électron, pour donner l'ion superoxide $O_2^{\cdot-}$. La constante de vitesse de cette réaction dépend de la chaîne polyène et diminue lorsque la chaîne polyène augmente (équation 14).

$$CAR^{\bullet-} + O_2 \longrightarrow CAR + O_2^{\bullet-} \quad (14)$$

b) Réaction avec les porphyrines

Les radicaux caroténoïdes anions réagissent avec les porphyrines *via* un transfert d'électrons suivant l'équation 15 *(Mc Vie et al., 1979)(Lafferty et al., 1976)*.

$$CAR^{\bullet -} + POR \longrightarrow CAR + POR^{\bullet -} \quad (15)$$

### *II.5.2.2 Effet quencher des caroténoïdes*

Le système de doubles liaisons qui forme la chaîne polyène des caroténoïdes est riche en électrons, ce qui engendre une forte réactivité des caroténoïdes pour les agents oxydants et les radicaux libres. Les caroténoïdes participent ainsi à la protection d'autres systèmes sensibles à l'oxydation, et jouent un rôle essentiel dans le système photosynthétique des plantes, algues et bactéries. On les trouve souvent associés avec les bactériochlorophylles sous forme d'un complexe spécifique caroténoïde-protéine. Ils participent ainsi dans la collection de la lumière pendant la photosynthèse. A des intensités élevées de lumière, l'énergie est absorbée avec un grand rendement ce qui peut mener à la photo-inhibition (perte de l'efficacité photosynthétique) et la formation de l'oxygène singulet.
Dans ce processus de quenching, la bactériochlorophylle va jouer le rôle d'un sensibilisateur (SENS) qui va absorber de la lumière pour générer un état singulet excité $^1$**SENS**$^*$ qui peut, par conversion intersystème, passer à un état triplet $^3$**SENS**$^*$ (équation 16).

$$SENS \xrightarrow{h\nu} {}^1SENS^* \longrightarrow {}^3SENS^* \quad (16)$$

En présence d'oxygène moléculaire, ceci peut générer de l'oxygène singulet par transfert d'énergie (équation 17).

$$^3SENS^* + {}^3O_2 \longrightarrow SENS + {}^1O_2{}^* \quad (17)$$

En présence de caroténoïdes, l'énergie de l'état triplet du $^3$**SENS**$^*$ peut être inhibée par transfert d'énergie (équation 18). De plus, les caroténoïdes peuvent réagir avec l'$^1O_2$ (équation 19).

$$^3SENS^* + CAR \longrightarrow SENS + {}^3CAR \quad (18)$$

$$^1O_2{}^* + CAR \longrightarrow {}^3O_2 + {}^3CAR^* \quad (19)$$

L'état triplet des caroténoïdes est de faible énergie faible et ne peut pas générer d'oxygène singulet. Il dissipe cette énergie sous forme de chaleur (equation 20).



(20)

$$^3CAR^* \longrightarrow CAR + Chaleur$$

Les caroténoïdes $C_{40}$ et leurs dérivés oxygénés (les xanthophylles) représentent la majorité des antioxydants naturels en inhibant l'oxygène singulet. Ce mécanisme de quenching peut être observé chez les plantes supérieures en présence de chlorophylle, ou en présence de protoporphyrine IX chez les animaux et l'être humain *(Böhm et al., 2012) (Britton et al., 2008) (Krinsky., 1994)*.

Dans un environnement aérobique, les caroténoïdes jouent un rôle protecteur en évitant la formation d'oxygène singulet par un quenching rapide de l'état triplet des chlorophylles, et en inhibant l'oxygène singulet formé. Au niveau membranaire, l'oxygène singulet oxyde les protéines et les lipides de la membrane, ce qui détruit l'appareil photosynthétique *(Britton et al., 2008)*. En effet, dans des conditions naturelles, toutes les chlorophylles forment des complexes avec les protéines et sont souvent liées à des molécules de caroténoïdes avec un ratio d'une molécule de caroténoïdes pour 3-4 chlorophylles. Ce mécanisme de protection est présent dans la majorité des organismes oxygénés, et est appelé quenching non-photochimique (Figure II.30).

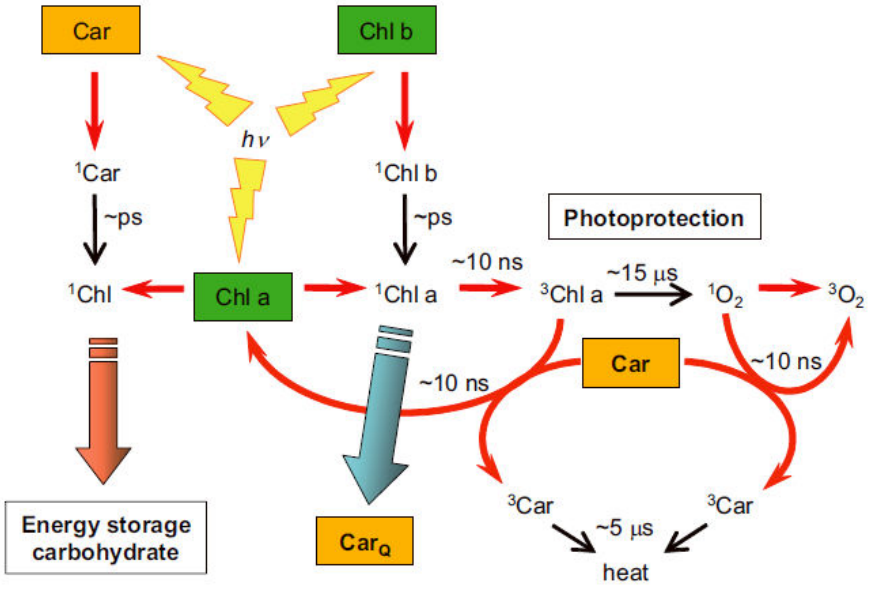



Figure II. 28 : Modèle de la dissipation de l'énergie des différents états excités des caroténoïdes et chlorophylles après excitation photonique, $Car_Q$ : mécanisme de quenching non photochimique NPQ *(Britton et al., 2008).*

Le β-carotène représente le quencher le plus connu parmi la famille des caroténoïdes. *Foote et al*, sont les premiers à avoir étudié les propriétés photophysique ainsi que les mécanismes de quenching de l'oxygène singulet. Ils ont montré que le quenching de l'oxygène singulet par le β-carotène peut se dérouler suivant deux mécanismes : (i) soit par quenching de l'état triplet du PS en inhibant la production d'oxygène singulet soit (ii) par action directe sur l'oxygène singulet lui-même *(Foote et al.,*

*1970a)(Foote et al., 1968)(Foote et al., 1970b)*. Ils ont prouvé que le *cis*-β-carotène pouvait s'isomériser en *trans*-β-carotène après transfert d'énergie avec l'oxygène.

En 1976, Foote a trouvé qu'une molécule de β-carotène peut inhiber de 250 à 1000 molécules d'oxygène singulet avec une vitesse de réaction de $1,3 \times 10^{10}$ $M^{-1}$ $S^{-1}$. Le transfert d'énergie de l'oxygène singulet vers un quencher résulte en la formation de l'oxygène à l'état triplet et un quencher à l'état triplet *(Min & Boff, 2002)*

Le quenching de l'oxygène singulet dépend de la nature et le nombre des groupements fonctionnels présents sur les cycles terminaux des caroténoïdes. *Kobayachi et Sakamoto* ont comparé l'activité de quenching du β-carotène et l'astaxanthine et ont montré que le quenching de l'astaxanthine diminue lorsque l'hydrophobie augmente. Cependant, celle du β-carotène augmente avec l'hydrophobie du solvant *(Min & Boff, 2002)*.

Une autre étude menée par *(Lee et Min, 1990)* sur le quenching de la réaction de photooxydation sensibilisée par la chlorophylle dans l'huile de soja, montre qu'il augmente suivant le nombre de doubles liaisons et la quantité de caroténoïde ajouté. Les caroténoïdes avec 7 doubles liaisons ou moins sont incapables de quencher l'état triplet de la chlorophylle *(Min & Boff, 2002)*. Récemment, une étude menée par *(Ramel et al., 2012)* s'intéresse au quenching chimique des caroténoïdes. Au cours de cette étude, différents produits générés par une oxydation *in vitro* du β-carotène et quelques xanthophylles par $^1O_2$ ont été identifiés (Figure II.31). *(Ramel et al., 2012)* confirment la formation d'un endoperoxyde comme le produit majeur issu de l'oxydation du β–carotène et des xanthophylles. Ainsi, il a été prouvé que l'$^1O_2$ est capable de cliver chaque double liaison de la chaîne polyène du β–carotène conduisant à la formation de divers caroténals. Les mêmes observations sont valables pour les xanthophylles. Le caroténoïde endoperoxyde est formé par réaction de cycloaddition de l'$^1O_2$ sur le caroténoïde. L'oxydation *in vitro* des xanthophylles (zéaxanthine et lutéine) montre que la vitesse de formation des formes aldéhydes pour la zéaxanthine et la lutéine est faible par rapport à la formation des caroténals, ce qui explique que les xanthophylles sont moins oxydable que les carotènes *(Ramel et al., 2012)*.

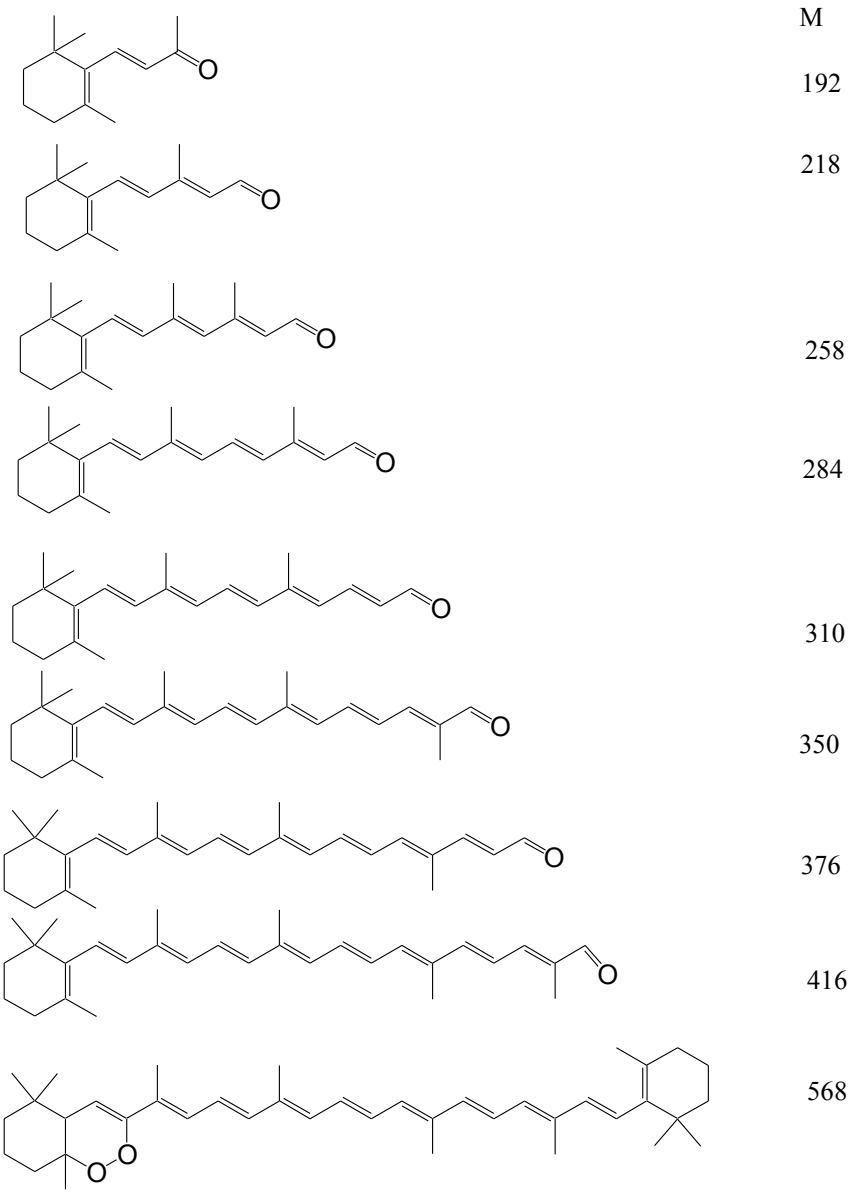



Figure II.31 : Molécules issues de l'oxydation du β–carotène par l'$^1O_2$ avec leur masse molaire correspondantes *(Ramel et al., 2012).*

*(Chen et al., 2004)* sont les premiers et les seuls à avoir utilisé les caroténoïdes comme quencher dans un PMB (Figure II. 32). Ils ont synthétisé un PMB formé d'un PS (pyrophéophorbide-a) lié à un peptide clivable par la caspase 3 (GDVDGSGK) et à un carotène synthétique. Cette étude a montré que la génération de l'oxygène singulet est inhibée par le caroténoïde, ainsi que l'état triplet du PS.

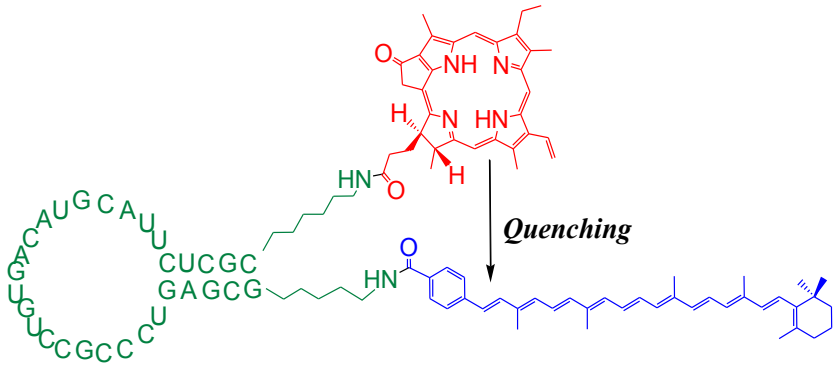



Figure II.32 : Structure du PMB contenant un caroténoïde comme quencher *(Chen et al., 2004)*.

### *II.5.2.3 Structure électronique des caroténoïdes*

En photosynthèse, les caroténoïdes servent d'antenne chromophorique au niveau du domaine spectral visible (500 nm) ou le spectre de la lumière solaire est très intense. Les fortes transitions de type électrique-dipôle permettent au caroténoïde de passer de l'état fondamental $S_0$ ($1^1A^-_g$) à l'état excité $S_2$ ($1^1B^+_g$) (Figure II. 33), suivi par un transfert d'énergie vers les états singulet $Q_X$ ou $Q_y$ des molécules photosensibles (chlorophylle, bactériochlorophylles, porphyrines….).

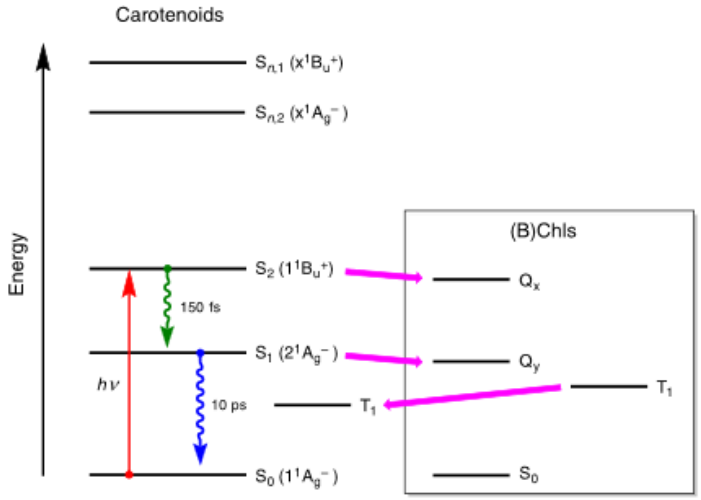



Figure II. 33 : Différents niveaux d'énergies d'excitation et de désexcitation des caroténoïdes en présence de la chlorophylle *(Beck et al., 2015)*.

Les caroténoïdes présentent une chaîne polyène conjuguée de $C_{40}$, et appartiennent au groupe de symétrie $C_{2h}$. Il a été démontré que l'état excité le plus bas des polyènes n'est pas l'état $B^+_u$ mais $A^-_g$, qui présente une faible énergie par rapport à l'état $B^+_u$. L'état $A^-_g$ présente la même symétrie que l'état fondamental $S_0$, la transition est donc interdite d'où l'attribution de $S_1$ et $S_2$ respectivement pour l'état $A^-_g$ et $B^+_u$. Le spectre d'absorption des caroténoïdes correspond aux transitions $S_0 \rightarrow S_2$. La

formation directe de l'état triplet $T_1$ des caroténoïdes à partir des états excités $S_2$ ou $S_1$ *via* le croisement intersystème n'est pas favorable *(Britton., 1995)(Jomova & Valko., 2013)(Britton et al., 2008)*.

### II.5.3 Rôle des caroténoïdes dans la prévention du cancer

Il a été montré que les caroténoïdes sont impliquées dans la prévention du cancer, depuis 1981, lorsque *Peto et al.,* expliquent que la prévention du cancer peut se faire *via* un régime riche en β-carotène. Depuis 1984, les études sur l'implication des caroténoïdes dans la prévention du cancer sont nombreuses.

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la présence de divers cancers et le taux de caroténoïdes présents dans le sang. Une étude mené par *(Blot et al., 1993)*, a montré qu'un régime riche en β-carotène, vitamine E et sélénium mène à une réduction significative de la mortalité par le cancer entre 13% et 21% dans le cas du cancer d'estomac.

#### α et β-carotènes

Une étude menée sur des modèles animaux *(Murakoshi et al., 1992) (Narizawa et al., 1996)*, montre que le α-carotène possède une activité plus élevée que le β-carotène dans la surpression de la tumorigenèse au niveau de la peau, du poumon, foie et du colorectum.

#### β-cryptoxanthine

Il a été reporté qu'un régime riche en β-cryptoxanthine affecte la carcinogenèse du colon après une accumulation au niveau de la mucose clonique. Des études menées sur des rats ont montré que l'administration de 25 ppm de β-cryptoxanthine pendant 30 semaines dans le régime nutritionnel supprime la *N*-méthylnitrosourée, responsable du cancer du colon *(Narizawa et al., 1999)*.

#### Lycopène

Le lycopène est un carotène acyclique linéaire qui présente des effets inhibiteurs pour certains cancers (côlon, et vessie). Un apport élevé en lycopène est associé à des risques faibles de divers cancers, puisque le lycopène peut être converti en acide apolycopénoïque par clivage à des carotènes ou grâce à l'enzyme oxygénase pour donner l'acide apo-10'-lycopénoïque qui représente un inhibiteur du cancer de vessie *in vivo* et *in vitro* *(Hu et al., 2006) (Lian et al., 2007)*. D'autre part, un apport en lycopène diminue le risque du cancer de prostate à 53% *(Giovannucci et al., 2002)*. Dans une autre étude menée sur un modèle humain, les auteurs ont montré que l'apport quotidien de 30 mg de lycopène diminue la croissance du cancer de prostate. L'apport de 30 mg de lycopène par jour

augmente sa concentration au niveau du sérum et de la prostate 2 fois et 2,9 fois respectivement, et l'antigène spécifique de la prostate (PSA) a diminué de 17 % *(Kucuk et al., 2001)*.

Lutéine et zéaxanthine

Dans une étude de 14 ans menée sur 120 000 hommes et femmes en Amérique, une réduction significative de risque de cancer du poumon a été observée chez les patients qui présentent un apport élevé en caroténoïdes contenant de la lutéine et de la zéaxanthine *(Michaud et al., 2000)*. Une étude a montré qu'un apport de 0,002 % du régime quotidien chez des souris inhibe la croissance et la latence des tumeurs mammaires *(Park et al., 1998).*

Fucoxanthine

Différents études *in vitro* ont démontré les effets inhibiteurs de la fucoxanthine sur une lignéede cellules tumorales humaine développées dans le foie (HepG2) *(Das et al., 2008)*, côlon (Caco-2, HT-29 et DLD-1) *(Hosokawa et al., 2004)* et la vessie *(Zhang et al., 2008)*. L'activité anticancéreuse du fucoxanthine est basée sur l'effet régulateur des biomolécules liées au cycle cellulaire et à l'apoptose *(Miyashita et al., 2011) (Liu et al., 2009)*.

## II.6 Contexte et objectif : l'utilisation des caroténoïdes comme inhibiteurs d'$^1O_2$ pour des applications potentielles en PDT

Comme nous l'avons décrit, la Thérapie Photodynamique (PDT) est une technique non-invasive de traitement de certains cancers, mettant en jeu l'activation d'une molécule photo-activable le photosensibilisateur ou PS, en présence d'oxygène. Après irradiation lumineuse du PS, des espèces réactives de l'oxygène sont générées dont l'oxygène singulet ($^1O_2$), supposé être le principal agent cytotoxique. Afin d'améliorer la sélectivité du traitement, nous développons un agent photodynamique appelé « *photodynamic molecular beacon* » (PMB), conçu pour ne pas exprimer ses propriétés photodynamiques jusqu'à ce qu'il ait atteint sa cible biologique. Le photosensibilisateur est associé *via* un peptide à un inhibiteur d'$^1O_2$, permettant une inhibition de la formation d'$^1O_2$ tant que le composé n'a pas atteint sa cible, à savoir les cellules cancéreuses.

Les propriétés photophysiques particulières des caroténoïdes et leur pouvoir inhibant d'oxygène singulet représente un atout dans leur utilisation comme quencher d'$^1O_2$ en PDT. L'objectif de cette étude est d'évaluer le pouvoir inhibant de certains caroténoïdes extraits des fruits de *Diospyros kaki. L*, *Prunus armeniaca. L* et *Prunus persica. L* cultivées en Tunisie.

Ces fruits présentent des propriétés antioxydantes potentiellement intéressantes. Afin de valoriser ces fruits, l'objectif de la thèse est d'extraire, d'analyser et d'identifier les caroténoïdes présents dans les fruits. Une utilisation potentielle de ces caroténoïdes serait leur couplage à des photosensibilisateurs, en vue d'une application en thérapie photodynamique ciblée.

- **Verrous**

1. Maîtriser l'extraction des caroténoïdes par différents techniques, utilisant des plans d'expériences afin de déterminer les paramètres clés de l'extraction.
2. Identification des caroténoïdes
3. Analyser leurs propriétés photophysiques

- **Démarche**

Afin de maîtriser l'extraction des caroténoïdes, trois procédés d'extraction ont été choisies, l'extraction conventionnelle (par solvant organique), l'extraction accélérée avec solvant (ASE), et l'extraction par fluide supercritique. Après optimisation des méthodes d'extraction, l'identification des caroténoïdes s'avère une étape clé dans notre démarche qui va nous donner une idée claire sur les profiles caroténoïdiques de nos fruits. La purification des caroténoïdes va nous permettre ensuite d'étudier les propriétés photophysiques des principes actifs purifiés. La Figure II.34 représente le schéma simplifié de la démarche adaptée dans notre étude.

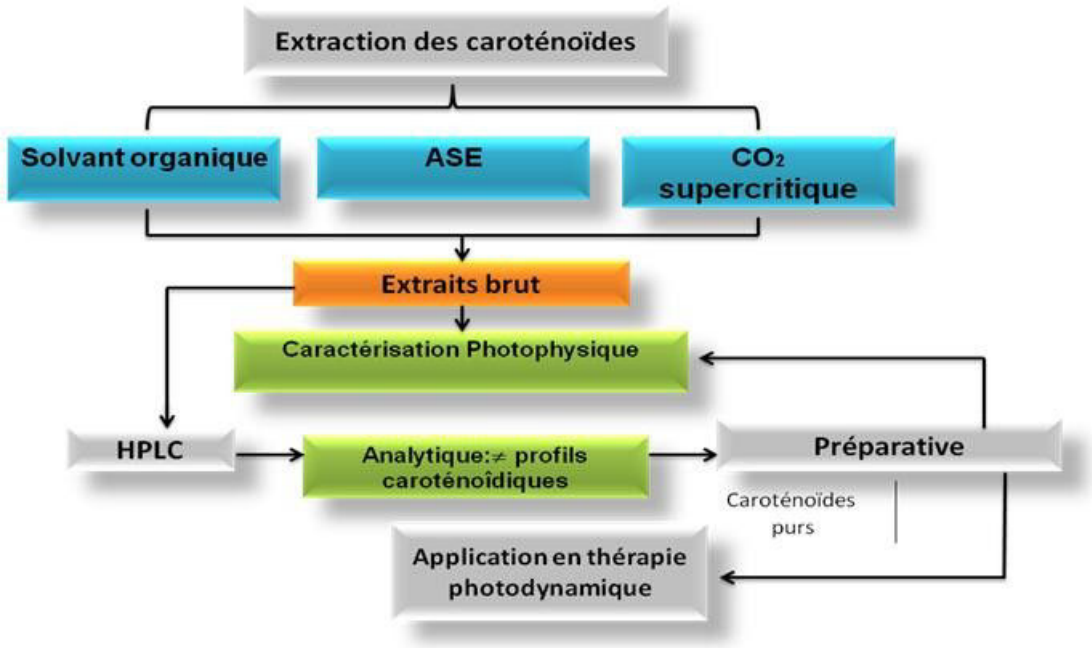



Figure II. 34 : Schéma simplifié de la démarche adaptée dans notre étude.

# Références


Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M. The history of photoprotection and photodynamic therapy. Photochemistry and Photobiology. (2001). 74 (5). 656-669.

Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O., Hahn S. M., Hamblin M. R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Morz P., Nowis D., Piette J., Wilson B. C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA: A Cancer Journal for Clinicians. (2011). 61 (4). 250-281

Arnold S. J., Kubo M., and Ogryzlo E. A. Relaxation and reactivity of singlet oxygen. Advances in Chemical Research. (1968). 77. 133.

Baltazar L. M., Ray A., Santos D. A., Cisalpino P. S., Friedman A. J., and Nosancshuk J. D. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. Frontiers in Microbiology. (2015). (6). 202.

Baltazar Lde. M., Soares B. M., Carneiro H. C., Avila T. V., Gouveia L. F., Souza D. G., Ferreira M. V., Pinotti M., Santos Dde. A., Ciaslpino P. S. Photodynamic inhibition of trichophyton rubrum: in vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. (2013). 68 (2). 354-361.

Beck W. F., Bishop M. M., Roscioli J. D., Chosh S., Frank H. A., Excited state conformational dynamics in carotenoids : Dark intermediates and excitation energy transfer. Archives of Biochemistry and Biophysics. (2015). 572. 175-183.

Beduneau A., Saulnier P., Hindre F., Clavreul A., Leroux J.C., Benoit J. P. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and Fab'fragments. Biomaterials. (2007). 28. 4978-4990.

Berger A. P., Steiner H., Akkad T., Bartsch G., Holtl L. Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-amino-levulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. Urology. (2003). 61. 338-341.

Berr F. Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. Seminars in Liver Disease. (2004). 24. 177-187.

Bessler N. M. VAM study committee. Verteporfin therapy in age-related macular degeneration (VAM): an open-label multicenter photodynamic therapy study of 4,435 patients. (2004). 24. 512-520.

Böhm F., Edge R., Truscott T. G. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen ($^1O_2$) and free radicals: potential effects for human health. Acta Biochimica Polonica. (2012). 59 (1). 27-30.

Böhm F., Edge R., Truscott, T.G. Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: potential effects for human health. Molecular Nutrition and Food Research. (2012). 56. 205-216.

Boisbrun M., Vanderesse R., Engrand P., Olié A., Hupont S., Regnouf-de-Vains J. B., Frochot C. Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins porphyrins. Tetrahedron. (2008). 64. 3494-3504.

Bolt W. J., Li J. Y., Taylor P. R., Guo W., Dawsey S., Wang G. Q., Yang C.S., Zheng S. F., Gail M., Li G. Y., et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. Journal of the National Cancer Institute. (1993). 85. 1483-1492.

Bown S. G., Rogowska A. Z., Whitelaw D. E., Lees W. R., Lovat L. B., Ripley P., Jones l., Wyld P., Gillams A., Hatfield A. W. R. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. Gut. (2002). 50. 549-557.

Bremer C., Bredow S., Mahmood U., Weissleder R., Tung C. H. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. Radiology. (2001). 221. 523-529.

Brevet D., Gary-Bobo M., Raehm L., Richeter S., Hocine O., Amro K., Loock B., Couleaud P., Frochot C., Morère A., Maillard P., Garcia M., Durand J. O. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticules for photodynamic therapy. Chemistry Communication. (2009). 12. 1475-1477.

Britton G., Liaaen Jensen S., Pfander H. Carotenoids (Volume 4: Natural Functions). (2008). Birkhäuser-Verlag, Basel-Boston-Berlin. ISBN: 3-7643-7498-3.

Britton, G. Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. FASEB Journal. (1995). 9 (15). 1551-1558.

Brooks P. C., Clark A. R. F., and Cheresh D. A. Requirement of vascular integrin α(v)β3 for angiogenesis. Science. (1994). 264 . 569-571.

Burton C. W., Ingold K. U. β-carotene, an anusual type of lipid antioxidant. (1984). Science 224. 569-573.

Cairnduff F., Stringer M. R., Hudson E. J., Ash D. V., Brown S. B. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. British Journal of Cancer. (1994). 69 (3). 605-608.

Capasso L.L. Antiquity of cancer. International Journal of Cancer. (2005). 113. 2-13.

Chen B., Pogue B. W., Hoopes P. J., Hasan T. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression. (2006). 16 (4). 279-306.

Chen J., Liu T. W., Lo P. C., Wilson B. C., Zheng G. "Zipper" molecular beacons: a generalized strategy to optimize the performance of activatable protease probes. Bioconjugate Chemistry. (2009). 20 (10). 1836-42.

Chen J., Lovell J. F., Lo P-C., Stefflova K., Niedre M., Wilson B. C., Zheng G. A tumor mRNA-triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotide hairpin control of singlet oxygen production. Photochemistry and Photobiology. (2008). 7. 775-781.

Chen J., Steffolva K., Niedre M. J., Wilson B. C., Chance B., Glickson J. D., Zheng G. Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation. The Journal of the American Chemical Society. (2004). 126. 11450-11451.

Chen J., Tung C-H., Allport J. R., Chen S., Weissleder R., Huang P. L. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. Circulation. (2005). 111. 1800-1805.

Chen R., Ta V. D., Xiao F., Zhang Q., Sun H. Multicolor hybrid upconversion nanoparticules and their improved performance as luminescence temperature. Small. (2013). 9 (7). 1052-1057.

Cheng L., Yang K., Li Y., Chen J., Wang C., Shao M., Lee S. T., Liu Z. Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobes for multimodal imaging and Dual-targeted photothermal therapy. Angewandte Chemie International Edition. (2011). 50. 7385-7390.

Cheresh D. A. Structure, function and biological properties of integrin alpha v beta 3 on human melanoma cells. Cancer Metastasis Review. (1991). 10. 3-10.

Crimes P., E. Psoralen photochemotherapy for vigitilio. Clinics in Dermatology. (1997). 15. 921-926.

Das S. K., Hashimoto T., Kanazawa K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. Biochimica et Biophysica Acta. (2008). 1780. 743-749.

David A.R. Zimmerman M.R., Cancer: an old disease, a new disease or something in between? Science and Society. (2010). 10. 728-733.

Deckert P.M. Current constructs and targets in clinical development for antibody-based cancer therapy. Current Drug Targets. (2009). 10. 158-175.

Denis T. Gst., Hamblin M.R. Synthesis, bioanalysis and biodistrubition of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. Bioanalysis. (2013). 5 (9). 1099-1114.

DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coordination Chemistry Reviews. (2002). 351-371.

Desgrosellier J.S., Cheresh, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Cancer. (2010). 10. 9-22.

Di Stasio B., Frochot C., Dumas D., Even P., Zwier J., Müller A., Didelon F., Viriot M. L., Barberi-Heyob M. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. European Journal of Medicinal Chemistry. (2005). 40 (11). 1111-1122.

Djordjevic S., Driscoll P. C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. Drug Discovery Today. (2013). 18 (9-10). 447-455.

Dougherty J. T., Kaufman J. E., Goldfarb A., Weishaupt K. R., Boyle D., Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Research. (1978). 38. 2628-2635.

Dougherty J.T., Gomer C.J., Henderson, B.W. Photodynamic therapy. Journal of the National Cancer Institute. (1998). 99 (12).

El-Akra N., Noirot A., Faye J. C., Souchard J. P. Synthesis of estradiol-pheophorbid a conjugates: evidence of nuvlear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells. Photochemical & Photobiological Sciences. (2006). 5. 996-999.

Ell C., Gossner L., May A., Schneider H. T., Hahn E. G., Stolte M., Sroka, R. Photodynamic ablation of early cancers of the stomach by means of mTHPC and laser irradiation: preliminary clinical experience. Gut. (1998). 43. 345-349.

Fay F., Scott C. J. Antibody-targeted nanoparticules for cancer therapy. Immunotherapy. (2011). 3. 381-394.

Ferguson A. T., Lapidus R. G., Davidson N. E. The regulation of estrogen receptor expression and function in human breast cancer. Cancer Treatment and Research. (1998). 94. 255-278.

Figge F.H.J. Wichterman R., Effect of Hematoporphyrin on X-radiation sensitivity in Paramecium. Science. (1955). 122. 468-469.

Foote C. S., Chang Y. C., Denny R. W. Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. Journal of American Chemical Society. (1970a). 92. 5216-5218.

Foote C.S., Chang Y.C., Denny R.W. Chemistry of singlet oxygen XI. Cis trans isomerization of carotenoids by single oxygen and a probable quenching mechanism. Journal of the American Chemical Society. (1970c). 92. 5218-5219.

Foote C.S., Denny R.W., Weaver,L., Chang D.Y., Peters B.J. Quenching of singlet oxygen. Annals of the New York Academy of Sciences. (1970b). 171. 139-148.

Foote C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. Science. (1968). 162. 963-970.

Friedberg J.S., Culligan M. J., Mick R., Stevenson J., Hahn S. M., Sterman D., Punekar S., Glatstein E., Cengel K. Radical pleurectomy and intraoperative photodynamic therapy for malignant pleural mesothelioma. The Annals of Thoracic Surgery. (2012). 93 (5). 1658-1667.

Frochot C., Di Stasio B., Barberi-Heyob M., Carre M. C., Zwier J. M., Guillemin F., Viriot M. L. New glycosylated porphyrins for PDT applications. Oftalmologia. (2003). 56 (1). 62-66.

Frochot C., Di Stasio B., Vanderesse R., Belgy M. J., Dodeller M., Guillemin F., Viriot M. L., Barberi-Heyob M. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. Bioorganic Chemistry. (2007). 35 (3). 205-220.

Gannon M.,J. Brown S.,B. Photodynamic therapy and its applications in gynaecology. British Journal of Obstetrics and Gynaecology. (1999). 106. 1246-1245.

Gao Y., Qiao G., Zhuo, L., Li N., Liu Y., Tang, B. A tumor mRNA-mediated bi-photosensitizer molecular beacon as an efficient imaging and photosensitizing agent. Chemical Communications. (2011). 47. 5316-5318.

Garanger E., Boturyn D., Dumy P. Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry. (2007). 7. 552-558.

Gary-Bobo M., Hocine O., Brevet D., Maynadier M., Rahem L., Richeter S., Charasson V., Loock B., Morère A., Maillard P., Gracia M., Durand J. O. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. International Journal of Pharmaceutics. (2012). 423. 509-515.

Gary-Bobo M., Mir Y., Rouxel C., Brevet D., Hocine O., Maynadier M., Gallud A., Da Silva A., Mongin O., Blanchard-Desce M., Richeter S., Loock B., Maillard P., Morère M., Garcia M., Raehm L., Durand J. O. Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. International Journal of Pharmaceutics. (2012). 432. 99-104.

Gertner M. R., Bogaards A., Weersink R. A., McCluskey S.A., Haider M. A., Yue C. K. K., Savard J., Simpson S., Brun P. H., Cohen P., Scherz A., Salomon Y., Aprikian A. G., Elhilali M. M., Wilson B. C., Trachtenberg J. Initial results of a phase III trial of WST09-mediated photodynamic therapy (WST09-PDT) for recurrent prostate cancer following failed external beam radiation therapy (EBRT). European Urology Supplements. (2004). 3. 212-221.

Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E. B., Stampfer M. J., Colditz G. A., Willett W. C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. Journal of the National Cancer Institute. (1995). 87. 1767-1776.

Gravier J., Schneider R., Frochot C., Bastogne T., Schmitt F., Didelon J., Guillemin F., Barberi-heyob M. Improvment of meta-tetra(hydroxyphenyl) chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies. Journal of Medicinal Chemistry. (2008). 51 (13). 3867-3877.

Greer A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [$^1O_2$ ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions. Accounts of Chemical Research. (2006). 39 (11). 797-804.

Gregorie H. B., Horger E. O., Ward J. L., Green J. F., Richards T., Robertson H. C., Stevenson T. B. Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. Anals of Surgery. (1968). 167 (6).

Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. Photochemical and Photobiological Sciences. (2004). 3. 436-450.

Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. (1996). 86 (3). 353-64.

Hausmann W. Die sensibilisierende wirkung des hamatoporphyrins. Biochemische Zeitschrift. (1991). 30. 276-316.

Herzberg G. Molecular Spectra and Molecular Structure I: Spectra of Diatomic Molecules. 2nd ed., VonNostrand, New York 1950.

Hillemanos P., Korell M., Schmitt-Sody M., Baumgartner R., Beyer W., Kimming R., Untch M., Hepp H. Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasma using topically applied 5-aminolevulinic acid. International Journal of Cancer. (1999). 81. 34-38.

Hong M., Zhhu S., Jiang Y., Tang G., Pei Y. Efficient tumor targeting of hydroxycamptothecin loaded PEGylated niosomes modified with transferrin. Journal of Controlled Release. (2009). 133. 96-102.

Hu K.Q., Liu C., Ernst H., Krinsky N. I., Russell R.M. Wang X.D. The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vivo and in vitro. The Journal of Biological Chemistry. (2006). 281. 19327-19338.

Huang K., Andersson C., Roomans G. M., Ito N., Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. (2001). 33 (4). 315-24.

Huang P., Lin J., Wang S., Zhou Z., Li Z., Wang Z., Zhang C., Yue X., Niu G., Yang M., Cui D., Chen X. Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy. Biomaterials. (2013). 34 (19). 4643-4654.

Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. Technology in Cancer Research Treatment. (2005). 4 (3). 283-293.

Huang Z., Chen Q., Luck D., Bekers J., Wilson B. C., Trmcic N., LaRue S. M., Blanc D., Hetzel F. W. Studies of a vascular-acting photosensitizer, Pd-bacteriopheophorbide (tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer. Lasers in Surgery and Medicine. (2005). 4(3). 283-293.

Huang Z., Chen Q., Trmcic N., LaRue S. M., Brun P. H., Wilson B. C., Shapiro H., Hetzel F. W. Effects of Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD)-mediated photodynamic therapy on canine prostate pretreated with ionizing radiation. Radiation Research. (2004). 161. 723-731.

Jang B., Choi Y. Photosensitizer-conjugated gold for enzyme-activatable fluorescence imaging and photodynamic therapy. Theranostics. (2012). 2. 190-197.

Jomova K., Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. European journal of medicinal chemistry. (2013). 70. 102-110 .

Juzeniene A., Juzenas P., Ma L.W., Iani V., Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. Lasers in Medical Science. (2004). 19. 139-149.

Kato H., Harada M., Ichinose S., Usuda J., Tsuchida T., Okunaka T. Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. (2004). 1. 49-55.

Kato H., Konaka C., Ono J., Kawate N., Nishimiya K., Shinohara H., Saito M., Sakai H., Noguchi M., Kito T. Preoperative laser photodynamic therapy in combination with operation in lung cancer. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. (1985). 90. 420-429.

Keam S.J., Scott L.J., Curran M.P. Vertoporfin: a review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularisation. Drug. (2003). 63. 2521-2554.

Khan A.U., Kasha M. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. The Journal of Chemical Physics. (1963). 39 (8). 2105-2106.

Kim K.H., Park J.J. The photodynamic therapy in upper-gastrointestinal malignant diseases. Gut and Liver. (2010). 4. 39-43.

Kobayachi M., Sakamoto Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthan esters from the green alga Haematococcus pluvialis. Biotechnology letter.(1999). 21. 265-269.

Kojda G., Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? Cardiovascular Research. (2005). 67 (2). 187-197.

Koo H., Lee H., Lee S., Min K. H., Kim M. S., Lee D. S., Choi Y., Kwon I. C., Kim K., Geong S. Y. In vivo tumor diagnosis and photodynamic therapy via tumoral pH-responsive polymeric micelles. Chemical communications (Camb). (2010). 46. 5668-5670.

Krasnovsky A. A. Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen; History of development and modern status of research. Biochemistry (Moscow). (2007). 72 (10). 1065-1080.

Kridel S. J., Chen E., Kotra L. P., Howard E. W., Mobashery S., Smith J. W. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. The Journal of Biological Chemistry. (2001). 276. 20572-20578.

Kriegmair M., Baumgartner R., Lumper W., Waidelich R., Hofstetter A. Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. British Journal of Urology. (1996). 77. 667-671.

Krinsky N. I. Membrane antioxidants. Anals of the New York Academy of Sciences. (1988). 551. 17-33.

Krinsky N. The biological properties of carotenoids. Pure and Applied Chemistry. (1994). 66 (5). 1003-1010.

Kucuk O., Sakar F.H., Sakr W., Djuric Z., Pollak M.N., Khachik F., Li Y. W., Banerjee M., Grignon D., Bertram J.S., et al. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. (2001). 10. 861-868.

Lafferty J., Edward J., Land E.J., Truscott T. G. Electron-transfer reactions involving chlorophyll a and carotenoids. (1976). 70-71.

Laville I., Figueiredo T., Loock B., Pigaglio S., Maillard Ph., Grierson D.S., Carrez D., Croisy A., Blais J. Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra (meta-hydroxyphenyl)chlorins. Bioorganic and Medicinal Chemistry. (2003). 11. 1643-1652.

Laville I., Pigalio S., Blais J-C., Loock B., Maillard P., Grierson D.S., Blais J. A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoral cells : a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Bioorganic & Medicinal Chemistry. (2004). 12. 3673-3682.

Leamon C.P., Reddy J.A. Folate-targeted chemotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews. (2004). 56. 1127-1141.

Lee S.H., Min D.B. Effects, quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. Journal of Agricultral Food Chemistry. (1990). 38. 1630-1634.

Lee S.J., Koo H., Lee D-E., Min S., Lee S., Chen X., Choi Y., Leary J.F., Park K., Jeong S. Y., Kwon I.C., Kim K., Coi K. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/of system. Biomaterials. (2011). 32. 4021-4029.

Li F., Na K. Self-assembled chlorin e6 conjugated chondroitin sulfate nanodrug for photodynamic therapy. Biomacromolecules. (2011). 12. 1724-1730.

Li J. J., Fang X., Schuster S. M., Tan W. Molecular beacons: a novel approach to detect protein-DNA interactions. Angewandte Chemie. (2000). 112. 1091-1094.

Li Z., Zhang Y., Jiang S. Multicolor core/shell-structure upconversion fluorescent nanoparticles. Advanced Materials. (2008). 20. 4765-4769.

Lian F., Smith D. E., Ernst H., Russell R. M., Wang X. D. Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo. Carcinogenesis. (2007). 28. 1567-1574.

Lim J.I., Photodynamic therapy for Choroidal neovascular disease: photosensitizers and clinical trials. Ophtalmology Clinics of North America. (2002). 15. 473-478.

Lin M., Zhao Y., Wang S., Liu M., Duan Z. F., Chen Y. M., Li F., Xu F., Lu T. Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticules for biomedical applications. Biotechnology Advances. (2012). 30. 1551-1561.

Lipson R. L., Baldes E. J., Gray M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Cancer. (1967). 20 (12). 2255-2257.

Liu C.L., Huang Y.S., Hosokawa M., Miyashita K., Hu M.L. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. Chemico-Biological Interactions. (2009). 182. 165-172.

Liu K., Wang Y., Kong X., Liu X., Zhang Y., Tu Z., Ding Y., Alders M. C. G., Buma W. J., Zhang H. Multispectral upconversion luminescence intensity ratios for ascertaining the tissue imaging depth. Nanoscale. (2014). 6. 9257-9263.

Liu T. W., Akens M. K., Chen J., Wise-Milestone L., Wilson B.C., Zheng G. Imaging of specific activation of photodynamic molecular beacons in breast cancer vertebral metastases. Bioconjugate Chemistry. (2011). 22. 1021-1030.

Liu X., Tan W. Afiber-optic evanescent wave DNA biosensor based on novel molecular beacons. Analytical Chemistry. 71. 5054-5059.

Lo P.C., Chen J., Stefflova K., Warren M.S., Navab R., Bandarchi B., Mullins S., Tsao M., Cheng J.D., Zheng G. Photodynamic molecular beacon triggered by fibroblast activation protein on cancer-

associated fibroblasts for diagnosis and treatment of epithelial cancers. Journal of Medicinal Chemistry. (2009). 52 (2). 358-68.

Lou P.J., Jones L., Hooper C. Clinical Outcomes of photodynamic therapy for head-and-neck cancer. Technology in Cancer Research and Treatment. (2003). 2. 311-317.

Lovell J.F., Chen J., Huynh E., Jarvi M.T., Wilson B.C., Zheng G. Facile synthesis of advanced photodynamic molecular beacon architectures. Bioconjugate Chemistry. (2010). 21. 1023-1025.

Lowdell C.P., Ash D.V., Driver I., Brown S.B. Interstitial photodynamic therapy. Clinical experience with diffusing fibres in the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors. British Journal of Cancer. (1993). 67. 1398-1403.

Lui H., Salasche S., Kollias N., Wimberly J., Flotte T., McLean D., Anderson R. R. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical aminolevulinic acid: a clinical and histologic study. Archives of Dermatology. (1995). 131 (6). 737-745.

Lusting R.A., Vogl T.J., Fromm D., Cuenca R., His A.R., D'Cruz A. K., Krajina Z., Turic M., Singhal A., Chen J.C. A multicenter phase I safety study of intratumoral photoactivation of talaporfin sodium on patients with refractory solid tumors. Cancer. (2003). 98. 1767-1771.

MacCormack M. A. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. Seminaris in Cutaneous Medicine and Surgery. (2007). 27 (1). 52-62.

Maillard P., Gaspard S., Guerquin-Kern J. L., Momenteau M. Glycoconjugated tetrapyrolic macrocycles. Journal of the American Chemical Society. (1989). 111 (25). 9125-9127.

Maillard P., Loock B., Grierson D. S., Laville I., Blais J., Doz F., Desjardins L., Carrez D., Guerquin-Kern J. L., Croisy A. In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. Photodiagnosis and Photdynamic Therapy. (2007). 4. 261-268.

Marras S.A., Russell E., Kramer F., Tyagi S. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. (1999). 14. 151-156.

Matsuo T. In situ visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells. Biochimica et Biophysica Acta. (1998). 1379. 178-184.

McBridge G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy. Journal of the National Cancer Institute. (2002). 94. 1740-1742.

McVie J., Sinclair R.S., Truscott T.G. Triplet states of cooper and metal-free phtalocyanines. . Journal of Chemical Society: Faraday Transactions. (1978). 74. 1870-1879.

Medina R.A., Owen G.I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Biological Research. (2002). 35. 9-26.

Merkel P.B., Kearns D.R., Remarkable solvent effects on the lifetime of $^1\Delta_g$ oxygen. Journal of the American Chemical Society. (1972). 94. 1029-1030.

Michaud D.S., Feskanich D., Rimm E.B., Colditz G.A., Speizer F.E. Willett W.C., Giovannucci E. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. The American Journal of Clinical Nutrition. (2002). 227. 864-868.

Min D.B., Boff J.M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. (2002). 1 (2). 58-72.

Miyashita K., Nishikawa S., Beppu F., Tsukui T., Abe M., Hosokawa M. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. Journal of the Science of Food and Agriculture. (2011). 91. 1166-1174.

Moan J., Sommer S. Oxygen Dependence of the Photosensitizing Effect of Hematoporphyrin Derivative in NHIK 3025 Cells1. Cancer Research. (1985). 45. 1608-1610.

Moan J., Peng Q. Chapter I: An outline of the history of PDT. from Photodynamic therapy. (2003). ISBN: 978-0-85404-306-4.

Momenteau M., Maillard P., De Bélinay M.A., Carrez D., Croisy A. Tetrapyrrolic glycosylated macrocycles for an application in PDT. Journal of Biomedical Optics. (1999). 4. 298-318.

Morosini V. Pour une amélioration de la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie: potentialités des dendrimères poly(aminodoamine) et des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique, in Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement (2010), Université de Lorraine. p. 263.

Murakochi M., Nishino H., Satomi Y., Takayasu J., Haseqawa T., Tokuda H., Iwashima A., Okuzumi J., Okabe H., Kitano H., and Iwasaki R. Potent preventive action of α-carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by α-carotene than β-carotene. Cancer Research. (1992). 52. 6583-6587.

Murphy L.C., Dotzlaw H., Leygue E., Coutts A., Waston P. The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. (1998). 65. 175-180.

Muschter R. Photodynamic therapy: a new approach to prostate cancer. Current Urology reports. (2003). 221-228.

Narisawa T., Fukaura Y., Hasebe M., Ito M., Aizawa R., Murakoshi M., Uemura S., Khachik F., Nishino H. Inhibitory effects of natural carotenoids, α-carotene, β-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. Cancer Letters. (1996). 107. 137-142.

Narisawa T., Futaura Y., Oshima S., Inakuma T., Yano M., Nishino H. Chemoprevention by the oxygenated carotenoid β-cryptoxanthin of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Japanese Journal of Cancer Research. (1999). 90. 1061-1065.

Nathan T.R., Whitelaw D.E., Chang S.C., Lees W.R., Ripley P.M., Payne H., Jones L., Parkinson M.C., Emberton M., Gillams A.R., Mundy A.R., Bown S.G. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. Journal of Urology. (2002). 168. 1427-1432.

Nowotarski S.L., Woster P.M., Casero R.A. Polyamines and cancer: implications for chemoprevention and chemotherapy. Expert Reviews in Molecular Medicine. (2013).

Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. Photochemistry Photobiology. (2002). 1. 1-21.

Olszewski M.M., Concepts of Cancer from Antiquity to the Nineteenth Century. History of Medicine. 2010. 87. 181-186

Ossipov D. A. Nanostructured Hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. Expert Opinion on Drug Delivery. (2010). 7. 681-703.

Park J.S., Chew B. P., Wong T.S. Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BLAB/c mice. Journal of Nutrition. (1998). 128. 1650-1656.

Phillips D. Roberts S., eds. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy (Advanced Chemistry Texts). Gordon and Breach Science publisher. (2000). Vol 1. p 291.

Popov A.V., Mawn T.M., Kim S., Zheng G., Delikatny E.J. Design and syntesis of phospholipase C and A2-activatable near-infrared fluorescent smart probes. Bioconjugate Chemistry. (2010). 21 (10). 1724-1727.

Raimondi C., Ruhrberg C. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumors. Seminars in Cell & Developmental Biology. (2013). 24. 172-178.

Ramel F., Birtic S., Cuiné S., Triantaphylidès C., Ravanat J. L., Havaux M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. Plant Physiology. (2012). 158. 1267-1278.

Rawls H. R., Van Santen P. J. A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. Journal of the American Oil Chemists Society. (1970). 47 (4). 121-125.

Reynolds L.P., Redmer D.A. Angiogenesis in the placenta. Biology of Reproduction. (2001). 64 (4). 1033-1040.

Ryu J.H., Lee A., Lee S., Ahn S-H., Park J. W., Leary J.F., Park S., Kim K., Kwon I. C., Youn I-C., Coi K. One step detection of matrix metalloproteinase activity using a fluorogenic peptide probe-immobilized diagnostic kit. Bioconjugate Chemistry. (2010). 21. 1378-1384.

Sarrazy V., Garcia G., MBakidi J. P., Le Morvan C., Bégaud-Grimaud G., Granet R., Sol V., Krausz P. Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. (2011). 103. 201-206.

Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T., Shibuya M., Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. Blood. (2001). 97 (3). 785-91.

Schneider R., Schmitt F., Frochot C., Fort Y., Lourette N., Guillemein F., Müller J. F., Barberi-heyob M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. Bioorganic and Medicinal Chemistry. (2005). 13. 2799-2808.

Siemann D. W., Chaplin D. J., Horsman M. R. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. Cancer. (2004). 100 (12). 2491-2499.

Sol V., Chaleix V., Champavier Y., Granet R., Huang Y-M., Krausz P. Glycosyl bis-porphyrin conjugates: Synthesis and potential application in PDT. Bioorganic and Medicinal Chemistry. (2006). 25 (4). 345-360.

Spangler C., Drobizhev M., Starkey J., Rebane S. Photodynamic therapy: discriminating between healthy and cancerous tissue. (2008). SPIE.

Stefflova K., Chen J., Marotta D., Li H., Zheng G. Photodynamic therapy agent with a built-in apoptosis sensor for evaluating its own therapeutic outcom in situ. Journal of Medicinal Chemistry. (2006). 49 (13). 1850-1856.

Stripp D.C. H., Mick R., Zhu T. C., Whittington R., Smith D., Dimofte A., Finlay J., Miles J., Busch T.M., Shinl D., Kachur A., Tochner Z.A., Malkowicz S.B., Glatstein E., Hahn S. M. Phase I trial of motexafin lutetium-mediated interstitial photodynamic therapy in patients with locally recurrent prostate cancer. Proceedings of SPIE. (2004). 5315. 88-99.

Stummer W., Reulen H. J., Novotny A., Stepp H., Tonn J. C. Fluorescence-guided resections of malignant gliomas-an overview. Acta Neurochirurgica Supplement. (2003). 88. 9-12.

Svanberg K., Andersson T., Killander D., Wang I., Stenram U., Andersson-Engels S., Berg R., Johansson J., Svanberg S. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical delta-amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. British Journal of Dermatology. (1994). 130 (6). 743-751.

Svanberg K., Bendose N., Axelsson J., Engels S. A., Svanberg S. Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination. Journal of biomedical Optics. (2010). 15 (4). 1-10.

Swamy N., James D. A., Mohr S. C., Hanson R. N., Ray R. An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells. Bioorganic and Medicinal Chemistry. (2002). 10 (10). 3237-3243.

Szeimies R.M., Morton C.A., Sidoroff A., Braathen L.R. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. Acta Dermato-Venereologica. (2005). 85. 483-490.

Thomas N. Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par adressage du co-récepteur neuropiline-1: Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables, in Biologie Santé Environnement. (2009). Université Henri Poincaré, Nancy I. P. 270.

Tu S.H. Origin of cancers: Clinical perspectives and implications of a stemm-cell theory of cancer.(2010). ISBN 978-1-4419-5967-6.

Tyagi S., Kramer F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology. (1996). 14. 303-308.

Tyagi S., Bratu D. P., Kramer F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nature Biotechnology. (1998). 16. 49-53.

Uzdensky A.B., Berezhnaya E., Kovaleva V., Neginskaya M., Rudkovskii M., Sharfulina S. Photodynamic therapy: a review of applications in neurooncology and neuropathology. Journal of Biomedical Optics. (2015). 20 (6). 1-7.

Van Dam G.M., Themelis G., Crane L. M.A., Harlaar J. N., Pleijhuis R.G., Kleder W., Sarantopoulos A., De Jong J.S., Arts H.J.G., Van der Zee Ate. G.J., Bart J., Low P.S., Ntziachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-α targeting: first in-human results. Nature Medicine. (2011). 17. 1315-1319.

Verhille M., Benachour H., Ibrahim A., Achard M., Arnoux P., Barberi-Heyob M., André J. C., Allonas X., Baros F., Vanderesse R., Frochot C. Photodynamic molecular beacons triggered by MMP-2 and MMP-9: influence of the distance between photosensitizer and quencher onto photophysical properties and enzymatic activation. Current Medicinal Chemistry. (2012). 19 (32). 5580-5594.

Vogl T.J., Eichler K., Mack M.G., Zangos S., Herzog C., Thalhammer A., Engelmann K. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. European Radiology. (2004). 14. 1063-1073.

Waidelich R., Stepp H., Baumgartner R., Weninger E., Hofstetter A., Kriegmair M. Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer. Journal of Urology. (2001). 165. 1904-1907.

Wan M.T., Lin J.Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. (2014). 7. 145-163.

Wang F., Liu X. Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF4 nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. (2008). 130 (17). 5642-5653.

Webber J., Fromim D., Photodynamic therapy for carcinoma in situ of the anus. Archives of Surgery. (2004). 139. 259-261.

Weiss A., Van den Bergh H., Griffioen A. W., Nowak-Sliwinska P. Angiogenesis inhibition for the improvment of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. Biochimica et Biophysica Acta. (2012). 1826. 53-70.

Wiedmann M.W., Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. Current Pharmaceutical Biothechnology. (2004). 5. 397-408.

Zaak D., Sroka R., Hoppner M., Khoder W., Reich O., Trischler S., Muschter R., Knuchel R., Hofstetter A. Photodynamic therapy by means of 5-ALA induced PPIX in human prostate cancer-preliminary results. Medical Laser Application. (2003). 18. 91-95.

Zensi A., Begley D., Pontikis C., Lergos C., Mihoreanu L., Wagner S., Büchel C., Briesen H. V., Kreuter J. Albumin nanoparticules targeted with ApoE enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurons. Journal of Controlled Release. (2009). 137. 78-86.

Zhang Z., Zhang P., Hamada M., Takahashi S., Xing G., Liu J., Sugiura N., Potential chemoprevention effect of dietray fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line. Oncology Reports. (2008). 20. 1099-1103.

Zhen G., Chen J., Stefflova K., Jarvi M., Li H., Wilson B. C. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. Proceedings of the National Academy of Sciences. (2007). 104 (21). 8989-8994.

# Chapitre III : Matériels & Méthodes

# III Procédés d'extraction des caroténoïdes

Par définition, l'extraction est une méthode (ou procédé) utilisée dans le but d'isoler des composés à partir d'un mélange de solides ou d'une solution complexe. L'extraction joue un rôle clé dans la recherche expérimentale du point de vue préparation d'échantillons et analyses qualitative et quantitative de divers produits naturels ou synthétiques. Quand il s'agit de cibles actives naturelles tel que les caroténoïdes, il existe plusieurs procédés d'extraction parmi lesquels l'extraction par solvants organiques à pression atmosphérique, qui représente la technique la plus conventionnelle utilisée. Le développement récent des nouvelles techniques comme l'extraction avec solvant accélérée (ASE), ou l'extraction avec le dioxyde de carbone supercritique vient de répondre à des attentes scientifiques concernant la réduction du temps d'extraction, l'augmentation du rendement d'extraction, la limitation de l'usage des solvants organiques d'où réduire le risque de pollution et la réduction du coût de l'extraction. Cependant, presque toutes les techniques d'extraction des caroténoïdes suivent une même voie impliquant la libération des pigments à partir de la matrice par destruction tissulaire, suivie par l'élimination des composés indésirables et enfin une extraction liquide-liquide ou liquide-solide.

Notre approche consiste à optimiser l'extraction et l'analyse des caroténoïdes à partir de trois fruits connus pour leur richesse en ces pigments, utilisant l'extraction conventionnelle avec solvant organique à pression atmosphérique (Soxhlet), l'extraction avec solvant accélérée sous pression, et l'extraction par $CO_2$ supercritique. L'extraction par Soxhlet est utilisée comme méthode de référence. Pour se faire, une méthodologie de plan d'expérience a été mise en place à partir de plusieurs facteurs influant à priori la qualité de l'extraction.

Dans ce qui suit, nous allons détailler les différentes techniques d'extraction utilisées dans cette thèse Puis nous aborderons les différentes techniques d'analyses et enfin la méthodologie des plans d'expérience.

## III.1 Préparation et caractérisation des poudres de fruits

L'échantillonnage des trois fruits *Diospyros kaki* L. (persimmon), *Prunus persica* L., (pêche) et *Prunus armeniaca* L., (abricot), est effectué à maturité. 27 fruits ont été cueillis sur trois arbre différents. Les trois fruits sont ensuite traités de la même façon : après collecte, chaque lot est divisé en sous-lots, après avoir été rincé et lavé à l'eau. Ils sont ensuite été stockés à -20°C dans des récipients hermétiques en polystyrène contenant de l'azote liquide.

### III.1.1 Lyophilisation

La lyophilisation consiste en l'élimination progressive par sublimation de l'eau libre à partir de la matrice végétale préalablement congelée (phase solide). Afin d'éliminer l'eau des fruits, 5 kilogrammes de chaque espèce (fruits entiers : chaire et pelure) sont découpés manuellement en petits morceaux d'environ 1 $cm^3$, et congelés directement par ajout d'azote liquide (-196 °C), et immédiatement lyophilisés pendant 48 à 72 h par un lyophilisateur (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc France). La température du piège à eau est maintenue à -70°C. Une fois la pression abaissée à 15 Pa, la température des plateaux de la chambre de sublimation est progressivement réchauffée afin de lutter contre le caractère endothermique de la sublimation.

Après lyophilisation les matrices déshydratées obtenues sont placées chacune dans un dessiccateur contenant du $P_2O_5$ afin d'empêcher la reprise d'humidité. Une série de pesés est effectuée avant et après dessiccation afin de déterminer le pourcentage de matière sèche et la teneur en eau avant broyage.

### III.1.2 Broyage des poudres lyophilisées

Après la lyophilisation, les morceaux de fruits subissent une étape de broyage immédiate avec un broyeur à café (Moulinex, France) jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène. De petites quantités d'azote liquide sont ajoutées afin d'éviter l'oxydation durant le broyage. Ensuite, les poudres de chaque fruit obtenues sont placées dans un dessiccateur contenant du $P_2O_5$, sous vide et à l'abri de la lumière, avant étude de leur granulométrie.

### III.1.3 Détermination des % en matière sèche et eau

Après lyophilisation et dessiccation, le pourcentage en matière sèche (% MS) et eau (% eau) sont mesurés gravimétriquement suivant les équations 1 et 2 :

$$\%\,\boldsymbol{MS} = \frac{\boldsymbol{m_2 \cdot 100}}{\boldsymbol{m_1}} \qquad (1)$$

$$\%(\boldsymbol{eau}) = \left(\frac{\boldsymbol{m_1 - m_2}}{\boldsymbol{m_1}}\right) \cdot \boldsymbol{100} \qquad (2)$$

Avec $m_1$ : masse de la matière fraîche, et $m_2$ : masse de la poudre après lyophilisation. L'eau résiduelle dans la poudre est déterminée après séchage à l'étuve pendant 24 h à 105°C.

### III.1.4 Activité de l'eau $a_w$

La mesure de l'activité d'eau dans les poudres lyophilisées est effectué grâce à un aw mètre Labmaster (Novasina, Suisse). Lors d'une mesure, l'échantillon est introduit dans la chambre de

mesure qui est hermétique et possède une température stable à 25°C. La sonde interne de l'appareil mesure ensuite l'évolution de l'humidité relative de l'air en équilibre avec le produit. A l'équilibre, cette humidité relative divisée par 100 correspond à l'activité de l'eau $a_w$.

### III.1.5 Granulométrie

La distribution de la taille des particules des poudres est mesurée dans un liquide (l'éthanol absolu) par diffusion dynamique de la lumière. Elle est effectuée à l'aide d'un granulométrie laser Malvern Mastersizer 2000 (Malvern, Royaume-Unis). Cette méthode est basée sur la diffusion quasi-élastique de la lumière au contact d'une particule (Figure III. 1). L'angle θ issu de la diffusion de la lumière est relié à la taille de la particule par la relation de Stokes-Einstein faisant elle même intervenir les constantes de Boltzman, la température et la viscosité de l'éthanol. Le traitement du signal permet d'établir une distribution de taille des particules.

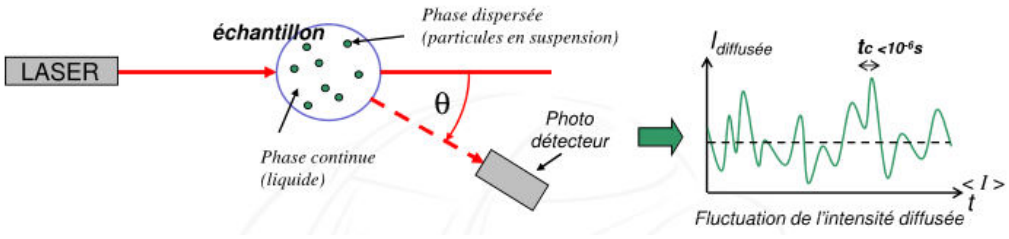



Figure III.1 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière.

### III.1.6 Préparation des extraits caroténoïdiques avant analyse HPLC-PDA-MS

Quelque soit la méthode d'extraction utilisée (extraction avec ASE : MeOH/THF, extraction avec Fluide supercritique : $CO_2$+ EtOH, extraction avec Soxhlet : (MeOH/THF)), (voir plus loin) l'extrait était toujours préparé comme suit : avant d'être soumis à une analyse HPLC-PDA-MS, il était d'abord mélangé à 13,500 rpm durant une minute utilisant un vortex puis filtré à vide sur papier filtre de porosité 2 µm. A un volume V de filtrat ainsi obtenu, était ajouté 1 volume V d'une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) à 10 % en empoule à décanter. Puis trois extractions liquide-liquide successives étaient effectuées avec, à chaque fois, 1 volume V d'éther de pétrole, afin de transférer complètement les caroténoïdes dans la phase éther de pétrole. On obtenait ainsi un volume d'environ 3*V d'éther de pétrole, contenant les caroténoïdes. Cette phase d'éther de pétrole était alors lavée 3 fois, avec un volume V d'eau ultrapure sous pH neutre afin d'éliminer toute trace de chlorure de sodium, puis évaporée à 30°C sous flux d'azote pendant 15 min à l'aide d'un système Turbovap (Biotage AB, Uppsala, Suède). Le résidu obtenu était ensuite rapidement dissout dans 5 mL de (MeOH/MTBE) ; (1 :1), (v:v) contenant 0,1 % de BHT, mélangé par vortex, puis filtré avec un filtre seringue de porosité 0,45 µm. A 2 mL de filtrat ainsi obtenu étaient ajoutés 1 mL de MeOH à 0,1 %

de BHT. Puis avec 1 mL d'une solution méthanolique de KOH à 20 % était ajouté. Le tout était soumis à un bullage sous flux d'azote pendant une heure, à température ambiante et à l'obscurité, afin d'effectuer une saponification. La figure III.2 représente un schéma simplifié du protocole d'extraction.

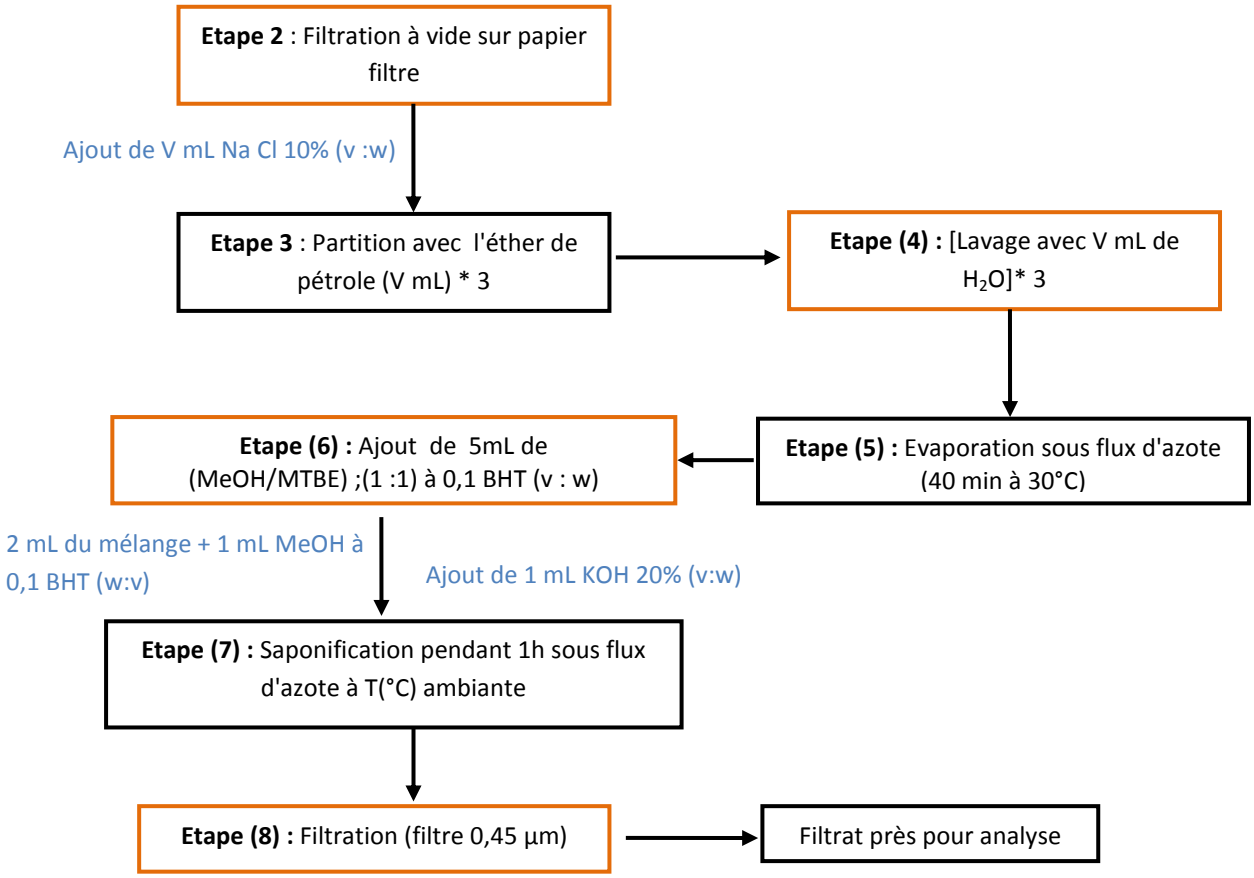



Figure III.2 : Différents étapes de transformation d'un extrait des caroténoïdes avant analyse HPLC-PDA-MS.

### III.1.7 Extraction par solvant organique à pression atmosphérique

- Extraction Soxhlet

Nous avons utilisé l'extraction par Soxhlet comme une méthode de référence pour la détermination des rendements d'extraction à partir des autres méthodes d'extraction employées. C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide qui s'effectue à chaud (à la température d'ébullition du solvant d'extraction) à pression atmosphérique. C'est un procédé semi-continu, couplant une distillation avec une cartouche de type Soxhlet, qui va contenir la matrice solide. Lorsque le solvant d'extraction atteint la température d'ébullition, la vapeur générée va se condenser au niveau de la colonne de distillation et alimenter ainsi la cartouche contenant le solide. La

cartouche se remplit ainsi progressivement avec le solvant provoquant ainsi un contact entre le solide et le solvant liquide chaud, et donc un transfert de solutés du solide vers le solvant. A partir d'une certaine hauteur, le solvant chargé en soluté se vide automatiquement par siphonage puis retourne dans le ballon òu le solvant sera à nouveau porté à l'ébullition pour un nouveau cycle d'extraction (Figure III.3)*(Luque de Castro & Priego-Capote, 2010)(Cardenas-Toro, & Alcazar-Alay, 2015).*

Afin d'extraire les caroténoïdes, nous avons placé 2 g de poudre de fruit lyophilisé dans la cartouche après mélange préalable avec 2 g de florisil (100-200 mesh). 250 mL d'un mélange (MeOH : THF), (1 :1 ; v : v), sont placés dans le ballon. Le mélange est porté à ébullition à 66°C. Cette température correspond à la température d'ébullition du THF. L'extraction est maintenue pendant 6 h jusqu'à décoloration totale de la poudre. Ensuite, la préparation des extraits pour analyse est effectuée suivant le protocole déjà décrit dans la section (III.I.6).

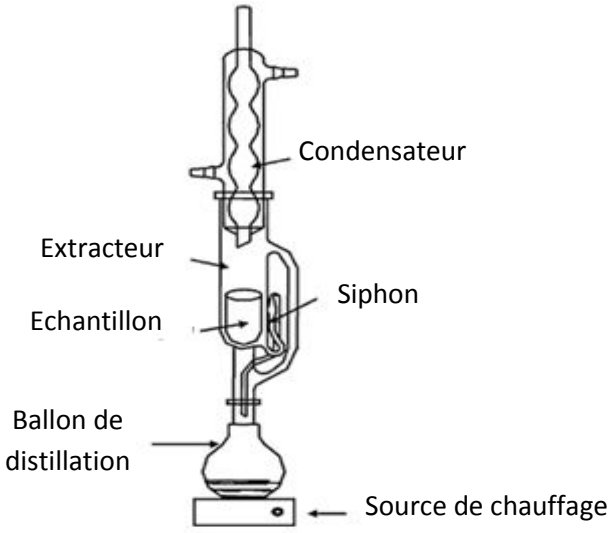



Figure III.3 : Montage d'extraction Soxhlet.

## III.1.8 Extraction par solvant accélérée (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

### *III.1.8.1 Principe*

L'extraction par solvant accélérée est une technique d'extraction qui utilise des solvants organiques, à pression assez élevée, pour accélérer le processus d'extraction. Dans la littérature, on trouvera souvent le terme ASE, pour « Accelarated Solvant Extraction ». Mais on peu aussi tout simplement parler d'extraction par un liquide sous pression, PLE, pour « Pressurized Liquid Extraction ». Cette technique a été décrite pour la première fois en 1996 par Richter et al. *(Richter et al., 1996).* On peut considérer l'ASE comme une nouvelle modalité d'extraction par Soxhlet

mais en opérant à des pressions et températures élevées. La pression permet de garder le solvant sous forme liquide même au-delà de son point d'ébullition. L'augmentation de la température d'extraction favorise la solubilisation du composé ciblé. D'autre part, la viscosité et la tension de surface du solvant diminuant lorsque la température augmente, la diffusion du solvant au niveau des surfaces de la matrice d'extraction est donc facilitée. Ceci engendre une extraction rapide tout en limitant fortement les quantités de solvant utilisées.

### *III.1.8.2 Description technique*

L'extraction des caroténoïdes est assurée par un extracteur ASE 350 (Thermo Scientific Dionex), (Figure III.4) L'extracteur ASE 350 est équipé d'un panneau de contrôle qui sert à ajuster les paramètres de la méthode souhaitée : température du four, débit, pression, nombre de cycles d'extraction et pourcentage de solvant pour le rinçage. L'ASE 350 est équipé d'un réservoir de solvant avec trois pompes A, B et C ce qui permet de travailler avec un mélange binaire ou ternaire en solvant d'extraction.

Le caroussel de cellules d'extraction peut contenir jusqu'à 24 cellules de différents volumes. Dans notre cas, nous avons utilisé des cellules en acier inoxydable de 22 mL en volume. Le caroussel de collecte contient les tubes de collecte (60 mL).

Une vanne statique au niveau du bac de collecte permet de contrôler le débit du solvant passant de la cellule au tube de collecte. La zone four se trouve derrière l'appareil là òu on trouve le bras mécanique qui permet de déplacer les cellules à l'intérieur et à l'extérieur du four durant l'extraction et egalement de seller la cellule au cours de l'extraction.

Le passage du solvant après extraction de la cellule au tube de collecte est assuré par un mécanisme d'aiguille: quand elle se positionne sur le tube de collecte, elle transperce le septum afin d'assurer l'écoulement du solvant dans le tube.




Figure III. 4 : Extracteur ASE 350 (Thermo-Scientific-Dionex).

### *III.1.8.3 Extraction des caroténoïdes*

Pour réaliser une ASE, une masse m=2 g de poudre lyophilisée (taille de particule < 500 µm), mélangée avec 2 g de florisil (100-200 mesh) dans le cas de la poudre de persimmon (*Diospyros kaki. L*), est introduite dans la cellule (v=22 mL). La cellule est ensuite fermée par les embouts qui contiennent des frités recouverts d'un filtre en cellulose. Les extractions sont réalisées suivant un plan d'expériences ($2^2$), c'est-à-dire un plan à deux facteurs (température et % de méthanol dans un mélange méthanol/THF) et deux niveaux par facteur, en utilisant un point central répété 3 fois pour évaluer la courbure de la relation entre le rendement d'extraction et les deux facteurs. Les différents essais d'extraction sont consignés dans le tableau III.1. Les extractions sont menées en triplicata (n=3) ce qui revient à effectuer 4*3=12 expériences aux limites du domaine expérimental et 3*3=9 expériences dans les conditions du point central, soit un total de 21 expériences par fruit.

Tableau III. 1 : Différents essais du plan factoriel complet et les niveaux associés à chaque facteur.

| Essais | Température °C | % MeOH | Codification | Codification |
|---|---|---|---|---|
| **1** | **40** | **20** | -1 | -1 |
| **2** | **40** | **100** | -1 | 1 |
| **3** | **60** | **60** | 0 | 0 |
| **4** | **60** | **60** | 0 | 0 |
| **5** | **60** | **60** | 0 | 0 |
| **6** | **80** | **20** | 1 | -1 |
| **7** | **80** | **100** | 1 | 1 |

La cellule remplie est placée sur le caroussel porte-cellule. Dés que l'extraction est lancée, un bras mécanique transfert la cellule dans le four. Dans ce dernier, la température est maintenue à la consigne fixée par la méthode. Dès que la cellule est placée dans le four, la pompe délivre immédiatement le solvant. Dès que le solvant atteint son chemin à travers l'échantillon et atteint le tube de collecte, la vanne statique se referme pour permettre la pressurisation de la cellule à 1500 psi (103 bar) durant le chauffage. Le solvant atteint la température fixée, ce qui implique que la pression de la cellule augmente puisque la vanne statique est fermée.

Quand la pression atteint 200 psi (14 bars) au dessus de la pression de consigne, la vanne statique s'ouvre rapidement pour abaisser la pression et se referme de nouveau. La pompe délivre, de son coté, du solvant frais dans la cellule afin de compenser la perte de pression.

La première phase de l'extraction consiste à chauffer le contenu de la cellule, à la température fixée, pendant un temps t=5 min d'extraction statique.

Après les 5 minutes, du solvant frais est délivré dans la cellule afin de vider le contenu en extrait (solvant + caroténoïdes) encore chaud, cette étape est l'étape de rinçage.

Le volume de rinçage Vr est un pourcentage fixé en fonction du volume de la cellule. Si ''n'' cycles d'extraction statique successifs sont utilisés, ce volume de solvant de rinçage Vr est divisé en ''n'' sous-volumes de rinçage de volume Vr/n, chacun appliqué à une extraction statique. Après rinçage du dernier cycle d'extraction statique, le solvant est purgé de la cellule vers le tube de collecte (en utilisant de l'azote à 150 psi) à travers un filtre. **Pour toutes les expériences, le pourcentage de rinçage et le temps de purge sont maintenus respectivement à 60% et 60s (valeurs courantes en ASE)**. Les tubes de collecte sont des tubes ambrés de 60 mL.

Environ 2 g de chaque poudre de fruits est placé dans une cellule de 22 mL qui contient un filtre de 25 mm. Un deuxième filtre est placé après remplissage de la cellule, le reste du volume est ajusté avec des billes de verre d'une granulométrie de 2 mm (Figure III. 5).



Figure III. 5 **:** Remplissage de la cellule avant extraction.

Le solvant d'extraction utilisé est un mélange binaire (MeOH/THF). Chaque solvant est complété avec du BHT à 0,1%. Dans le tableau III. 2 sont listés les paramètres d'extraction maintenus fixes durant les extractions relatives à notre plan d'expérience.

Tableau III. 2 : Paramètres maintenues fixe durant l'extraction

| Durée du cycle (min) | Rinçage (%volume) | Purge (s) | Chauffage de la cellule (min) | Masse de l'extrait (g) |
|---|---|---|---|---|
| **5** | 60 | 60 | 5 | 2 |

## III.1.9 Extraction par $CO_2$ supercritique avec cosolvant

### *III.1.9.1 Principe*

Comme expliqué dans le chapitre I, qui décrit les propriétés du $CO_2$ supercritique et ses applications en extraction (SFE=Supercritical fluid Extraction), cette extraction repose sur l'usage du $CO_2$ supercritique comme solvant d'extraction principal, en présence d'un peu d'éthanol utilisé comme

cosolvant afin de pouvoir extraire les caroténoïdes polaires (xanthophylles) plus facilement. L'objectif est ici de limiter l'usage de solvants organiques.

### *III.1.9.2 Description du processus d'extraction*

Nous avons utilisé un petit pilote d'extraction par $CO_2$ supercritique (SFC-$CO_2$) adapté à de petits débits de $CO_2$, allant du mL/min à 10 mL/min au maximum (Figure III. 6). L'installation est composée d'une pompe $CO_2$ (Pu-2080-$CO_2$ Plus unit, JASCO, Japan) et d'une pompe semi-micro HPLC (Pu-2085 Plus unit, JASCO, Japan) pour le cosolvant (éthanol). La pompe $CO_2$ est équipée d'un système Peltier permettant le refroidissement du fluide à -4°C. Un cryostat RM6 (Lauda-Königshofen, Allemagne) est placé entre la bouteille de $CO_2$ et la pompe $CO_2$ pour assurer le refroidissement du fluide à -4°C et son pompage à l'état liquide. La pression est contrôlée par un régulateur de pression automatique (Back Pressure Regulator, BPR, BP-2085 Plus Unit, JASCO, Japan), autorisant la régulation de pression à ± 0, 02 MPa (0,2 bar) de la pression de consigne par micro-ouvertures successives permettant de récupérer l'extrait à pression et débit constants.

Le régulateur de pression (BPR) est basé sur l'utilisation d'un mécanisme de valve de commutation de débit (*Flow Switch Valve, FSV*), qui permet un contrôle stable de la pression aux débits choisis ($CO_2$ et éthanol), et une collecte efficace de l'extrait dans des tubes ambrés.

Pour éviter la formation de carboglace à la sortie du BPR, suite à la décompression endothermique du $CO_2$ (effet Joules-Thomson) à des débits massiques élevés, le régulateur de pression est équipé d'un système interne de chauffage Peltier qui maintient la température à 60°C. L'extracteur utilisé est un tube cylindrique en acier inoxydables de volume 1 mL, de diamètre ¼ de pouce (6,35/4,6 mm diamètre externe/ diamètre interne) avec une section de tube de 65 mm de longueur connectée à une section de tubes en acier inoxydable de diamètre 1/16 de pouce par des raccords réducteurs inox VCR Swagelock (Solon, Ohio, USA). Un filtre en fritté inoxydable (sintered stainless steel) est placé aux deux extrémités de l'extracteur. L'ensemble de l'extracteur et la section de tube sont placés dans une étuve pour une régulation de température avec une précision de ± 0,15 °C. Le mélange $CO_2$ supercritique/éthanol est préalablement mis à une température de consigne identique à celle de l'étuve, en utilisant un bain-marie thermostaté, avant de rentrer dans cette dernière. La température doit être supérieure à celle du point critique du $CO_2$, c'est-à-dire 31 °C. La figure III.6 décrit la totalité de l'installation. Pour chaque extraction, 0,5 g de poudre de fruit était placé dans l'extracteur. Le $CO_2$, avec un peu d'éthanol, était pompé à débit et pression constants dans l'extracteur. Les extraits caroténoïdiques étaient collectés dans des tubes d'ASE ambré de 60 mL de volume, à la sortie du BPR. L'extraction était effectuée en utilisant du $CO_2$ à 99.995 % de pureté et de l'éthanol absolu à 99% de pureté. A la fin de chaque extraction, l'extracteur était vidé (récupération de poudre de fruit décolorée), désassemblé, et chaque élément le constituant était nettoyé avec de

l'eau distillée puis de l'acétone avant séchage. Une sonication dans de l'eau distillée était en plus utilisée pour bien nettoyer les frittés inox.

Un des avantages principaux de ce pilote est sa grande facilité d'usage et de nettoyage associée à une excellente régulation de pression, débit et température, tout en permettant une collecte automatique de l'extrait. Ces caractéristiques sont particulièrement compatibles avec la réalisation de nombreux essais et l'usage de la méthodologie des plans d'expériences appliqués à la SFE.

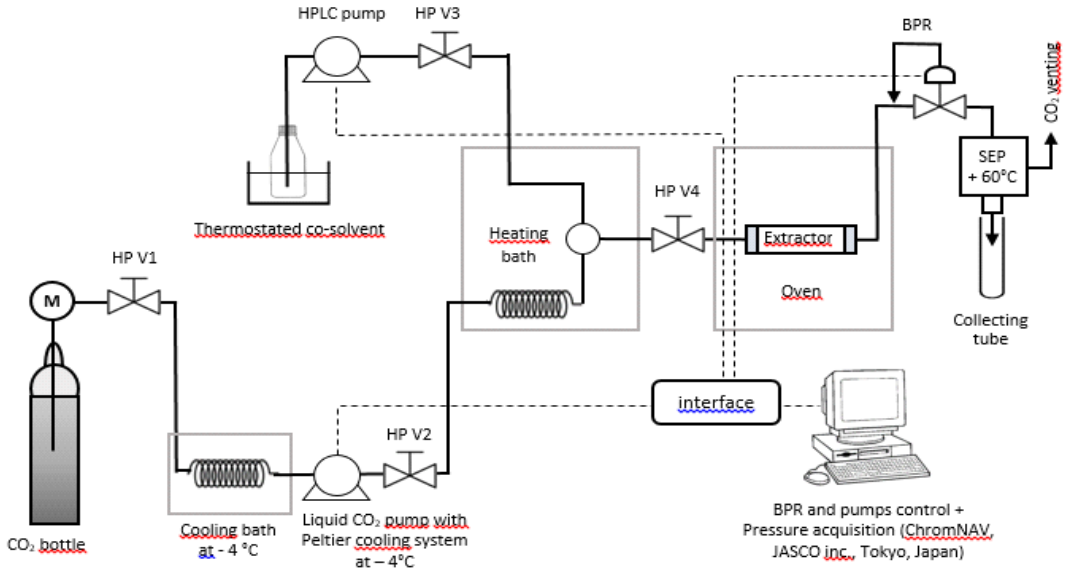



Figure III.6 : Schéma technique du pilote d'extraction $CO_2$.

### *III.1.9.3 Plan d'expérience appliqué à l'extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique*

Afin (i) de déterminer un modèle prédictif d'extraction et (ii) de rechercher les conditions optimales d'extraction des caroténoïdes par $CO_2$ supercritique avec de l'éthanol en tant que cosolvant, nous avons réalisé un plan d'expériences faisant intervenir 5 facteurs et 3 niveaux par facteurs. Les facteurs étaient : Pression (P), Température (T), Débit (D), temps d'extraction (t), et % en cosolvant éthanol (%E).

L'approche utilisée, en utilisant le logiciel JMP 10 de SAS institute Inc. (Cary, NC, USA), est celle des surfaces de réponses. Le plan utilisé est un plan central composite (Central Composite Design) à faces centrées nécessitant 28 expériences (26 points aux sommets des arrêtes de l'hypercube et aux centre des faces de l'hypercube + 2 points centraux). Toutes les expériences sont réalisées en duplicata (n=2) comme indiqué dans le Tableau III. 3.

Tableau III. 3 : Les essais relatifs au plan composite à faces centrées et les différents facteurs associés au modèle.

| Essai | P (bar) | T (°C) | Débit (mL/min) | Temps (min) | Ethanol (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 100 | 40 | 1 | 30 | 5 |
| **2** | 100 | 40 | 1 | 110 | 25 |
| **3** | 100 | 40 | 3 | 30 | 25 |
| **4** | 100 | 40 | 3 | 110 | 5 |
| **5** | 100 | 50 | 2 | 70 | 15 |
| **6** | 100 | 60 | 1 | 30 | 25 |
| **7** | 100 | 60 | 1 | 110 | 5 |
| **8** | 100 | 60 | 3 | 30 | 5 |
| **9** | 100 | 60 | 3 | 110 | 25 |
| **10** | 200 | 40 | 2 | 70 | 15 |
| **11** | 200 | 50 | 1 | 70 | 15 |
| **12** | 200 | 50 | 2 | 30 | 15 |
| **13** | 200 | 50 | 2 | 70 | 5 |
| **14** | 200 | 50 | 2 | 70 | 15 |
| **15** | 200 | 50 | 2 | 70 | 15 |
| **16** | 200 | 50 | 2 | 70 | 25 |
| **17** | 200 | 50 | 2 | 110 | 15 |
| **18** | 200 | 50 | 3 | 70 | 15 |
| **19** | 200 | 60 | 2 | 70 | 15 |
| **20** | 300 | 40 | 1 | 30 | 25 |
| **21** | 300 | 40 | 1 | 110 | 5 |
| **22** | 300 | 40 | 3 | 30 | 5 |
| **23** | 300 | 40 | 3 | 110 | 25 |
| **24** | 300 | 50 | 2 | 70 | 15 |
| **25** | 300 | 60 | 1 | 30 | 5 |
| **26** | 300 | 60 | 1 | 110 | 25 |
| **27** | 300 | 60 | 3 | 30 | 25 |
| **28** | 300 | 60 | 3 | 110 | 5 |

## III.2 Analyse

### III.2.1 Spectroscopie UV-VIS et spectrophotométrie

#### *III.2.1.1 Mesure d'absorption UV-visible*

Les spectres d'absorption UV-visible ont été effectués sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin Elmer EZ 210 avec des cuvettes en quartz de 1 cm de largeur.

#### *III.2.1.2 Mesure de la fluorescence statique*

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3 (Jobin-Yvon) (FL3-222), équipé d'un compartiment thermostaté à 25 °C et d'une lampe Xénon 450 W, d'un photomultiplicateur UV-visible R928, d'un détecteur infrarouge InGaAs refroidit par azote liquide et d'un double monochromateur.

#### *III.2.1.3 Mesure de durée de vie de l'oxygène singulet*

La mesure de la durée de vie de la production d'oxygène singulet de la porphyrine ($P_1$COOH) en présence ou absence des caroténoïdes est effectuée sur un spectrophotomètre TEMPRO-01 (Horiba Jobin-Yvon) constitué d'une source d'excitation de type diode pulsée SpectraLED-415 émettant à 415 nm, d'un compartiment de porte cuve, d'un monochromateur d'émission (600-2000 nm) de type Seya-Namioka, d'un tube photomultiplicateur proche infrarouge avec refroidissement thermoélectrique (effet Peltier) comme système de détection. Le système est contrôlé par un contrôleur de comptage à un photon FluoroHub-B avec deux logiciels de commande DataStation et DAS6 (Horiba Jobin-Yvon).

### III.2.2 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'analyse des caroténoïdes est effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse. L'équipement est composé d'une pompe HPLC (LC-20 AD) avec dégaseur, d'un contrôleur CBM-20A, d'un four à colonne CTO-20A et d'un détecteur à barette de diode (PDA) SPD-M20A. La colonne utilisée pour l'analyse des caroténoïdes est une colonne C30 YMC (250 X 4,6 mm DI, 5 µm) couplée à une pré-colonne de même phase stationnaire (10 X 4,0 mm DI, 5 µm). La température d'analyse est maintenue à 25°C par le four, la phase mobile est composée de (A) : MeOH à 0,1% BHT (w : v), (B) : MTBE à 0,1 % BHT (w : v). Le profil du gradient d'élution commence par une augmentation linéaire de 5 % de (B) à 30 % de (B) pendant 30 min, suivi d'une augmentation linéaire du gradient de 30 % de (B) à 50 % de (B) pendant 20 min, puis d'une diminution immediate de 50 % de (B) à 5 % de (B), et enfin de 10 min d'équilibrage à 5 % de (B). Le débit est fixé à 1 mL/min.

Entre chaque lot d'injections, le temps de stabilisation de la colonne est de 30 min. Le volume d'injection est de 20 µL. Chaque batch (un batch = n run) programmé sur le logiciel LC-Solution (Shimadzu, Japan) commence par un run sans injection puis un run avec injection d'un blanc consititué de (MeOH : MTBE) ; (1:1), (v: v).

La limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) des standards utilisés dans l'identification et la quantification des caroténoïdes sont déterminées suivant la méthode US-EPA *(Hubaux et Vos, 1970)* en tenant compte des écart-types sur la pente et l'ordonnée à l'origine des droites de régression.

### III.2.3 Analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS)

Les analyses par LC-PDA-MS sont effectuées à l'aide d'un système composé d'un module de chromatographie liquide haute performance (LC-20 AD), couplé à un spectromètre de masse LC-MS-2020 (Shimadzu, Japan). La source d'ionisation utilisée est une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), toutes les analyses sont réalisées en mode positif. Un taux de balayage de 2143 µ/s est utilisé dans un intervalle de 50-2000 mAu. Le débit du gaz de nébulisation est maintenu à 1,5 mL/min. La tension de l'interface et la température sont maintenues à 4,5 kV et 250 °C, respectivement.

### III.2.4 Purification par chromatographie préparative

La purification des caroténoïdes est effectuée par chromatographie en phase inverse sur un système de chromatographie préparative GILSON HPLC GX-271 (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) contenant un injecteur/collecteur automatique GX-271 équipé d'une pompe à seringue (modèle 402), d'une pompe HPLC semi préparative (modèle 322), et d'un détecteur à barettes de diodes (Diod Array Detector, DAD) de marque Gilson utilisé à 450 nm. L'ensemble est contrôlé par un logiciel Trilution LCv.2.1. La colonne utilisée est une colonne YMC C30 semi-préparative (250×10 mm DI, 5 µm) couplée à une pré-colonne (10×10 mm DI, 5µm) de la même phase stationnaire.

Les purifications sont effectuées à une température de 25°C. La phase mobile consiste en un gradient d'élution à base de MeOH (A) et de MTBE (B). Les deux solvants A et B contiennent 0,1 % de BHT (w/v). Le débit est de 4,0 mL/min et le volume injecté est de 3,5 mL. Le profil du gradient de la phase mobile a été défini comme suit : gradient linéaire croissant de 2 % de B à 20 % B en 60 min ; gradient linéaire croissant de 20 % de B à 95 % B en 20 min ; phase isocratique à 95 % de B en 10 min; diminution de 95 % de B à 2 % de B en 5 min ; phase isocratique à 2 % de B en 5 min (équilibrage de la colonne dans les conditions initiales). Avant chaque lot de purification par HPLC semi-préparative,

le temps de stabilisation de la colonne est de 30 min et un blanc de (MeOH : MTBE 1: 1, v / v) est injecté.

La durée de collecte pour chaque tube de collecte (tubes en verre de 10 mL) est fixée à 4 min, ce qui équivaut à 4 mL de volume maximum par tube. Selon la largeur des pics, un ou plusieurs tubes collecteurs peuvent être utilisés. Les tubes de collecte correspondants à chaque pic sont versés dans des tubes ambrés de 60 mL stockés à -20 °C à l'abri de la lumière, après avoir éliminé l'air dans l'espace de tête à l'aide d'une seringue au travers du septum du bouchon vissable des tubes. Pour chaque pic, plusieurs tubes de 60 mL sont au final utilisés après une quarantaine de séparation par HPLC préparative.

## III.3 Planifications d'expériences

### III.3.1 Définition

Les plans d'expériences constituent essentiellement une stratégie de planification d'une série d'expériences dans le but d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. Cette méthodologie repose sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira ensuite à une analyse et à une interprétation statistique simple des résultats *(Goupy, 1990) (Goupy & Creighton, 2006).*

### III.3.2 Principe

La méthodologie des plans d'expériences est un outil qui permet l'organisation des essais qui accompagnent une recherche scientifique spécifique ou des études industrielles. A partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt Y (réponse), et des variables $X_i$ (appelé facteurs ou variables de prédiction), on cherche donc à mieux comprendre la fonction :

$$\mathbf{Y = f(X_i)}$$

Cette méthodologie regroupe généralement un ensemble de méthodes et d'outils statistiques de modélisation expérimentale afin de collecter un maximum de données quantitatives utilisées ultérieurement pour mettre au point un modèle mathématiques de type :

$$\begin{cases} Y = Z + E \\ Z = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \end{cases}$$

Avec Y la réponse à expliquer, ($X_1$, $X_2$) sont les variables explicatives. E est une variable aléatoire qui suit généralement une loi normale centrée, souvent utilisée pour décrire la variabilité de la réponse. Z est la réponse théorique prédite par le modèle avec les termes $b_i$, les coefficients associés à Z. L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : " obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expériences".

On qualifie de **facteur** toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée. La différence fondamentale entre la notion classique de variable et celle de facteur tient donc dans le fait que tout facteur doit pouvoir être modifié sans difficulté ; on parle donc de la variation de niveau.

On distingue différents type de facteurs (Figure III.7) *(Dagnielle, 2000)(Goupy, 1993)* :

- Les facteurs contrôlables qui dépendent directement du choix de l'opérateur,
- Les facteurs non contrôlables qui varient indépendamment du choix,
- Les facteurs d'entrée dont on cherche à analyser une influence sur le modèle.

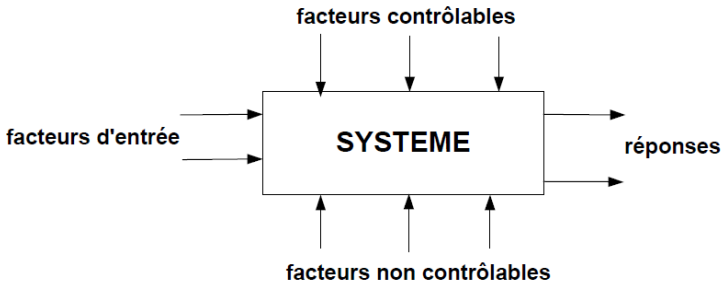



Figure III. 7 : Différents type de facteurs.

D'une façon générale, L'approche par planification d'expériences, outre la limitatiion du nombre d'expériences à réaliser, répond à trois problématiques principales :

- **le criblage** qui consiste à isoler parmi un grand nombre de facteurs impliqués dans l'étude, ceux qui sont les plus influents,
- **L'analyse** des effets qui consiste à mesurer et à comparer l'influence des facteurs ainsi que leurs interactions. Cette étape permet d'aboutir à une modèle prédictif de type Y = f(Xi),
- **L'optimisation** de la réponse dont l'objectif principal est de minimiser ou maximiser la réponse. Parfois une valeur cible de la réponse peut-aussi être recherchée.

### III.3.3 Application de l'approche des plans d'expériences dans notre étude

Les paramètres influents pris en compte lors de l'élaboration du plan d'expérience dépendent de la nature et du type du procédé d'extraction mis en jeu.

Dans le cas de la modélisation de l'extraction par solvant accéléré (ASE), les facteurs choisis sont les suivant :

- Température (°C),
- Pourcentage de méthanol dans le solvant binaire (MeOH : THF).

Pour l'extraction par $CO_2$ supercritique en présence d'éthanol comme cosolvant, les paramètres choisis sont les suivants :

- Température (°C),
- Pression (bar),
- Débit (mL/min),
- Pourcentage en éthanol (% massique),
- Temps d'extraction (min).

Afin d'explorer l'éventail des opportunités à plusieurs facteurs, nous avons utilisé les fonctionnalités du logiciel JMP 10 de SAS institute Inc. (Cary, NC, USA) pour (i) choisir des plan d'expériences appropriés à nos problématiques d'extraction et (ii) analyser les resultats issus de ces plan d'expériences (validité des modèles par ANOVA, analyses des résidus, optimums).

### III.3.4 Plan pour surface de réponse : plan factoriel complet et plan central composite à face centrée

#### *III.3.4.1 Plan factoriel complet $2^2$ avec point central répété utilisé en extraction ASE*

Un plant factoriel complet est un plan pour lequel toutes les combinaisons possibles aux limites du domaine d'étude sont réalisées, c'est le nombre maximal d'essais pour un plan d'expériences factoriel. Soit N le nombre d'essais, il se calcule suivant la formule :

$$N= 2^K$$

Òu K est le nombre de facteurs, 2 le nombre de niveaux. Dans le cas où l'on utilise 3 niveaux par facteur le nombre d'essais N est alors :

$$N= 3^K$$

Dans le cas d'un plan factoriel à deux facteurs et 3 niveaux, 9 combinaisons possibles sont à traiter.

Dans notre cas nous avons choisi un plan factoriel complet tout simple à 2 facteurs et 2 niveaux ($2^2$) mais avec ajout d'un point central répété 3 fois, ce qui donne un plan à 7 expériences (4 points aux limites du domaine expérimental, et 3 points centraux). L'utilisation du point central a pour but d'évaluer le niveau de courbure reliant la réponse aux facteurs. Géomitriquement parlant, cela permet d'évaluer si la surface de réponse peut être assimilée à un plan (aucun terme quadratique et/ou interaction de facteur dans le modèle) ou bien à une surface non plane (présence de termes quadratiques relatifs à un ou plusieurs facteurs et/ou à une ou plusieurs interactions de facteurs dans le modèle).

Chaque expérience est effectuée en triplicata (n=3) ce qui donne un total de 21 expériences à réaliser par poudre de fruit étudiée. Pour nos 3 fruits, nous avons donc effectué un total de 21*3=63 expériences d'extraction ASE. La réponse à optimiser était la concentration des caroténoïdes C en µg/ g de poudre de fruit. Le tableau (III.4) résume les paramètres choisis et leurs niveaux. Après essais de divers modèles, les surfaces de réponses ont finalement été obtenues à partir d'un modèle linéaire de premier degré avec simple interaction suivant l'équation :

$$C = a.\ T + b.\ M + c.\ T.M + Cste$$

Tableau III.4 : Les paramètres associés au plan factoriel choisi et leurs niveaux codifiés

| CODE | T (°C) | (%) MeOH |
|---|---|---|
| **-1** | 40 | 20 |
| **0** | 60 | 60 |
| **1** | 80 | 100 |

### *III.3.4.2 Plan central composite à faces centrées utilisé dans le cadre de l'extraction de caroténoïdes par $CO_2$ supercritique (SFE)*

Ce type de plan (central composite design CCD) à face centrée (Centered faces), qui fait partie des plans d'expériences permettant de générer des modèles avec surfaces de réponses (tout comme les plans de type Box-Benkhen ou Doehlert) est souvent utilisé quand le nombre de facteurs est élevé. Il nécessite nettement moins d'expériences que les plans factoriels complets.

Dans ce type de plan, chaque facteur nécessite 3 niveaux qui sont -1, 0 et 1 (voir figure III.9), le domaine expérimental est un domaine carré dans le cas de 2 facteurs, cubique dans le cas de 3 facteurs (et hypercubique pour plus de 3 facteurs). Les points expérimentaux sont positionnés (i) aux extrémités (angles) du domaine, (ii) au centre de chaque face du domaine et (iii) au centre du domaine.

Avec 5 facteurs et 3 niveaux par facteur, l'usage d'un plan factoriel complet aurait nécessité $3^5$= 243 experiences, ce qui aurait été beaucoup trop. Dans le cas du plan central composite à faces centrées proposé par JMP 10, « seulement » 28 expériences ont été nécessaires (26 sur les angles et faces du domaine expérimental et 2 au centre du domaine expérimental). Chaque experience a été réalisée en duplicata (n=2). Un total de 56 expériences d'extraction  a donc été utilisé.

La validité  du modèle a été evaluée par l'ANOVA, le $R^2$, les p-values appliquées à chaque coefficient, et enfin la normalité des résidus du modèle (réponses prédites=f (réponses expérimentales)). L'usage du **profiler de prevision** de JMP 10 s'est avéré précieux pour rapidement visualiser  les effets de chaque facteur sur la réponse (rendement d'extraction), C (µg carotenoides/g de poudre de fruit), et identifier les conditions optimales d'extraction dans notre domaine expérimental. L'usage du **profiler d'interaction** de JMP 10  s'est avéré très utile pour étudier les interactions entre facteurs.

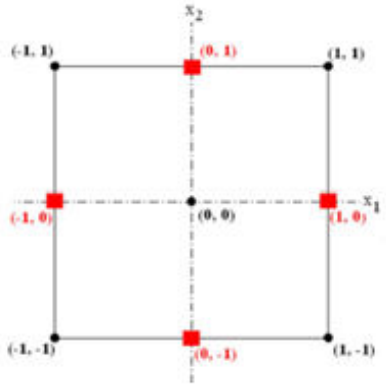



Figure III.9 : Points expérimentaux pour d'un plan CCF pour 2 facteurs.

Le modèle retenu dans la cadre de notre étude sur l'extraction de caroténoïdes à partir de la poudre de persimmon a été le suivant :

$$\hat{C} = a_1 \cdot P + a_2 \cdot T + a_3 \cdot F + a_4 \cdot E + a_5 \cdot temps + a_6 \cdot P^2 + a_7 \cdot T^2 + a_8 \cdot F^2 + a_9 \cdot E^2 + a_{10} \cdot temps^2 + a_{11} \cdot P \cdot T + a_{12} \cdot P \cdot F + a_{13} \cdot P \cdot E + a_{14} \cdot P \cdot temps + a_{15} \cdot T \cdot F + a_{16} \cdot T \cdot E + a_{17} \cdot T \cdot temps + a_{18} \cdot F \cdot E. + a_{19} \cdot F \cdot temps + a_{20} \cdot E \cdot temps + a_{21} \quad (3)$$

Avec :

$\widehat{C}$, le rendement d'extraction en µg de caroténoide par g de poudre de persimmon.

**P**, la pression (bar) ; **T**, la température (°C) ; **F**, le débit de $CO_2$ (mL/min); **E**, la teneur massique d'éthanol dans le mélange $CO_2$/ethanol (%) ; **temps**, temps (min).

**$a_1$** à **$a_{21}$** les coefficients du modèle identifié par régression-non linéaire.

# *Références*

Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. Analytical Chemistry. (1996). 68 (6). 1033-1039.

Hubaux A., and Vos G. Decision and detection limits for calibration curves. Analytical Chemistry. (1970). 42. 849-855.

Goupy J.L. Etude comparative de divers plans d'expériences. Revue de statistique appliquée. (1990). Tome 38. n°4. 5-44.

Dagnielle P. La planification des expèriences: choix des traitements et dispositif expérimental. Journal de la société française de statistique. (2000). 141. 5-29.

Goupy J.L. Methods for experimental design. Data Handling in Science and Technology. (1993). Vol (12). ISBN: 0-444-89529-9.

Goupy J.L., Creighton L. Introduction aux plans d'expériences. (2006). 3 éme édition. Dunod. ISBN: 2100497448.

Luque de Castro M.D, Priego-Capote F. Soxhlet extraction : Past and present panacea. Journal of chromatography A. (2010). 1217. 2383-2389.

Cardenas-Toro F.P, Alcazar-Alay S.C., Coutinho J.P., Godoy H.T., Forster-Carneiro T.F., A.Meireles M.A. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. Food and Bioproducts Processing. (2015). 94. 90-100.

Herrero M., Ibanez E., Senorans J., Cifuentes A. Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography A. (2004). 1047. 195-203.

Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. Use of compressed fluids for sample preparation : Food applications. Journal of chromatography A. (2007). 1152. 234-246.

# Chapitre IV : Extraction des caroténoïdes avec solvant accélérée (ASE)

# IV Extraction des caroténoïdes avec solvant accélérée (ASE)

## IV.1 Contexte

L'extraction des caroténoïdes à partir de matrices biologiques complexes tels que les fruits représente une étape délicate et pourtant cruciale en vue d'une étude qualitative et quantitative de ces derniers. Les quantités extraites sont souvent de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par gramme de matière sèche, seulement.

Durant les cinq dernières décennies, la communauté scientifique s'est intéressée de manière croissante aux propriétés physico-chimiques et biologiques des caroténoïdes. Ces pigments sont en effet impliqués dans la prévention de plusieurs maladies chroniques, dont certains types de cancers, et peuvent être utilisés en tant qu'additifs alimentaires en alimentations humaine ou animale. De nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre les liens entre caroténoïdes et santé humaine d'une part, et leur activité biologiques *in vivo* et *in vitro*, d'autre part. Ces travaux ont contribué au développement de diverses méthodes d'extraction et d'identification des caroténoïdes et de leurs formes isomères. Cependant, l'extraction et de quantification des caroténoïdes demeure une tâche complexe en raison (i) de la complexité des matrices biologiques les contenant, (ii) de leur photosensibilité, (iii) de leur susceptibilité à l'oxydation en présence d'oxygène et d'acides, (iv) de l'insuffisance de standards commerciaux de pureté élevée et aussi du coût des rares standards disponibles sur le marché. Les difficultés liées à l'extraction et au dosage des caroténoïdes sont donc à la fois d'ordre technique et financier.

D'une façon générale, trois techniques majeures d'extraction peuvent être utilisées : (i) l'extraction solide-liquide à pression atmosphérique par Soxhlet (avec usage d'ultrasons ou non), (ii) l'extraction par solvant accélérée par usage de la pression (ASE : Accelerated Solvent Extraction), et (iii) l'extraction par fluide supercritique (SFE : Supercritical Fluid Extraction).

Dans le but d'extraire et comparer les teneurs en caroténoïdes de persimmons (*Diospyros kaki* L.), pêches (*Prunus persica* L.) et abricots (*Prunus armeniaca* L.) produits en Tunisie, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'usage de l'extraction par solvant accélérée sous pression (Accelerated Solvent Extraction, ASE) comme moyen d'extraction.

L'intérêt de ce procédé d'extraction réside dans l'usage d'une pression élevée (103 bars), ce qui :

- facilite la pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice, sous forme liquide même on opérant à des températures supérieures au point d'ébullition du solvant,
- accélère significativement l'extraction,
- permet de réduire la quantité de solvants organiques nécessaire à l'extraction par rapport à une méthode d'extraction par solvant à l'atmosphère de type Soxhlet.

Dans ce chapitre, pour chaque fruit et plusieurs caroténoïdes, nous avons cherché à optimiser l'usage de l'ASE par une approche de type plan d'expériences en faisant appel à la méthode des surfaces de réponse (Surface Response Methodology). Les facteurs impliqués dans ce plan d'expériences ont été la température, la composition du solvant, le temps d'extraction lui-même dépendant du nombre de cycles d'extraction statique utilisé. Trois niveaux par facteurs ont été utilisés. L'extraction par Soxhlet a été utilisée comme méthode de référence pour évaluer le rendement d'extraction par ASE.

Les profils caroténoïdiques de chaque fruit (xanthophylles et carotènes) ont ainsi pu être comparés de manière quantitatives pour quatre caroténoïdes (lutéine, zéaxanthine, β-cryptoxanthine et β-carotène, tous sous leur forme all-*trans*) en utilisant des standards commerciaux, et de manière qualitative pour d'autres caroténoïdes identifiés par HPLC-PDA-MS.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication acceptée dans Food Chemistry en 2015, qui constitue le corps de ce chapitre.

**Khalil Zaghdoudi**, Steve Pontvianne, Xavier Framboisier, Mathilde Achard, Rabiga Kudaibergenova, Malika Ayadi-Trabelsi, Jamila Kalthoum-cherif, Régis Vanderesse, Céline Frochot, Yann Guiavarc'h. 2015. Accelerated solvent extraction of carotenoids from Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food Chemistry**, *184*, 131-139.

Food Chemistry 184 (2015) 131–139

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

# Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.)

Khalil Zaghdoudi [a,b,c], Steve Pontvianne [a], Xavier Framboisier [a], Mathilde Achard [b], Rabiga Kudaibergenova [a], Malika Ayadi-Trabelsi [c], Jamila Kalthoum-cherif [c], Régis Vanderesse [b], Céline Frochot [a], Yann Guiavarc'h [a,*]

[a] Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France
[b] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), FRE 7568, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France
[c] Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, Tunisia

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 16 October 2014
Received in revised form 18 March 2015
Accepted 20 March 2015
Available online 26 March 2015

*Keywords:*
Carotenoids
Accelerated solvent extraction (ASE)
Design of experiment (DoE)
Kaki
Peach
Apricot

ABSTRACT

Extraction of carotenoids from biological matrices and quantifications remains a difficult task. Accelerated solvent extraction was used as an efficient extraction process for carotenoids extraction from three fruits cultivated in Tunisia: kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). Based on a design of experiment (DoE) approach, and using a binary solvent consisting of methanol and tetrahydrofuran, we could identify the best extraction conditions as being 40 °C, 20:80 (v:v) methanol/tetrahydrofuran and 5 min of extraction time. Surprisingly and likely due to the high extraction pressure used (103 bars), these conditions appeared to be the best ones both for extracting xanthophylls such as lutein, zeaxanthin or β-cryptoxanthin and carotenes such as β-carotene, which present quite different polarities. Twelve surface responses were generated for lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin and β-carotene in kaki, peach and apricot. Further LC–MS analysis allowed comparisons in carotenoids profiles between the fruits.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over the last decades, the interest for natural & bioactive compounds such as carotenoids grew up, driven by the increase of consumers' demand for healthy diets. Next to their coloring properties applied in food and cosmetic industry, carotenoids are involved in the prevention of several diseases such as cancers, age-related macular degeneration, cataracts, cardiovascular diseases and other diseases related to low immune function (Perera & Yen, 2007). They provide photoprotection to the eye skin and photosynthetic organisms through the quenching of singlet oxygen and damaging of free radicals (Böhm, Edge, & Truscott, 2012; Jomova & Valko, 2013). It is therefore not surprising that the current market value of commercially used carotenoids was estimated at nearly $1.2 billion in 2010, with a chance to grow up to $1.4 billion in 2018 and a compound annual growth rate of 2.3% (BCC Research LLC, 2011). Except for canthaxanthin, whose use for colorization of salmonid fish and shrimps is likely to be strongly regulated or even forbidden in Europe, every other top 10 carotenoids markets (β-carotene > lutein > astaxanthin > capsanthin > annatto > canthaxanthin > lycopene > β-apo-8-carotenal > zeaxanthin > β-apo-8-carotenal ester) should increase by 2018. β-Carotene, lutein and astaxanthin represent more than 80% of the market value (BCC Research LLC, 2011).

Carotenoids are lipid soluble pigments produced as secondary metabolites in fruits, vegetables, algae, fungi and some bacteria. Animal are incapable of carotenoids biosynthesis and hence depend on dietary carotenoids, which are more or less absorbed after their ingestion and, for some of them, converted to provitamin A. In food, carotenoids are generally $C_{40}$ tetraterpenoids formed from eight $C_5$ isoprenoid units joined head-to-tail, except at the center where a tail-to-tail linkage reverses the order, resulting in a symmetrical molecule (Ibañez, Herrero, Mendiola, & Castro-Puyana, 2012; Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004). Carotenoids' attractive color (red, yellow or orange) is due to their extended conjugated double-bond system, which constitutes the light absorbing chromophore that provides the visible absorption

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 83 17 51 90; fax: +33 (3)83 32 29 75.
*E-mail address:* yann.guiavarch@univ-lorraine.fr (Y. Guiavarc'h).

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.072
0308-8146/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

spectrum that serves as a basis for their identification and quantification. They can be divided in two groups: oxygenated carotenoids, called xanthophylls, and non-oxygenated carotenoids, called carotenes. To date, about 600 carotenoids have been identified in nature and humans have access to about 40 carotenoids through their diet, mainly through fruits and vegetables (Britton, 1995; Fernandez-Garcia et al., 2012). Among these carotenoids, β-carotene, α-carotene, lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin and lycopene are the most found in human diet with a good dietary intake and it was evaluated that 80–90% of their intake was coming from fruits and vegetables in developed countries (Maiani et al., 2009).

Many investigations on carotenoids were undertaken in order to better understand their chemistry and the health benefits due to the biological activity of these secondary metabolites. These studies were based on and contributed to the development of various extraction and identification methods of carotenoids and their related isomers in food matrices such as fruits & vegetables but also algae and some bacteria (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014). As lipophilic compounds, carotenoids are insoluble in water and show a high solubility in organic solvents. Carotenes are for instance highly soluble in petroleum ether, hexane and toluene while xanthophylls dissolve better in methanol and ethanol (Rodrigez-Amaya, 2001).

Over the last 50 years many efforts were put on the development of improved carotenoids extraction processes as well as on their better identification through various analytical methods. However, reproducible extraction/quantification of such pigments from various & complex biological food matrices still remains a complex, time and cost demanding task (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014; Taylor, Brackenridge, Vivier, & Oberholster, 2006; Kimura & Rodriguez-Amaya, 2002). Carotenoids are relatively stable in the matrix, but in solution they may be very sensitive to light, heat, acid or oxygen exposure and they can undergo isomerization during extraction/analysis (Dias et al., 2010; Zerlotti Mercadante, 1999). In a general manner, short extraction time and protection from light and oxygen are therefore necessary for reliable quantifications. Carotenoids can be found in their free form (carotenes) or in a more stable fatty-acid esterified form (xanthophylls). These compounds are frequently analyzed after saponification, which is an extraction step aimed at removing chlorophylls and lipids to release carotenoids in a clean preparation for analysis, free from conjugated forms, fatty acids and lipids that make the chromatography separation difficult (Murillo et al., 2013).

As far as possible, and due to their moderate to high hydrophobicity, conventional extractions of carotenoids requires the use of organic solvents, which is costly, not environmentally friendly and somewhat contradictory with the "green touch" associated with these natural compounds. Usually, non-polar solvents, such as hexane or THF, are a good choice for extraction of non-polar (carotenes) or esterified carotenoids, while polar solvents, such as methanol, ethanol and acetone, are more appropriate for extraction of polar carotenoids (xanthophylls). Different extractions processes and chromatographic methods to assay carotenoids in food matrices were the topic of several recent reviews (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014; Arvayo-Enriquez, Mondaca-Fernande, Gortarez-Moroyoqui, Lopez-Cervantes, & Rodriguez Ramirez, 2013; Mustafa & Turner, 2011). In a brief and non-exhaustive way, three main categories of extraction technics are reported in the literature, which are (i) the atmospheric liquid extraction with Soxhlet, maceration or ultrasound methods (Mezzomo, Maestri, dos Santos, Maraschin, & Ferreira, 2011), (ii) the PLE for pressurized liquid extraction, also known as accelerated solvent extraction (ASE) and so called in this study (Mustafa, Trevino, & Turner, 2012; Breithaupt, 2003), and (iii) the supercritical fluid extraction, which is often based on the use of supercritical $CO_2$ as solvent with slight use of organic cosolvent such as ethanol (Guedes et al., 2013).

Liquid extraction technics at atmospheric pressure are often time-demanding but the Soxhlet method, which is based on the recirculation of the organic solvent through the sample, using phase transition (evaporation–condensation), can reduce the amount of organic solvent to be used. ASE, is an interesting alternative to extractions at atmospheric pressure since it makes use of pressure vessels containing the sample to be extracted and high constant pressure (often 103 bars), which greatly facilitates the penetration of the extracting solvent, in a liquid form even when working above its boiling temperature, through the food matrix. This drastically speeds up the extraction process while decreasing the amount of solvent to be used (Mendiola, Herrero, Cifuentes, & Ibanez, 2007). Automated laboratory scale equipments have been designed, which allow a perfect control of pressure, temperature, time of extraction, and solvent composition together with the possibility to program an extraction run for up to 24 samples placed in high pressure stainless-steel vessels where they are protected from light and oxygen. Finally, the increasing use of supercritical $CO_2$ as totally inert, recyclable and non-toxic solvent for carotenoids extraction, after few decades of evolution, is now used both at the laboratory and industrial scales. The possibility to tune $CO_2$ properties (density, viscosity, diffusivity) by playing on pressure & temperature makes it possible to produce "organic solvent-free" essential oils/oleoresins, mainly from vegetal matrices. But this extraction method is somewhat less selective than extractions based on organic solvents and still requires the use of about 10% w/w of ethanol as cosolvent and further liquid/liquid extractions for carotenoids isolation.

Despite its interesting features, in the last 10 years, only few research papers on carotenoids extraction using ASE were published and the first paper dealing with the use of ASE in molecules extraction from food matrices is still quite recent (Breithaupt, 2004). ASE was for instance used for extraction of carotenoids from carrot by-products (Mustafa et al., 2012), from peppers (Barbero, Palma, & Barroso, 2006), from beverages, tomato paste and cereals (Breithaupt, 2004), and from microalgae (Koo, Cha, Song, Chung, & Pan, 2012; Cha et al., 2010; Denery, Dragull, Tang, & Li, 2004). Unfortunately, these articles do not describe accurately the food matrices submitted to extraction processes. For instance, humidity of fresh (non-dehydrated) tissues minced in homogenizers is never given, which can however greatly influence the extraction performances. With regards to dehydrated samples, information is also limited to the fact that pieces of the food matrix are freeze-dried and then grinded in order to obtain a powder whose granulometry is not studied. However, granulometry is of obvious importance on the packing surface area (expressed in $m^{-1}$ as a result of powder surface area divided by the high pressure cell volume) and therefore on the contact between the food matrix and the solvent with direct effect on extraction performances. Granulometry below 0.5 mm is recommended by ASE equipment manufacturers (Thermo Fisher Scientific, 2013).

The aim of this investigation is to use ASE for determining the major carotenoids content of three fruits cultivated in Tunisia and known for their richness in carotenoids pigments: kaki also known as kaki/Japanese/Asian Persimmon (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.), apricot (*Prunus armeniaca* L.). After an accurate description of our samples preparation, the influence of extraction temperature, solvent composition and number of extraction cycles on extraction yields of carotenoids will be investigated through an experimental design, focusing on four standard carotenoids: three xanthophylls in all-*trans* form (lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin) and one carotene (all-*trans*-β-carotene). Based on LC-MS analysis, recommendations will finally be

provided for the ASE extraction of other carotenoids identified in the three fruits matrices.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

All-*trans*-β-carotene (Type II synthetic, purity > 95%), all-*trans*-lutein from marigold & all-*trans*-β-cryptoxanthin (purity > 97%), all-*trans*-zeaxanthin (purity > 95%), butylated hydroxytoluene (BHT, purity ⩾ 99%) and triethylamine (TEA, purity ⩾ 99%) were obtained from Sigma–Aldrich (Schnelldorf, Germany). HPLC organic solvents were of analytical grade: methanol (MeOH) was from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), methyl-tert-butyl-ether (MTBE) was from Fisher Scientific (Loughborough, UK), petroleum ether (PE) was from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a purified water system Arium® 611UV from Sartorius (Göttingen, Germany) with a resistivity of 18,2 MΩ ∗ cm. Sodium chloride (NaCl, purity > 99%) and potassium hydroxide (KOH, purity > 99%) were obtained from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Florisil 100–200 mesh (Sigma–Aldrich, Schnelldorf, Germany). Liquid Nitrogen was from Air Liquide (Nancy, France).

### 2.2. Plant materials

The present study focused on three fruits cultivated in Tunisia, *D. kaki* L. (persimmon var. Triumph from the North region), *P. persica* L. (peach var. Caramel from the North region), and *P. armeniaca* L. (apricot var. Chachi from the Middle region). For each specie, 27 fruits were harvested at full maturity from three selected trees.

### 2.3. Samples preparation & characterization

Selected fruits were immediately washed with distillated water and placed in hermetical polystyrene boxes in which we added some liquid nitrogen in order to prevent oxidation reactions, before to be stored at −20 °C. Five kilograms of each whole fruits (flesh and peal) were manually cut into approximately 2 g pieces, frozen at −80 °C and at once freeze-dried during 48 h with a pilot CryoTec freeze-dryer (Saint-Gély-du-Fesc, France) with a separated cold trap at −70 °C, plates temperature set to −20 °C and a working pressure of 15 Pa. Freeze-dried fruits pieces were then placed in a desiccator containing $P_2O_5$ in order to prevent water sorption. They were weighted before and after dessication for dry matter % determination. After freeze-drying, fruits pieces were immediately grounded with a Moulinex coffee grinder (Ecully, France). Small amount of liquid nitrogen were added to prevent oxidation during grinding. Powders were stored in a desiccator containing $P_2O_5$ in order to prevent water sorption and their residual water content was measured after 24 h at 105 °C. Particle size distribution of fruits powders were measured through dynamic light scattering with a Malvern Mastersizer 2000 apparatus (Malvern, UK) in absolute ethanol.

### 2.4. Accelerated solvent extraction process

All Carotenoid extraction experiments were carried out in a static mode with a Dionex ASE 350 extractor (Salt Lake City, UT, USA), using 12 stainless steel cells of 22 mL volume. 60 mL amber vials were used for extracts collection. Common extraction parameters were as follows: (i) 2 g of fruit powder was loaded into the cell and residual cell volume was partially filled with 2 mm glass beads; (ii) the cell was filled with solvent to a pressure of 1500 psi (103 bars); (iii) heat was applied for a initial heat-up time of 5 min; (iv) static extraction with all system valves closed was performed with a 5 min cycle time; (v) the cell was rinsed with 60% of the cell volume with extraction solvent (in case of 5 static cycles were applied, this 60% of the cell volume was then automatically divided in five times 12% of the cell volume); (vi) the solvent was purged from the cell with $N_2$ gas for 60 s; and (vii) the system was depressurized. Extraction solvents, methanol (MeOH) and THF, were degassed for 30 min by ultrasonic bath Sonoclean® Labo Moderne (Paris, France) before use. For Kaki powder 1 g of Florisil was added as dispersing agent. Although methanol is a toxic solvent, we decided to use it in combination with THF because (i) it was shown to be highly efficient and more efficient than ethanol for carotenoids extractions when used in combination with THF (Rivera & Canela, 2012) and (ii) because the use of ASE does not require large amounts of organic solvents as compared to extractions at atmospheric pressure. Besides, we decided to use methanol combined with THF in various proportions in order to tune the polarity of our solvent mixture in the perspective of xanthophylls (polar carotenoids) extraction. Last but not least, the purpose of the present study is to provide a convenient method for the identification of the carotenoids content in small samples of kaki, peach and apricot powders. The objective is not to generate a large scale extraction method, which would consume large amounts of methanol. This would be contradictory with the aim to limit the use of toxic organic solvents. It is however obvious that, for preparative extractions of large amounts of carotenoids from fruits, only food compatible organic solvent such as ethanol should be used.

### 2.5. Soxhlet extraction

In order to evaluate the efficiency of the extraction of carotenoids using the ASE extraction method, we used a reference extraction method based on a classical soxhlet extraction. This type of extraction based on the use of organic solvents at atmospheric pressure is indeed often used as a reference method leading to a total extraction of carotenoids. Two grams of orange colored fruit powder were mixed with 2 g of florisil 100–200 mesh and submitted to a soxhlet extraction with 250 mL of solvent (MeOH:THF, 1:1, v/v) during 6 h at 66 °C (boiling temperature of THF at atmospheric pressure) up to stabilization of the extract absorbance and strong discoloration of the fruit sample, which turned clear grey. ASE extraction yields were calculated as a percentage, taking soxhlet extraction results as a reference.

### 2.6. Experimental design

For each fruit and carotenoid, a two factors-two levels full factorial design with additional central points was applied with JMP 10 software from SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA). Temperature was set to 40 °C, 60 °C, or 80 °C; volume % of MeoH in the MeOH:THF binary solvent was set to 20%, 60% or 100%. This design contained 7 experiments (4 corner points, 3 central points). For each of the three fruits, experiments were performed in triplicates leading to $7 * 3 = 21$ extractions (total of 63 extractions for the three fruits). Responses to optimize were the respective concentrations, *C*, in each carotenoid, expressed in μg/g fruit powder. For all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-β-cryptoxanthin and all-*trans*-β-carotene, surface responses resulting from a first order linear model with simple interaction, as introduced in Eq. (1), were plotted together with experimental points using Matlab 7.1 software from MathWorks (Natick, Ma, USA). Significance of residuals normality was tested using a Shapiro–Wilk test with a α risk of 0.05. Eq. (1) is:

$$C = a \cdot T + b \cdot M + c \cdot T \cdot M + \text{cste} \quad (1)$$

Where $C$ is the concentration found in the fruit powder sample (μg/g fruit powder); $T$ is the temperature (°C); $M$ is the % methanol in the binary solvent methanol/MTBE; $a$, $b$, $c$ and $d$ are coefficients to identify.

### 2.7. Standards preparation and calibration curve

All standards stock solutions were prepared and kept under nitrogen atmosphere at −20 °C until analysis. All-*trans*-β-carotene (5 mg) was dissolved in 50 mL of hexane, all-*trans*-β-cryptoxanthin (1 mg) was dissolved in 10 mL of hexane, all-*trans*-zeaxanthin (1 mg) was dissolved in 10 mL of chloroform and all-*trans*-lutein (1 mg) was dissolved in 10 mL of absolute ethanol. Accurate concentration of the stock solution was measured with a Shimadzu UV 3600 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using appropriate extinction coefficient (ε) in L mol$^{-1}$ cm$^{-1}$ and wavelength (nm) for each standards as follows: all-*trans*-β-carotene-2592 at 450 nm in hexane (John Scott, Finglas, Seale, Hart, & de Froidmont-Görtz, 1996); all-*trans*-zeaxanthin-2480 at 451 nm in hexane (Hart & John Scott, 1995), all-*trans*-lutein-2550 at 445 nm in ethanol and all-*trans*-β-cryptoxanthin-2460 at 451 nm in hexane (Heinonen, Ollilainen, Linkola, Varo, & Koivistoinen, 1989). All stock solutions were subdivided into 1 mL aliquots, transferred in amber vials and stored under nitrogen atmosphere at −20 °C before analysis. Working solutions of each standard were daily prepared from aliquots and absorbance was checked. Dilution were made in HPLC injection solvent (MeOH:MTBE, 1:1, v/v) with addition of 0.1% BHT (w/v) in order to prevent oxidation. Standards curves were built with seven different concentrations for each carotenoid (1.4, 1.6, 2.0, 2.5, 3.3, 5, 10 μg/mL)

### 2.8. Preparation of carotenoids ASE and soxhlet extracts

Pressurized liquid carotenoid extracts and soxhlet extracts were prepared for HPLC analysis according to the method described by Dias et al. (2010) with slight modifications and was conducted under limited light. At first, ASE extract was homogenized with a vortex (Scientific Industries Inc., New York, U.S.A.) at 13,500 rpm during 1 min before being filtered under vacuum through a AP 25 glass fiber filter disc of 2 μm porosity (Millipore, Darmstadt, Germany). Then, 10 mL of the filtrate was added to 10 mL of 10% (w/v) aqueous sodium chloride solution and carotenoids were transferred to a 10 mL petroleum ether phase containing 0.1% BHT (w/v) using a liquid–liquid extraction. This liquid/liquid extraction was repeated at least 3 times in order to achieve a total transfer of carotenoids toward the petroleum ether phase (extract was then totally discolored). Organic phase was subsequently washed three times with 10 mL of ultrapure water in order to remove residual NaCl traces under neutral pH. Petroleum ether was then evaporated at 30 °C under nitrogen flow using a Turbo Vap® LV (Biotage AB, Uppsala, Sweden). The residue was rapidly dissolved in 5 mL of mobile phase (MeOH:MTBE, 1:1, v/v) containing 0.1% BHT (w:v) and filtered through 0.45 μm PVDF syringe filters (Pall Life Sciences, Ann Arbor, PN, USA). Then 2 mL of the filtered solution was mixed with 1 mL of MeOH containing 0.1% BHT (w/v) and saponified with 1 mL of 20% (w/v) methalonic KOH solution under nitrogen, in the dark, for 1 h, at room temperature. Finally 20 μL of the saponified sample was injected for HPLC analysis.

### 2.9. LC–PDA and LC–PDA–MS analysis

Carotenoids analyses were performed by reverse phase chromatography on a Shimadzu HPLC equipment consisting of a LC-20 AD pump, CBM-20A controller, CTO-20A oven and SPD-M20A PDA detector at 450 nm (Shimadzu, France). We used a 250 × 4.6 mm ID S-5 μm YMC C30 column coupled with a 10 × 4.0 mm ID S-5 μm guard cartridge column (ImChem, Versailles, France). Analysis was performed at 25 °C. Mobile phase consisted in a gradient of MeOH (A), and MTBE (B). Both solvent A and B contained 0.1% BHT (w/v). Flow rate was 1.0 mL/min. The gradient profile of the mobile phase was set as follows: linear increasing gradient from 5% B to 30% B in 30 min; linear increasing gradient from 30% B to 50% B in 20 min; decreasing from 50% B to 5% B in 0.01 min. The column was equilibrated for 10 min at the starting conditions before each injection. Before each batch of HPLC analysis, stabilization time of the column was 30 min, and a blank (MeOH: MTBE, 1:1, v/v) was injected. A mixture of our four standards (all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-β-cryptoxanthin, all-*trans*-β-carotene) was injected, every 4 samples, in order to control eventual retention times deviations.

In order to identify additional carotenoids and compare the fruits carotenoids profiles, LC–PDA–MS runs were performed in positive APCI mode with a Shimadzu LCMS-2020 mass spectrometer (Shimadzu, France). A scanning rate of 2143 u/s was used in the range 50–2000 amu. Nebulizing gas flow was fixed to 1.5 mL/min. Interface voltage and temperature were 4.5 kV and 250 °C, respectively. The elution profile of the mobile phase was the same as with HPLC alone. The column was equilibrated for 5 min at the starting conditions before each injection.

### 2.10. Limits of detection and quantification

The detection and quantification (LOD and LOQ) were determined for all standards according to a US-EPA method (Hubaux & Vos, 1970). LOD and LOQ were calculated as $[6 * s_{a0}/a]$ and $[10 * s_{a0}/a]$ respectively, with $s_{a0}$ and $a$ the standard deviation on the intercept and the slope of the calibration curve, respectively.

**Table 1**
Surfaces responses model coefficients and their associated $p$-value between brackets, for each fruit-carotenoid combination, and corresponding $R^2$-values.

| Fruit/carotenoid (all-*trans* form) | Model coefficients and their associated $p$-value* | | | | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | $a$ | $b$ | $c$ | cste | |
| *Kaki (Diospyros kaki)* | | | | | |
| Lutein | −0.2791 (0.0002) | −0.2171 (0.0006) | 0.0028 (0.0001) | 25.5867 (<0.0001) | 0.79 |
| Zeaxanthin | −0.4472 (<0.0001) | −0.3379 (<0.0001) | 0.0043 (<0.0001) | 39.0709 (<0.0001) | 0.88 |
| β-Cryptoxanthin | −0.7867 (<0.0001) | −0.5748 (<0.0001) | 0.0074 (<0.0001) | 66.1549 (<0.0001) | 0.87 |
| β-Carotene | −0.1413 (<0.0001) | −0.0992 (0.0005) | 0.0013 (<0.0001) | 14.3762 (<0.0001) | 0.85 |
| *Peach (Prunus persica)* | | | | | |
| Lutein | −0.1530 (<0.0001) | −0.1120 (0.0001) | 0.0013 (0.0011) | 16.3796 (<0.0001) | 0.81 |
| Zeaxanthin | −0.1655 (<0.0001) | −0.1231 (0.0002) | 0.0015 (0.0016) | 17.1176 (<0.0001) | 0.85 |
| β-Cryptoxanthin | −0.1991 (<0.0001) | −0.1320 (0.0003) | 0.0016 (0.0014) | 19.9505 (<0.0001) | 0.82 |
| β-Carotene | −0.2349 (<0.0001) | −0.1438 (0.0009) | 0.0017 (0.0027) | 23.3559 (<0.0001) | 0.81 |
| *Apricot (Prunus armeniaca)* | | | | | |
| Lutein | −0.0875 (<0.0001) | −0.0406 (0.0418) | 0.0005 (0.0204) | 11.1671 (<0.0001) | 0.77 |
| Zeaxanthin | −0.0557 (<0.0001) | −0.0305 (0.0061) | 0.0004 (0.0005) | 7.5447 (<0.0001) | 0.85 |
| β-Cryptoxanthin | −0.0905 (<0.0001) | −0.0397 (0.0581) | 0.0005 (0.0144) | 10.4761 (<0.0001) | 0.80 |
| β-Carotene | −0.9959 (<0.0001) | −0.3423 (0.0101) | 0.0042 (0.0150) | 90.7016 (<0.0001) | 0.92 |

* Coefficient are considered as significant when associated with $p$-values <0.05.

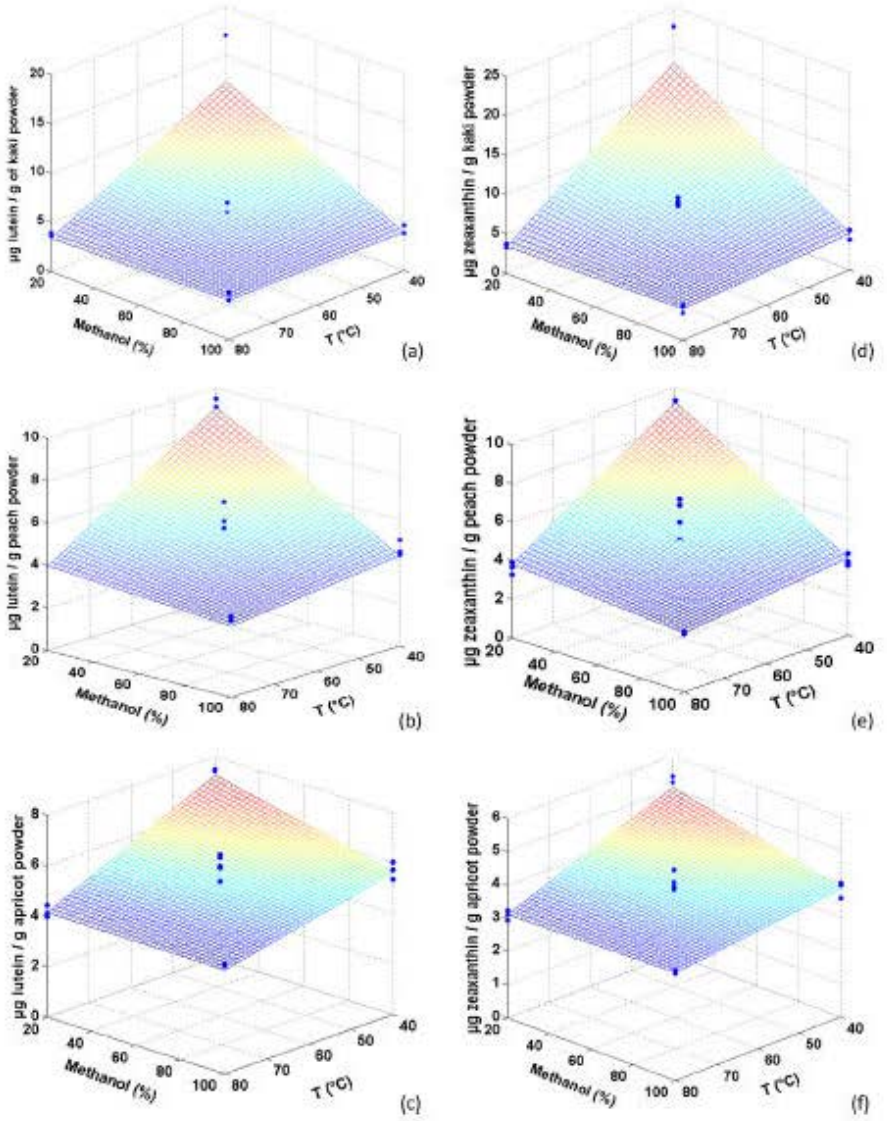



**Fig. 1.** Surface responses and their associated 21 experimental points, ●, all-*trans*-for lutein and all-*trans*-zeaxanthin extraction by ASE. Carotenoids contents are expressed in µg/g of fruit powder, as a function of temperature, *T* in °C, and % of methanol in the binary solvent (MeOH/THF): all-*trans*-lutein in kaki (2a), peach (2b) and apricot (2c); all-*trans*-zeaxanthin in kaki (2d), peach (2e) and apricot (2f).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sample characterization prior to ASE

Particle size distribution (see additional figure not included in the manuscript) of the three fruits powders showed that these powders are almost totally (>95% of the total volume) made of particles below 500 µm as recommended for ASE extractions on powder. Particles size ranged from 1 µm to about 1000 µm. Based on triplicates, measured moisture content of fruits (skin + flesh), expressed as g of water per 100 g of fresh weight, were found to be 77.66 ± 1.63%, 85.85 ± 2.79% and 87.00 ± 5.08% for kaki (*D. kaki*), peach (*P. persica*) and apricot (*P. armeniaca*), respectively. The significantly lower water content of kaki as compared to peach and apricot is in accordance with data from the Danish food composition databank, 2009 (www.foodcomp.dk), which indicates that this lower water content is balanced by a higher carbohydrate content of about 23 g/g of fresh product in kaki against only about 10 g/g of fresh product in peach and apricot. This could explain why we experienced clogging when running preliminary ASE experiments with kaki powder, especially at 80 °C. In order to prevent this clogging (sticky aspect at the bottom of the extraction cell) we therefore mixed our 2 g of kaki powder with 1 g of florisil (100–200 mesh).

### 3.2. Calibration curves and quantifications

$R^2$ values of 0.99 were achieved with the four quantified carotenoids. Limit of quantification (detection) were found to be 0.41 (0.25), 0.21 (0.13), 0.25 (0.15) and 0.63 (0.38) µg/mL for all-*trans*-lutein at 11.9 min, all-*trans*-zeaxanthin at 14.2 min, all-*trans*-β-cryptoxanthin at 22.9 min, and all-*trans*-β-carotene at 33.9 min, respectively.

### 3.3. Carotenoids extraction in kaki, peach and apricot

Table 1 lists the surfaces responses model coefficients and their associated *p*-value for each fruit-carotenoid combination. Fig. 1

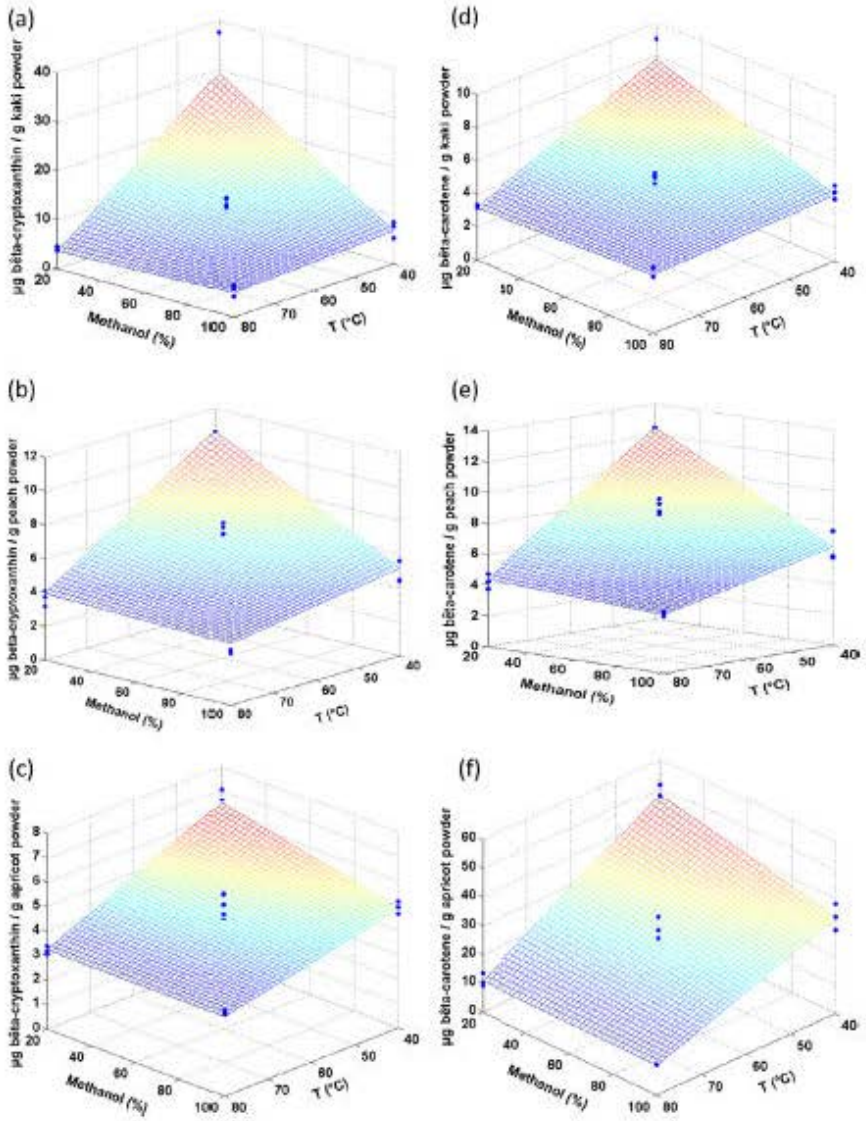



**Fig. 2.** Surface responses and their associated 21 experimental points, •, for all-*trans*-β-cryptoxanthin and all-*trans*-β-carotene extraction by ASE. Carotenoids contents are expressed in µg/g of fruit powder, as a function of temperature, *T* in °C, and % of methanol in the binary solvent (MeOH/THF): all-*trans*-β-cryptoxanthin in kaki (2a), peach (2b) and apricot (2c); all-*trans*-β-carotene in kaki (2d), peach (2e) and apricot (2f).

presents the experimental points and surfaces responses representing the amount, in µg, of all-*trans*-lutein (1a, 1b, 1c) and all-*trans*-zeaxanthin (1d, 1e, 1f) extracted per g of fruit powder. Fig. 2 presents the experimental points and surfaces responses representing the amount, in µg, of all-*trans*-β-cryptoxanthin (2a, 2b, 2c) and all-*trans*-β-carotene (2d, 2e, 2f) extracted per gram of fruit powder. Figure 3 presents carotenoids profiles obtained by HPLC with kaki, peach and apricot, after extraction under the optimal conditions identified in our experimental domain. In any cases, the variability of carotenoids extractions as a function of temperature and % of methanol in the solvent could be appropriately explained by a first order linear model with interaction between temperature and methanol % ($R^2$-values ranging from 0.77 up to 0.92). *p*-Values much lower than 0.05 showed that temperature, % methanol but also the interaction between these two factors clearly influenced the extraction yield whatever the fruits and carotenoids under concern.

Several observations can be made from the surface responses. At first, when using a high extraction temperature (80 °C), the binary solvent composition did not influence the carotenoids extraction, whatever the fruit. Similarly when using 100% methanol as a solvent, excepted with all-*trans*-β-carotene in apricot, temperature did not or slightly affected the extraction of carotenoids. In addition and surprisingly, both xanthophylls, whether they are dioxygenated (all-*trans*-lutein and all-*trans*-zeaxanthin) or monoxygenated (all-*trans*-β-cryptoxanthin), and all-*trans*-β-carotene, were all better extracted using MeOH:THF, 20:80, v/v, at 40 °C. With regard to the solvent, we expected (i) a better extraction of xanthophylls with higher proportions (60 or 100%) of the protic and polar solvent that is methanol; (ii) a better extraction of all-*trans*-β-carotene when using higher proportions of the aprotic and moderately polar solvent that is THF. Nevertheless it was not the case as presented in Figs 1 and 2, which clearly show that, at 40 °C and when using high pressure extraction (103 bars), THF is a more efficient solvent than methanol for xanthophylls as well as for a carotene such as all-*trans*-β-carotene.

Although carotenoids content of a fruit can be affected by many factors such as variety, agronomic technics and climatic conditions,

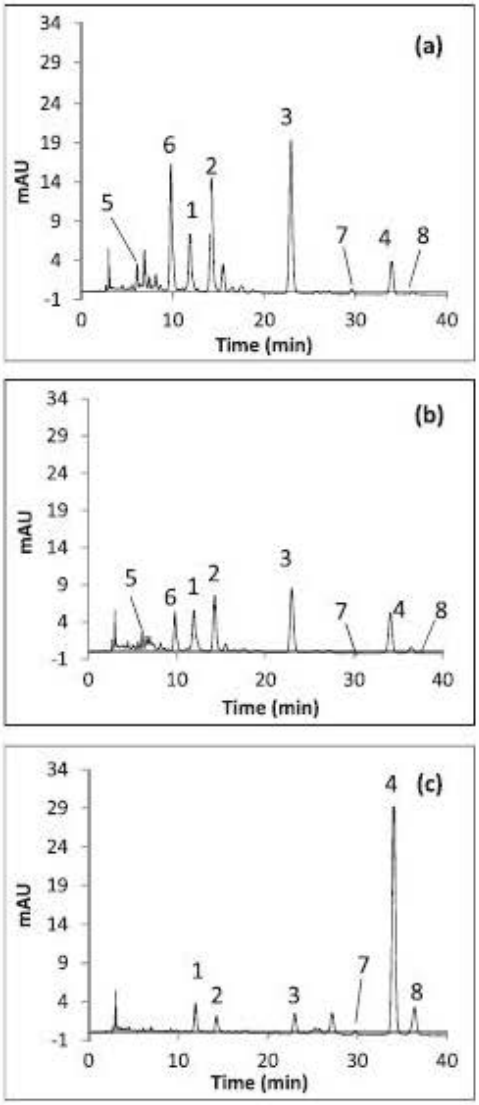



**Fig. 3.** Carotenoids profiles, obtained with the separation conditions used in this study, in flesh + peal of kaki (a), peach (b) and apricot (c) when using methanol/THF, 20:80, v:v and 40 °C temperature (optimal extraction conditions in our experimental domain). Quantified carotenoids: all-*trans*-Lutein (1), all-*trans*-zeaxanthin (2), all-*trans*-β-cryptoxanthin (3), all-*trans*-β-carotene (4). Unquantified identified carotenoids by LC-PDA-MS: all-*trans*-neoxanthin (5), all-*trans*-violaxanthin (6), 13-*cis*-β-carotene (7), 9-*cis*-β-carotene (8).

post-harvest conditions and resulting maturity, our results are quite in accordance with recent published studies where liquid extractions at atmospheric pressures were used in place of ASE extraction (see Table 2). For instance, based on a recent analysis of carotenoids content in 32 different astringent *kaki* cultivars where carotenoids content was expressed in μg/100 g of fresh weight, and considering a % dry matter of 23%, it was found that all-*trans*-β-cryptoxanthin, followed by all-*trans*-zeaxanthin, were the most abundant carotenoids in kaki, which we also observed in our astringent *D. kaki* L. var. Triumph (Zhou, Zhao, Sheng, Tao, & Yang, 2011). In peach we observed that all-*trans*-β-carotene, followed by all-*trans*-β-cryptoxanthin, were the most abundant carotenoids, which is in accordance with recent data from Campbell & Padilla-Zakour (2013) on three different peach varieties. In apricot, as currently and recently observed (Fratianni et al., 2013), all-*trans*-β-carotene is by far the most abundant carotenoid with more than 70% of the sum of all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-β-cryptoxanthin and all-*trans*-β-carotene. In addition and according to table 2 it seems that ASEis an appropriate method in order to achieve a better extraction of all-*trans*-lutein, as compared to extractions at atmospheric pressures observed by other authors. But this higher concentration of lutein that we observed can also be due to other steps such as the way we performed our transfer of extracted lutein in petroleum ether, the way we performed our saponification step which is crucial to hydrolyze lutein esters and therefore detect lutein, and finally the HPLC conditions. We used a 250 * 4.6 mm C30 column with a long gradient program, which is much more resolutive as compared to a C18 column with similar dimensions. With a C18 column, when one attempts to separate both polar (xanthophylls) and non polar (carotenes) carotenoids in one single HPLC run, it is difficult to find appropriate gradient and highly polar xanthophylls such as lutein may be not retained by the column, being directly lost in the injection peak without possible quantification. In our case, as presented below, we could for instance also detect violaxanthin, which is more polar than lutein.

### 3.4. Influence of extraction cycles number on extraction yield

In order to assess the influence of the number of static extraction cycles on carotenoids extraction yields, we performed extractions based on 1 or 5 static extraction cycles under the best conditions identified in our experimental domain (Methanol: THF, 20:80, v/v and 40 °C). Table 3 shows average and standard deviations of the extraction yields ($n = 3$) and mention whether the difference between these average yields is significant or not ($p < 0.05$ of a Student test). As can be seen, and as somewhat surprising at first sight, increasing cycles number has no effect on lutein extractions and even shows a negative effect on the three other carotenoids extractions. This observation is likely due to the fact (i) that we used 22 mL ASE cells for only 2 g of fruit powder at the bottom of the cells with glass beads up to the top of the cells and (ii) that in static mode the rinse volume, which was fixed to 60% of the cell volume (i.e. 13.2 mL), is automatically divided by 5 (i.e. 2.6 mL) for each extraction cycle. Whether we used 1 or 5 extraction cycles, the final solvent volume collected remained close to 30 mL (30 ± 1.5 mL). Using 5 cycles instead of one just results in five small rinsing volumes instead of a large one. For each rinsing step, that is each extraction cycle, the pressure drop is rapidly readjusted by addition of solvent at 103 bars. In our experimental conditions, it therefore appears that 5 small rinsing volumes of 2.6 mL are less efficient than one single and large rinsing volume of 13.2 mL. Visually, when opening the cells after extraction, the cakes of fruits powder were strongly discolored (grey–white) and did not appear more discolored after 5 extraction cycles as compared to 1 extraction cycle. Using extraction cells with a smaller volume closer from our samples volumes might however have shown an effect of the number of extraction cycles. It should also be stressed that longer ASE extraction time (10 to 25 min) of carotenoids from algae and red pepper in static mode was already shown to be of non-significant effect on the extraction yield (Cha et al., 2010). According to Table 3, it appears that the best ASE extraction conditions identified in our experimental domain give quite satisfactory extraction yield as compared to the reference soxhlet extraction. This is especially true with all-*trans*-β-carotene (101%) and all-trans-β-cryptoxanthin (84%), the less polar carotenoids quantified in this study. But the extraction yields of lutein and zeaxanthin, much more polar, remain acceptable (79% and 71%). The overall extraction yield considering the four quantified carotenoids and the three fruits, is 87%. This high extraction yield can be considered as excellent since it was achieved in one extraction cycle of 5 min at 40 °C, and using only 30 mL of organic solvent (MeOH:THF, 20:80, v:v).

**Table 2**
All-*trans* form of Lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin and β-carotene contents under the best ASE conditions identified in our experimental domain (T = 40 °C and 20% MeOH /80% THF for 1 extraction cycle) and comparison with data from three recent articles based on liquid extraction at atmospheric pressure.

| Fruit | Carotenoids in µg/g of fruit powder[1] and associated %[2] | | | | Σ four carotenoids |
|---|---|---|---|---|---|
| | Lutein | Zeaxanthin | β-Cryptoxanthin | β-Carotene | |
| Kaki (*Diospyros kaki*) this study | 12.67 ± 3.78 (18.67%) | 17.89 ± 3.96 (26.37%) | 29.44 ± 7.11 (43.39%) | 7.84 ± 1.01 (11.55%) | 67.84 ± 9.03 (100%) |
| Peach (*Prunus persica*) this study | 9.35 ± 0.22 (23.47%) | 7.85 ± 1.01 (19.71%) | 10.38 ± 0.28 (26.06%) | 12.25 ± 0.29 (30.75%) | 39.83 ± 1.11 (100%) |
| Apricot (*Prunus armeniaca*) this study | 7.27 ± 0.33 (10.98%) | 4.99 ± 0.50 (7.53%) | 6.41 ± 0.79 (9.68%) | 47.55 ± 3.91 (71.81%) | 66.22 ± 4.03 (100%) |
| Kaki (*Diospyros kaki*) (Zhou et al., 2011) on 32 astringent kaki cultivars[3] | 0.69 ± 0.64 (2.61%) | 7.05 ± 4.93 (26.63%) | 16.87 ± 9.39 (63.72%) | 1.86 ± 1.10 (7.04%) | 26.48 ± 10.68 (100%) |
| Peach (*Prunus persica*) (Campbell and Padilla-Zakour (2013) on 3 peach cultivars[4] | ND (0%) | 6.31 ± 1.44 (7.41%) | 11.90 ± 0.41 (13.99%) | 66.90 ± 5.02 (78.60%) | 85.12 ± 5.24 (100%) |
| Apricot (*Prunus armeniaca*) (Fratianni et al., 2013) | 4.30 ± 1.10 (5.45%) | 2.70 ± 0.60 (3.42%) | 10.60 ± 1.70 (13.45%) | 61.20 ± 5.60 (77.6%) | 78.8 ± 5.98 (100%) |

ND: not detected.
[1] With standard deviation based on $n = 3$ extractions.
[2] % of the sum of the 4 quantified carotenoids (µg) per g of fruit powder.
[3,4] Carotenoids contents expressed on a fresh weight basis and converted on a dry weight basis using dry weight percentages of 23% and 14% identified in this study for kaki and peach, respectively (similar data found on http://www.foodcomp.dk).

**Table 3**
Influence of the number of ASE static extraction cycles (1 or 5) on all-*trans* carotenoids extraction (µg carotenoid/g fruit powder) when using 20% methanol and 40 °C temperature (optimal extraction conditions in our experimental domain) and extraction yields (%) comparing the best extraction results achieved using ASE with our reference extraction method (soxhlet).

| Fruits | Cycles number | Lutein | Zeaxanthin | β-Cryptoxanthin | β-Carotene |
|---|---|---|---|---|---|
| *ASE extracted carotenoids in µg/g of fruit powder (average ± stdev)*[1] | | | | | |
| Kaki | 1 | 12.68 ± 3.78 | 17.90 ± 3.97* | 29.44 ± 7.11* | 7.85 ± 1.01* |
| (*Diospyros kaki*) | 5 | 7.64 ± 1.13 | 4.38 ± 0.46 | 14.96 ± 3.50 | 5.55 ± 0.74 |
| Peach | 1 | 9.35 ± 0.22 | 9.06 ± 0.26* | 10.37 ± 0.27* | 12.25 ± 0.29* |
| (*Prunus persica*) | 5 | 8.42 ± 0.77 | 3.02 ± 0.05 | 8.21 ± 0.50 | 9.62 ± 0.55 |
| Apricot | 1 | 7.27 ± 0.33 | 4.99 ± 0.50* | 6.41 ± 0.79* | 47.56 ± 3.91* |
| (*Prunus armeniaca*) | 5 | 6.62 ± 1.16 | 3.86 ± 0.94 | 4.98 ± 0.82 | 9.03 ± 9.67 |
| *ASE extraction yields using soxhlet extraction as a reference (%)*[2] | | | | | |
| Kaki | 1 | 86 | 79 | 99 | 101 |
| (*Diospyros kaki*) | | | | | |
| Peach | 1 | 89 | 64 | 67 | 99 |
| (*Prunus persica*) | | | | | |
| Apricot | 1 | 64 | 68 | 81 | 103 |
| (*Prunus armeniaca*) | | | | | |
| Average yield per carotenoid | 1 | 79 | 71 | 83 | 101 |
| Overall average yield | 1 | | | 87 | |

[1] $n = 3$.
* Extraction yield with one cycle is significantly better than extraction yield with 5 cycles when student test $p$-value is below 0.05.
[2] Extraction yield expressed in % and calculated as [(concentration in µg/g of fruit powder achieved with ASE extraction)/(concentration in µg/g of fruit powder achieved with the soxhlet reference extraction)] * 100.

### 3.5. Other carotenoids identification with LC–PDA–MS

Next to our four quantified carotenoids, LC–MS analysis made it possible to identify other carotenoids extracted in our three fruits matrices. The HPLC profiles of carotenoids (Figure 3) reveal the presence of additional xanthophylls such as all-*trans*-neoxanthin (RT = 6.14 min, $m/z = 583$, [M+H−18], $\lambda_{max}$ = 413/441/470 nm) and all-*trans*-violaxanthin (RT = 9.8 min, $m/z = 583$, [M+H−18], $\lambda_{max}$ = 425/445/469 nm), among other unidentified peaks likely also corresponding to xanthophylls. We also identified two additional carotenes such as 13-*cis*-β-carotene (RT = 29.6 min, $m/z = 537$, $[M+H]^+$, $\lambda_{max}$ = 426/452/476 nm) and 9-*cis*-β-carotene (RT = 36.2 min, $m/z = 537$, $[M+H]^+$, $\lambda_{max}$ = 342/425/446/472 nm). All-*trans*-neoxanthin (3 hydroxyl and 1 epoxy functions) and all-*trans*-violaxanthin (2 hydroxyl and 2 epoxy functions) are not commercially available in highly purified form. According to Fig. 3, it seems that kaki represents a good candidate for violaxanthin extraction/purification using preparative chromatography.

## 4. Conclusion

This study shows the efficiency of accelerated solvent extraction (ASE) for the extraction of food compounds of interest such as carotenoids from three different fruits (flesh + peel) largely

produced in Tunisia: kaki (*D. kaki* L.), peach (*P. persica* L.), apricot (*P. armeniaca* L.). In our experimental domain and based on our design of experiment, common optimal conditions were found to be 5 min static extraction at 40 °C with consumption of only 30 mL of organic solvent (MeOH:THF); (20:80); (v:v) under 103 bars. Surprisingly, these conditions which should have been more appropriate for carotenes also appeared to be the best ones for xanthophylls with average extraction yields of 79%, 71%, 84% and 101% for all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-β-cryptoxanthin and all-*trans*-β-carotene, respectively. As above discussed, this is likely to be due to the high pressure used but also to the fact that THF, as a moderately polar and aprotic solvent, is all simply an excellent solvent for carotenoids extractions. The twelve response surface showed $R^2$-values in the range 0.77–0.92 with highly significant coefficients both for temperature and % methanol but also for their interaction. From the three studied fruits, all-*trans*-β-cryptoxanthin and all-*trans*-zeaxanthin are predominantly found in kaki, while all-*trans*-β-carotene is predominantly found in apricot. Peach showed the lowest content in the four quantified carotenoids with 39.83 ± 1.11 μg/g powder, as compared to 67.84 ± 9.03 μg/g powder and 66.22 ± 4.03 μg/g powder with kaki and apricot, respectively. Finally LC–PDA–MS allowed a better characterization of the carotenoids contents of kaki, peach and apricot.

## Acknowledgements

This study was granted by the Tunisian Ministry of Higher Education & Research and the University Agency for Francophonie (AUF).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.072.

## References


Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry, 56*, 49–73.

Arvayo-Enriquez, H., Mondaca-Fernande, L., Gortarez-Moroyoqui, P., Lopez-Cervantes, J., & Rodriguez Ramirez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: A review. *Analytical Method, 5*(12), 2916–2924.

Barbero, G. F., Palma, M., & Barroso, C. G. (2006). Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(9), 3231–3236.

BCC Research LLC (2011). *The global market for carotenoids, report code: FOD025D*. Wellesley, MA, USA: BCC Research LLC.

Böhm, F., Edge, R., & Truscott, T. G. (2012). Interactions of dietary carotenoids with singulet oxygen ($^1O_2$) and free radicals: Potential effects for human health. *Acta Biochimica Plonica, 59*, 27–30.

Breithaupt, D. E. (2004). Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: Applicability of accelerated solvent extraction. *Food chemistry, 86*(3), 449–456.

Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal, 9*(15), 1551–1558.

Campbell, O. E., & Padilla-Zakour, O. I. (2013). Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International, 54*(1), 448–455.

Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D. G., Lee, D. U., & Pan, C. H. (2010). Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(2), 793–797.

Danish Food Composition Databank, National Food Institute, Technical University of Denmark (DTU). 2009. URL: <http://www.foodcomp.dk>. [Accessed 25.06.14].

Denery, J. R., Dragull, K., Tang, C. S., & Li, Q. X. (2004). Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica Chimica Acta, 501*(2), 175–181.

Dias, M. G., Oliveira, L., Camões, M. F., Nunes, B., Versloot, P., & Hulshof, P. J. M. (2010). Critical assessment of three high performance liquid chromatography analytical methods for food carotenoid quantification. *Journal of Chromatography A, 1217*(21), 3494–3502.

Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galan, M., Garrido-Fernandez, J., Pérez-Galvez, A., & Homero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activites. *Food Research International, 46*, 438–450.

Fratianni, A., Albanese, D., Mignogna, R., Cinquanta, L., Panfili, G., & Di Matteo, M. (2013). Degradation of carotenoids in apricot (*Prunus armeniaca* L.) during drying process. *Plant Foods for Human Nutrition, 68*(3), 241–246.

Guedes, A. C., Gião, M. S., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Pintado, M. E., Duarte, C. M. M., et al. (2013). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *Journal of Food Engineering, 116*(2), 478–482.

Hart, D. J., & John Scott, K. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry, 54*, 101–111.

Hietanen, M. L., Ollilainen, V., Linkola, E. K., Varo, P. T., & Koivistoinen, P. E. (1989). Carotenoids in Finnish foods: Vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37*(3), 655–659.

Hubaux, A., & Vos, G. (1970). Decision and detection limits for calibration curves. *Analytical chemistry, 42*, 849–855.

Ibañéz, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and microalgae, cyanobacteria and invertebrates. In M. Hayes (Ed.), *Marine bioactive compounds: Sources, characterization and applications* (pp. 55–98). Springer-Verlag GmbH: Heidelberg.

John Scott, K., Finglas, P. M., Seale, R., Hart, D. J., & de Froidmont-Görtz, I. (1996). Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in food. *Food Chemistry, 57*(1), 85–90.

Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxydants. *European Journal of Medicinal Chemistry, 70*, 102–110.

Kimura, M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2002). A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoid. *Food Chemistry, 78*(3), 389–398.

Koo, S. Y., Cha, K. H., Song, D. G., Chung, D., & Pan, C. H. (2012). Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. *Journal of Applied Phycology, 24*(4), 725–730.

Maiani, G., Caston, M. J., Catasta, G., Toti, E., Goni Cambrodon, I., Bysted, A., et al. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research, 53*(S2), 194–218.

Mendiola, J. A., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A, 1152*(1–2), 234–246.

Mezzomo, M., Maestri, B., Dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta, 85*, 1383–1391.

Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Meléndez-Martinez, A. J., et al. (2013). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry, 140*(4), 825–836.

Mustafa, A., Trevino, L. M., & Turner, C. (2012). Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. *Molecules, 17*(2), 1809–1818.

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta, 703*(1), 8–18.

Perera, C. O., & Yen, G. M. (2007). Functional properties of carotenoids in human health. *International Journal of Food Properties, 10*, 201–230.

Rivera, S., & Canela, R. (2012). Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules, 17*, 11255–11268.

Rodrigez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in food* (1st ed.). Washington: International Life Science Institute Press.

Rodriguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). *HarvestPlus handbook for carotenoids analysis. HarvestPlus technical monograph 2*. Washington, DC & Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

Taylor, K. L., Brackenridge, A. E., Vivier, M. A., & Oberholster, A. (2006). High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Journal of Chromatography A, 1121*, 83–91.

Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA. (2013). Technical note 208: Methods optimization in accelerated solvent extraction.

Zerlotti Mercadante, A. (1999). Chromatographic separation of caretenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 49*(1S), 71–73.

Zhou, C., Zhao, D., Sheng, Y., Tao, J., & Yang, Y. (2011). Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. *Molecules, 16*(1), 624–636.

# Chapitre V : Extraction des caroténoïdes avec le $CO_2$ supercritique

# V Extraction des caroténoïdes avec $CO_2$ supercritique

## V.1 Contexte

Dans le chapitre précédent nous avons mis en évidence l'intérêt de l'extraction accélérée par solvant sous pression (ASE). Trois facteurs ont été étudiés : la température (40, 60 ou 80°C), le % de méthanol dans un solvant binaire MeOH : THF (20, 60 ou 100 %), et le temps d'extraction au travers du nombre de cycles d'extractions statiques de 5 min (1, 3 ou 5). Le nombre de cycles d'extractions statiques n'influant pas sur les concentrations en caroténoïdes quantifiés, nous avons (i) fixé le nombre de cycles d'extractions de 5 min à 1, (ii) effectué un plan d'expérience testant uniquement les effets de la température et du % de méthanol sur les rendements d'extraction des 4 caroténoides pour lesquels nous possédions des standards (forme all-*trans* de la lutéine, de la zéaxanthine, de la β-cryptoxanthine et du β-carotène). Ce plan était constitué de 7 expériences (4 points extrêmes et un point central répété 3 fois). Chaque combinaison étant testée en triplicata pour chaque fruit, un total de 63 extractions a donc été effectué.

Dans notre domaine expérimental, des surfaces de réponses ont été établies sur la base d'un modèle linéaire de premier ordre avec interactions simple. Les conditions optimales trouvées pour les xanthophylles aussi bien que pour les carotènes sont : 1 seule cycle d'extraction de **5 min** à **40°C** avec un ratio volumique (MeOH : THF) de **(20 : 80 ; v:v)** impliquant une consommation de seulement **30 mL** de solvant d'extraction (MeOH : THF) à une pression de **103 bars**. Pour les trois fruits, le rendement relatif d'extraction exprimé en  % du rendement observé par extraction Soxhlet, était de **87%** (et 100 % pour le β-carotène). Les avantages de l'ASE sont ici évidents dans la mesure où l'extraction est considérée comme achevée au bout de 5 minutes d'extraction au lieu de 6 h environ avec le Soxhlet, à plus basse température (40 °C au lieu de 66°C avec le Soxhlet), en utilisant seulement 30 mL de solvant au lieu de 250 mL avec le Soxhlet. Ce procédé consomme donc nettement moins de temps, d'énergie thermique et de solvant.

De manière surprenante, des conditions d'extraction optimales similaires ont été observées pour les xanthophylles (polaires) et les carotènes (apolaire) vis-à-vis du solvant d'extraction.  L'usage d'une pression d'extraction élevée (103 bars) d'une part, et d'un solvant  assez peu polaire et aprotique tel que le THF, efficace aussi bien pour les xanthophylles que les carotènes, peut expliquer ce résultat. Des $R^2$ de 0,77 à 0,92 ont été obtenus pour toutes les surfaces de réponse  avec une distribution normale des résidus mise en évidence par un test de Shapiro-Wilk. Des effets significatifs sur le rendement d'extraction ont été observés aussi bien pour le % de méthanol que pour la température et leur interaction.

La comparaison des profils caroténoïdique des trois fruits témoigne de la richesse du persimmon en all-*trans*-β-cryptoxanthine et en all-*trans*-zéaxanthine, tandis que l'abricot est le plus riche en all-*trans*-β-carotène. La pêche, elle, présente un profil caroténoïdique assez équilibré entre xanthophylles et carotènes, sans caroténoïdes très majoritaires et aussi abondants que ceux trouvés dans le persimmon ou l'abricot. Les sommes des 4 teneurs en caroténoïdes quantifiés (lutéine, zeaxanthine, β-cryptoxanthine et β-carotène) sont de de 67,84 ± 9,03, 66,22 ± 4,03 et 39,83 ± 1,11 µg/g de poudre de fruit chez le persimmon, l'abricot et la pêche, respectivement.

L'extraction par solvant accélérée (ASE), rarement appliquée à des matrices alimentaires dans la littérature, s'est révélée particulièrement efficace pour l'étude des profils caroténoïdiques des 3 fruits étudiés. Cette méthode d'extraction demeure toutefois une méthode nécessitant l'usage de solvants organiques en quantités qui, bien que beaucoup plus faibles que celles utilisées en Soxhlet, n'en demeurent pas moins non négligeables.

Nous avons donc choisi de nous intéresser à un autre procédé d'extraction : l'extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction : SFE) en utilisant le $CO_2$ comme fluide supercritique. Ce solvant présente l'avantage d'être non inflammable, peu cher, non explosif et non toxique tout en étant recyclable après décompression et séparation des produits d'extraction. L'une des caractéristiques fondamentales du $CO_2$ supercritique ($CO_2$ à plus de 73 bar et 31 °C) est de pouvoir présenter une densité proche de 1 (donc proche de celle d'un liquide) tout en présentant une viscosité proche de celle d'un gaz, ce qui lui confère une aptitude à diffuser au cœur de la matrice avec une grande facilité tout en entraînant les composés apolaires et de masse molaire faible à modéré avec lui. Comme vu en partie bibliographique, les propriétés du $CO_2$ supercritique (densité, diffusivité, pouvoir solvant) peuvent varier fortement selon le couple Pression-Température considéré. Il est souvent utilisé en présence d'un peu de cosolvant, en général de l'éthanol, afin de pouvoir aussi extraire des composés plus polaires ou apolaires et de forte masse molaire, que le $CO_2$ seul ne peut pas entraîner.

Etant donné la grande variété et la quantité de caroténoïdes (xanthophylles mais aussi carotènes) observés dans le persimmon lors de l'étude d'extraction par méthode ASE, nous avons décidé de focaliser notre étude d'extraction par $CO_2$ supercritique sur la matrice persimmon.

Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser une approche par plan d'expérience basée sur la définition de surfaces de réponse *via* un plan central composite à faces centrées ($\alpha$=1). Cinq facteurs ont été considérés : pression (P, bars), température (T, °C), débit de $CO_2$( D, mL/min), pourcentage en cosolvant (E, % éthanol), temps d'extraction (t, min), avec trois niveaux par facteur.

Le plan composite contenait 28 expériences (26 points sur les sommets et les faces d'un hypercube plus 2 points centraux). Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata (n=2), nécessitant ainsi

56 expériences. La réponse à optimiser était la concentration des caroténoïdes, C, en µg/ g de matière sèche (poudre de fruit).

Un modèle linéaire de second ordre avec interaction à deux facteurs, a été appliqué avec des effets significatifs considérés pour des valeurs de *p* inférieure à 0,05. La normalité de la distribution des 58 résidus a été testée par un test de Shapiro-Wilk, pour chacun des quatre caroténoïdes quantifiés.

Les conditions d'extraction optimum ont ainsi pu être identifiées dans notre domaine expérimental, pour les xanthophylles et pour les carotènes. Les rendements d'extraction relatifs à chaque caroténoïde ont ensuite été comparés à ceux obtenus par Soxhlet.

Cette étude a fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication dans Food Chemistry en 2015, et qui compose le corps de ce chapitre.

**Khalil Zaghdoudi**, Xavier Framboisier, Céline Frochot, Régis Vanderesse, Danielle Barth, Jamila Kalthoum-Cherif, Fabrice Blanchard, Yann Guiavarc'h. Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.). Submitted to **FOOD Chemistry** in September 2015. Statut: with Editor.

# Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki L.*)

**Khalil Zaghdoudi[1-3], Xavier Framboisier[1], Céline Frochot[1], Régis Vanderesse[2], Danielle Barth[1], Fabrice Blanchard [1], Yann Guiavarc'h[1]***

**Authors are affiliated to:**

[1]Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS-Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy**, France**

[2] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, CNRS-Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, **France**

[3] Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement, LACReSNE, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021 Bizerte, Université de Carthage, **Tunisie**

*Author to whom correspondence should be addressed

☎: +33 (0)3 83 17 51 90

Fax:+33 (0)3 83 32 29 75

✉:yann.guiavarch@univ-lorraine.fr

**Short title**: "SFE extraction of carotenoids from Persimmon"

**Abstract:**

Supercritical carbon dioxide with ethanol as co-solvent was used to extract carotenoids from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.). Based on a response surface methodology (RSM), a predicting model describing the effects of $CO_2$ temperature, pressure, flow rate, ethanol percentage and extraction time was set up for each of the four carotenoids of interest. The best extraction yields in our experimental domain were found at 300 bars, 60 °C, 25 % (w/w) ethanol, 3 mL/min flow rate and 30 min for xanthophylls (all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin and all-*trans*-β-cryptoxanthin). The yields were 15.46 ± 0.56, 16.81 ± 1.74 and 33.23 ± 2.91 µg/g of persimmon powder for all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin and all-*trans*-β-cryptoxanthin, respectively. As a non-oxygenated carotenoid, all-*trans*-β-carotene was better extracted using 100 bars, 40°C, 25 % (w/w) ethanol, 1 mL/min flow rate and 30 min extraction time, with an extraction yield of 11.19 ± 0.47 µg/g of persimmon powder.

**Chemicals**

all-*trans*-lutein (PubChem CID: 6433159)

all-*trans*-zeaxanthin (PubChem CID: 5280899)

all-*trans*-β-cryptoxanthin (PubChem CID:5281235)

all-*trans*-β-carotene (PubChem CID:5280489)

**Keywords:** persimmon, carotenoids, supercritical fluid extraction (SFE), surface response methodology (SRM), modeling.

## 1. Introduction

Carotenoids are lipid soluble pigments produced as secondary metabolites in fruits, vegetables, algae, fungi and some bacteria. They are widely used in food Industry, for their coloring property (yellow, orange, red), but also as ingredients in nutraceuticals and cosmeceuticals, for their anti-oxydative properties and especially protection against photooxidative reactions (Anunciato & Da Rocha Filho, 2011). Indeed, when exposed to ultraviolet (UV) irradiation, skin is also exposed to photooxidative damage induced by the formation of reactive oxygen species such as singlet molecular oxygen ($^1O_2$), superoxide radical anion ($O^{2\cdot-}$),and peroxyl radicals (Darr & Fridovich, 1994). Photooxidative damage affects cells lipid, proteins, nucleic acids and are considered to be involved in various skin pathologies such as erythema, premature aging of the skin, and skin cancer (Taylor, Dawsey & Albanes, 1990). Carotenoids are considered with great interest because of their excellent ability to scavenge singlet molecular oxygen and peroxyl radicals generated during photooxidation (Jomova & Valko, 2013).They can be divided in two groups : oxygenated carotenoids, called xanthophylls, and non-oxygenated carotenoids, called carotenes. To date, about 600 carotenoids have been identified in nature and humans have access to about 40 carotenoids through their diet, mainly through fruits and vegetables (Fernandez-Garcia, Carvajal-Lérida, Jarén-Galan, Garrido-Fernandez, Pérez-Galvez & Hornero-Méndez, 2012).

Many efforts were put on the development of improved carotenoids extraction processes from complex vegetal/animal food matrices as well as on their better identification through various analytical methods. Different extractions processes and chromatographic methods to assay carotenoids in food matrices were the topic of several recent reviews (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2011; Arvayo-Enriquez, Mondaca-Fernández, Gortarez-Moroyoqui, Lopez-Cervantes & Rodriguez-Ramirez, 2013). In a brief and non-exhaustive way, three main categories of extraction technics are reported in the literature, which are (i) the atmospheric liquid extraction with Soxhlet, maceration or ultrasound methods (Mezzomo, Maestri, dos Santos, Maraschin, Ferreira, 2011), (ii) the pressurized liquid extraction (PLE), also known as accelerated solvent extraction (ASE) (Zaghdoudi et al, 2015; Mustafa, Tervino, Turner, 2012; Breithaupt, 2004), and (iii) the supercritical fluid extraction (SFE), which is often based on the use of supercritical $CO_2$ as solvent with addition of organic co-solvent such as ethanol (Guedes et al, 2013).

Supercritical $CO_2$ is increasingly used as non-flammable, non-toxic and recyclable solvent for the extraction of biomolecules such as carotenoids. The possibility to tune $CO_2$ properties (density, viscosity, diffusivity) by playing on pressure and temperature enables the extraction of “organic solvent-free”

essential oils/oleoresins, mainly from vegetal matrices. However, many factors can affect the extraction process efficiency. Next to pressure and temperature these factor are the % of co-solvent used (often ethanol), the $CO_2$ flow rate, the extraction time, the matrix characteristics (water content, particles size, porosity, chemistry…), the extractor shape and dimensions and obviously the compounds to extract. Consequently, SFE extraction of carotenoids is a complex process requiring knowledge on the importance of these factors as well as of their interactions. In order to face such multifactorial conditions, Design of Experiment (DoE), and especially Response Surface Methodology (RSM), can be useful to optimize extraction process. To date, only few studies on SFE extraction of carotenoids from vegetal matrices made use of DoE (RSM) in order to achieve a better control of the extraction process. Furthermore, when RSM is used, it is often taking into account three factors only (pressure, temperature with time or % co-solvent) according to a recent review on SFE extraction from De Melo, Silvestre, & Silva, (2014). Regarding SFE extraction of carotenoids, we found only two published studies, both focusing on lycopene extraction from tomato skin (Kassama, Shi, & Mittal, 2008) and tomato pomace (Huang, Li, Niu, Li, & Zhang, 2008). Pressure, temperature and % co-solvent with two levels per factors were considered for tomato skin whereas, pressure, temperature and extraction time with 3/5 levels per factor were considered for tomato pomace. The only one study on SFE extraction of carotenoids in persimmon (*Diospyros kaki*) was performed by Takahashi et al. in 2006. Nevertheless, these authors did not use RSM and studied the influence of two factors only (temperature and ethanol %) at the only pressure of 300 bars.

The major aim of this study was to investigate the potential of SFE techniques for the extraction of carotenoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.) through the use of RSM involving 5 different factors. After an accurate description of our sample preparation and particle size distribution, the influence of extraction temperature, pressure, time, together with $CO_2$ flow rate and ethanol % on SFE extraction was investigated through a response surface methodology approach (five factors, three levels per factor), focusing on four carotenoids: three xanthophylls (all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*-β-cryptoxanthin) and one carotene (all-*trans*-β-carotene). For convenience, the "all-*trans*" specification will not be used in this article. Extraction performances were also compared, mainly in terms of time and solvent consumption, with extraction results achieved with a classical Soxhlet extraction used as a reference.

## 2. Material and Methods

### *2.1. Chemicals*

β-carotene (Type II synthetic, purity > 95%), lutein from marigold, β-cryptoxanthin (purity > 97%), zeaxanthin (purity > 95%), and butylated hydroxytoluene (BHT, purity ≥ 99%) were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). HPLC organic solvents were of analytical grade: methanol (MeOH), absolute ethanol (EtOH), chloroform and hexane were from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), methyl-tert-butyl-ether (MTBE) was from Fisher Scientific (Loughborough, UK), petroleum ether (PE) was from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a purified water system Arium®611UV from Sartorius (Göttingen, Germany) with a resistivity of 18,2 MΩ*cm. Sodium chloride (NaCl, purity > 99%) and potassium hydroxide (KOH, purity > 99%) were obtained from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Liquid Nitrogen was from Air Liquide (Nancy, France). Carbon dioxide (purity ≥ 99,995%) was from Messer (Nancy, France).

*2.2. Plant materials*

The present investigation was focused on persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits cultivated in Tunisia (persimmon var. Triumph from the North region, known under the appellation “Krima”). Twenty seven persimmons were harvested at full maturity from three selected trees.

*2.3. Samples preparation and characterization*

Selected fruits were washed with distillated water and stored at -20 °C under a steam of nitrogen in order to prevent oxydation. Six kg of persimmon whole fruit (flesh and peel) were manually sliced in small pieces, frozen at -80°C and, then freeze-dried during 48 hours with a CryoTec freeze-dryer (Saint-Gély-du-Fesc, France) with a separated cold trap at -70°C, plates temperature set to -20°C and a working pressure of 15 Pa. Freeze-dried fruits pieces were then placed in a desiccator containing $P_2O_5$ in order to prevent water sorption; before extraction, fruits pieces were milled with a Moulinex coffee grinder (Ecully, France) with adding small amount of liquid nitrogen to prevent oxidation during grinding. Powders were stored in a desiccator under extraction. Particle size distribution of kaki powder was measured through dynamic light scattering with a Malvern Mastersizer 2000 apparatus (Malvern, United Kingdom) in absolute ethanol. The residual water content of the fruit powder was gravimetrically measured after 24h convection drying at 105°C of 0.5 g of persimmon sample in triplicate.

*2.4. Supercritical Fluid Extraction process*

For each process condition, extractions of carotenoids from Persimmon fruit powder were conducted in duplicate by using a continuous automated high-pressure supercritical fluid equipment (SFC-$CO_2$) from

JASCO (Tokyo, Japan). This equipment consisted in a $CO_2$ pump (Pu-2080-$CO_2$ Plus unit, JASCO, Japan) and a semi-micro HPLC pump for ethanol as co-solvent (Pu-2085 Plus unit, JASCO, Japan). The $CO_2$ pump was equipped with an internal Peltier cooling system for cooling at -4°C. In order to be sure that $CO_2$ coming from the $CO_2$ bottle was in the liquid form, before pumping by the $CO_2$ pump, an additional cooling of $CO_2$ at -4°C was performed with a Lauda RM6 cryostat (Lauda-Königshofen, Germany). The pressure was controlled with an automated back pressure regulator (BP-2085 Plus unit, JASCO, Japan) at a precision of ± 0.2 MPa of the setting value. This back pressure regulator (BPR) is based on the use of a $CO_2$ flow-switching valve (FSV) mechanism that enables stable system pressure control together with efficient collection of the SFE extract in a glass tube. Because $CO_2$ decompression is highly endothermic (Joule-Thomson effect), especially when using "high" $CO_2$ mass flow, and can generate $CO_2$ dry ice at the exit of the BPR, the latter was equipped with an internal Peltier heating system maintained at 60°C in order to avoid $CO_2$ solidification during decompression. Stainless steel cylindrical extractor vessel of 1 mL (TOP Industries, France) was used for carotenoids extraction. This vessel was made of a ¼ inch (6.35/4.6 mm external/internal diameter) * 65 mm length tubing section connected to 1/16 inch stainless steel tubing with Swagelok VCR adaptors (Solon, Ohio, USA) equipped with stainless steel pieces placed on both extremities of the reactors. Extractors and tubing were placed in a L-7350 Merck oven (Lyon, France) for temperature regulation with a precision of ± 0.15 °C of the setting value. **Figure 1** shows the schematic flow diagram of the extraction equipment. For each extraction 0.5 g of freeze dried powder was loaded in the extractor. $CO_2$ was pumped at constant flow rate and pressure into the extractor vessel. Carotenoids extracts were collected in 60 mL amber vials at the exit of the BPR. Extraction of carotenoids was conducted using pure $CO_2$ (99,995 %) and absolute ethanol (99 %). At the end of each experiment the extractor was emptied (discolored sample removed), disassembled, and extractor's elements were thoroughly washed with distilled water and acetone before drying. Sonication in water was used for the cleaning of sintered stainless steel filters.

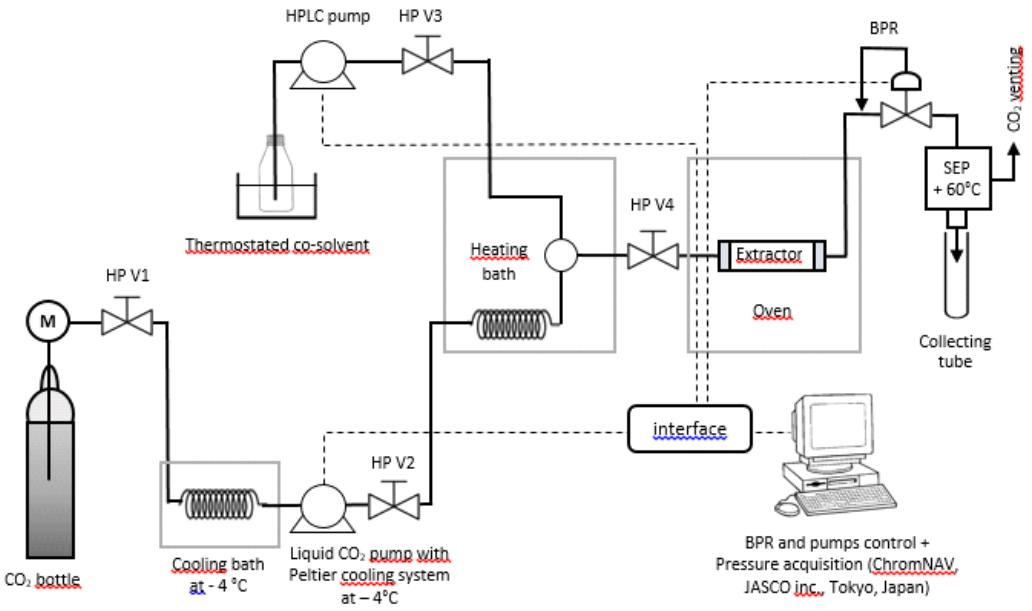



**Figure 1:** Schematic view of the SFE installation. M: manometer, HP V1 to HP V4: high pressure manual valves, BPR: Back Pressure Regulator, SEP: Separator heated at 60°C with a Peltier system. Solid black lines represent tubing for $CO_2$ and ethanol as cosolvent. Dashed lines represent BPR and pumps control from ChromNAV software.

### *2.5. Soxhlet extraction*

In order to evaluate the efficiency of the carotenoids extraction using the SFE extraction method, we used a reference method based on a classical Soxhlet extraction. Indeed, this method based on the use of organic solvents at atmospheric pressure is often used as a reference method leading to a total extraction of carotenoids. Two grams of orange colored fruit powder were mixed with 2 g of florisil 100–200 mesh and submitted to a Soxhlet extraction with 250 mL of solvent (MeOH:THF, 1:1, v/v) during 6 h at 66 °C (reflux temperature of THF at atmospheric pressure) up to stabilization of the extract absorbance and strong discoloration of the fruit sample, which turned to slightly pink-clear grey color. SFE-$CO_2$ extraction yields were calculated as a percentage, taking Soxhlet extraction results as a reference.

### *2.6. Experimental design*

177 According to a recent review based on 600 peer reviewed papers published between 2000 and 2013 and
178 dealing with supercritical extraction processes, De Melo, Silvestre, & Silva, (2014), observed that factors
179 pressure and temperature were chosen for experimental designs in 94 % and 92 % of the works,
180 respectively. The third most chosen factor is extraction time, which was present in 42 % of the works. Co-
181 solvent concentration, matrix particle diameter and flow rate followed the latter with only 20 %, 15 %
182 and 13 %, respectively. The most found factor combination was pressure-temperature-extraction time.
183 In this study, we decided to use a design of experiment including 5 factors: pressure, P (bars),
184 temperature, T (°C), $CO_2$ flow, F (mL/min), mass % of ethanol, E, mixed with $CO_2$, and extraction time,
185 time (min). Three levels were applied to each of the five factors as introduced in **Table 1.**

186 **Table 1.** Independent factors and coded levels

| Symbol | Factor | Coded levels | | |
|---|---|---|---|---|
| | | -1 | 0 | 1 |
| | | Uncoded levels | | |
| **T** | Temperature (°C) | 40 | 50 | 60 |
| **P** | Pressure (bar) | 100 | 200 | 300 |
| **E** | Ethanol (%) | 5 | 15 | 25 |
| **F** | Flow rate (mL/min) | 1 | 2 | 3 |
| **time** | Time (min) | 30 | 70 | 110 |

187

188 The response to maximize was the carotenoids yields, C, expressed in µg of carotenoid/g of freeze-dried
189 fruit powder for lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene and the sum of these four carotenoids.
190 With help of JMP 10 software from SAS institute Inc. (Cary, NC, USA), we used a response surface design,
191 which was a Central Composite Design (CCD) with an axial value of 1 (centered faces). This DoE required
192 28 experiments to run (26 corner and centered face points, 2 central points) and all experiments were
193 conducted in duplicate, thus requiring 56 SFE extraction runs.

194 As seen later, second order linear model with only two-factor interactions (equation 1) was shown to
195 provide satisfying predictions, of the experimentally observed carotenoids yields. Equation 1 was
196 significantly simplified by just keeping terms with factors and two-factor interactions showing p-value
197 below 0.05. Finally, a Shapiro-Wilk test was performed on each set of regression residuals in order to
198 assess their normal distribution.

(Equation 1)

$$\hat{C} = a_1 \cdot P + a_2 \cdot T + a_3 \cdot F + a_4 \cdot E + a_5 \cdot time + a_6 \cdot P^2 + a_7 \cdot T^2 + a_8 \cdot F^2 + a_9 \cdot E^2 + a_{10} \cdot time^2 + a_{11} \cdot P \cdot T + a_{12} \cdot P \cdot F + a_{13} \cdot P \cdot E + a_{14} \cdot P \cdot time + a_{15} \cdot T \cdot F + a_{16} \cdot T \cdot E + a_{17} \cdot T \cdot time + a_{18} \cdot F \cdot E. + a_{19} \cdot F \cdot time + a_{20} \cdot E \cdot time + a_{21}$$

*2.7. Standards preparation and calibration curve*

All standards stock solutions were prepared and kept under nitrogen atmosphere at -20 °C until analysis. β-carotene (5 mg) was dissolved in 50 mL of hexane, β-cryptoxanthin (1 mg) was dissolved in 10 mL of hexane, zeaxanthin (1 mg) was dissolved in 10 mL of chloroform and lutein (1 mg) was dissolved in 10 mL of absolute ethanol. Accurate concentration of the stock solution was measured with a Shimadzu UV 3600 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using appropriate extinction coefficient (ε) in $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ and wavelength (nm) for each standard as follows: β-carotene-2592 at 450 nm in hexane (Scott, Finglas, Seale, Hart, & de Froidmont-Görtz, 1996); zeaxanthin-2480 at 451 nm in hexane (Hart & Scott 1995), lutein-2550 at 445 nm in ethanol and β-cryptoxanthin-2460 at 451 nm in hexane (Heinonen, Ollilainen, Linkola, Varo, & Koivistoinen, 1989). All stock solutions were subdivided into 1 mL aliquots, transferred in amber vials and stored under nitrogen atmosphere at -20 °C before analysis. Working solutions of each standard were daily prepared from aliquots and absorbance was checked. Dilution were performed in HPLC injection solvent (MeOH: MTBE, 1:1, v/v) with addition of 0.1 % BHT (w/v) in order to prevent oxidation. Standards curves were built with seven different concentrations for each carotenoid (1.4, 1.6, 2.0, 2.5, 3.3, 5, 10 µg/mL).

*2.8. Preparation of SFE & Soxhlet carotenoids extracts for HPLC analysis*

SFE and Soxhlet carotenoid extracts were prepared for HPLC analysis according to the method described by Zaghdoudi et al, (2015) conducted under limited light. At first, SFE-$CO_2$ extract was homogenized with a vortex (Scientific Industries Inc., New York, U.S.A ) at 13,500 rpm during 1 min and adjusted to required volume with absolute ethanol, (for Soxhlet extraction no adjustment volume was added). Carotenoids were then partitioned to petroleum ether phase containing 0.1 % BHT (w/v) by adding an appropriate volume of 10% (w/v) aqueous sodium chloride solution. This liquid/liquid extraction was repeated at least 3 times in order to achieve a total transfer of carotenoids toward the petroleum ether phase. Organic phase was subsequently washed three times with an appropriate volume of ultrapure water in order to remove residual NaCl traces under neutral pH, and concentrated to dryness at 30 °C under nitrogen flow using a Turbo Vap® LV (Biotage AB, Uppsala, Sweden). The residue was dissolved in 5 mL of

mobile phase (MeOH:MTBE, 1:1, v/v) containing 0.1 % BHT (w:v) and filtered through 0.45 µm PVDF syringe filters (Pall Life Sciences, Ann Arbor, PN, USA). Then 2 mL of the filtered solution was mixed with 1mL of MeOH containing 0.1 % BHT (w/v) and saponified with 1 mL of 20 % (w/v) methanolic KOH solution under nitrogen, in the dark, for 1 h, at room temperature. 20 µL of the saponified sample was injected for HPLC analysis.

*2.9. LC-PDA analysis*

The carotenoids quantitative analyses were performed by reverse phase chromatography on a Shimadzu HPLC equipment consisting of a LC-20 AD pump, CBM-20A controller, CTO-20A oven and SPD-M20A PDA detector at 450 nm (Shimadzu, Marne La Vallée, France), using a 2504.6 mm ID S-5 µm YMC C30 column coupled with a 104.0mm ID S-5µm guard cartridge column (ImChem, Versailles, France). Analysis was performed at 25°C. Mobile phase consisted in a gradient of MeOH containing 0.05 M of ammonium acetate (A), and MTBE (B). Both solvent A and B contained 0.1% BHT (w/v) and 0.05 % of triethylamine (w/v). Flow rate was 1.0 mL/min. The gradient profile of the mobile phase was set as follows: linear increasing gradient from 5 % B to 30 % B in 30 min; linear increasing gradient from 30 % B to 50 % B in 20 min; linear decreasing gradient from 50 % B to 5 % B in 0.01 min. The column was equilibrated for 10 min at the starting conditions before each injection. Before each batch of HPLC analyses, stabilization time of the column was 30 min, and a blank of (MeOH: MTBE, 1:1, v/v) was injected. A mixture of our four standards (lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene) was injected, every 5 samples, in order to control eventual retention times deviations. Carotenoids in the extracts were quantified using external calibration curves.

*2.10. Limits of detection and quantification*

The detection and quantification (LOD and LOQ) were determined for all standards according to a US-EPA method (Hubaux & Vos 1970). LOD and LOQ were calculated as [$6*s_{a0}/a$] and [$10*s_{a0}/a$] respectively, with $s_{a0}$ and $a$, the standard deviation on the intercept and the slope of the calibration curve, respectively.

## 3. Results and discussion

*3.1. Sample characterization*

The water content of persimmon fruits (skin + flesh) was found to be 75.45 ± 0.48 %, which is in accordance with our previous results (Zaghdoudi et al, 2015).The residual water content of the freeze-dried powder was found to be 13.67 ± 0.94 % by additional drying at 105°C during 24h. Particle size distribution is available in supplementary materials, and showed that the powder is totally (>95 % of the total volume) made of particles with sizes below 500 µm with a majority of particles around 100 µm. Particle size ranged from 1 µm to 1000 µm (Figure 2).

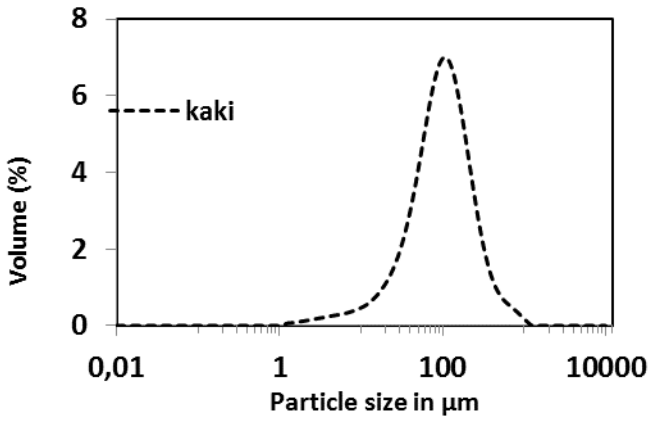



**Figure 2:** Persimmon freeze-dried powder particle size distribution

*3.2. Calibration curves and quantifications*

Calibration curves of the four quantified carotenoids presented $R^2$ values of 0.99. The limits of quantification (detection) were found to be 0.41 (0.25) µg/mL for lutein, 0.21 (0.13) µg/mL for zeaxanthin, 0.25 (0.15) µg/mL for β-cryptoxanthin and 0.63 (0.38) µg/mL for β-carotene. A chromatogram showing peaks corresponding to these carotenoids extracted from persimmon is available in **Figure 3**.

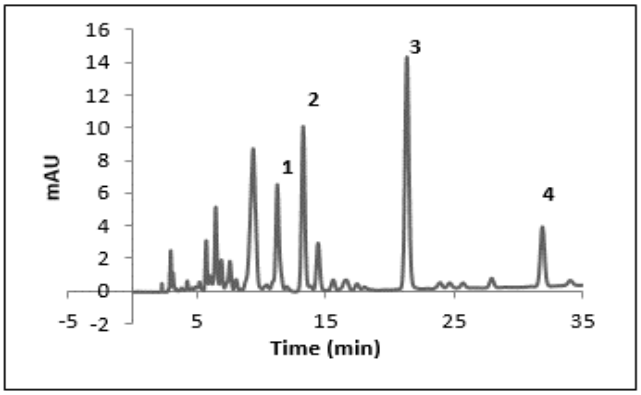



**Figure 3** : Carotenoids profile obtained by HPLC in (flesh + peel) of persimmon (*Diospyros kaki* L.). Lutein (1) at 11.66 min, zeaxanthin (2) at 13.89 min, β-cryptoxanthin (3) at 22.7 min, β-carotene (4) at 34.04 min.

*3.3. SFE extraction of carotenoids from persimmon*

*3.3.1. Xanthophylls extraction*

As can be seen from **Table 2**, the best experimental conditions for the extraction of lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin were found to be the same *i.e.* 300 bars, 60°C, 30 min, 25 % ethanol (w/w) and 3 mL/min $CO_2$ flow. In these conditions, extraction yields of 15.46 ± 0.56, 16.81 ± 1.74 and 33.23 ± 2.91 µg/g of persimmon powder were observed with lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin, respectively. Takahashi et al., (2006) also observed that xanthophylls from persimmon peel were better extracted at 300 bars and 60°C with 10 % ethanol but they tested one single pressure of 300 bars at 5 five different temperatures (40, 50, 60, 70, 80°C).

**Table 2.** SFE extraction yields in xanthophylls (lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin) and β-carotene under the best and worst SFE extraction conditions identified in our experimental domain.

| SFE experimental conditions | | Experimental carotenoids yields in µg / g of fruit powder [a] and their associated % [b] | | | | four carotenoids |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | lutein | zeaxanthin | β-cryptoxanthin | β-carotene | |
| **Best** SFE conditions for **xanthophylls** | 300 bars<br>60 °C<br>3 mL/min<br>25 % EtOH (w/w)<br>30 min | 15.46 ± 0.56<br>(20.23 %) | 16.81 ± 1.74<br>(22.09 %) | 33.23± 2.91<br>(43.68 %) | 10.56 ± 0.62<br>(13.88 %) | **76.07± 3.49**<br>**(100 %)** |
| **Best** SFE conditions for **β-carotene** | 100 bars<br>40 °C<br>1 mL/min<br>25 % EtOH (w/w)<br>30 min | 8.72 ± 0.25<br>(16.78 %) | 11.16 ± 0.26<br>(21.48 %) | 20.95 ± 0.97<br>(40.32 %) | 11.19 ± 0.47<br>(21 %) | **51.95 ± 1.13**<br>**(100 %)** |
| **Worst** SFE conditions for **xanthophylls** and **β-carotene**[c] | 100 bars<br>60°C<br>3 mL/min<br>5 % EtOH (w/w)<br>30 min | 5.01 ± 0.01<br>(22.61 %) | 4.36 ± 0.00<br>(19.68 %) | 6.42 ± 0.15<br>(28.98 %) | 6.36 ± 0.24<br>(28.71 %) | **22.15 ±0.28**<br>**(100 %)** |

[a] with standard deviation based on n = 2 extractions.

[b] % of the sum of the 4 quantified carotenoids (µg) per g of fruit powder.

[c] the set of factors levels corresponding to the worst SFE conditions was found to be the same for xanthophylls and β-carotene.

It is interesting to note that decreasing the temperature to 40°C while increasing time to 110 min led to slightly lower or equivalent extraction yields of 14.77 ± 0.48, 16.87 ± 0.11 and 29.38 ± 0.10 µg/g of persimmon powder for lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin, respectively (**data not shown, see Annex II).** We see here that this is not with the highest density of $CO_2$, 0.927 g/mL at 300 bars and 40°C *vs* 0.830 g/mL at 300 bars and 60°C, that the best extraction is achieved, even with a longer extraction time and therefore a higher amount of ethanol used as co-solvent. This observation may be due to a higher vapor pressure of xanthophylls at 60°C, which counterbalances the decay in $CO_2$ density as compared to extraction at 40°C, with an overall positive effect on xanthophylls solubility in $CO_2$ at 60°C. This is a clear example showing that density is not the only one element on which attention should be paid to increase solutes solubility when working on SFE. **Table 2** also shows that the worst experimental conditions for the extraction of lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin were found to be the same: 100 bars, 60°C, 30

min, 5% ethanol (w/w) and 3 mL/min $CO_2$ flow. In these conditions, extraction yields of 5.01 ± 0.01, 4.36 ± 0.00 and 6.42 ± 0.15 µg/g of persimmon powder were observed for lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin, respectively. These low extraction values could be expected since in these conditions, the $CO_2$ density is only 0.291 g/mL and the solvent power of the mixture ethanol-$CO_2$ is therefore much lower too. It is interesting to note that, this time, decreasing the temperature to 40°C while increasing time to 110 min led to significantly higher extraction yields of 7.52 ± 0.08, 8.88 ± 0.07 and 15.44 ± 0.25 µg/g of persimmon powder for lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin, respectively (**data not shown, see Annex II**). Once more, at such low pressure of 100 bar, a decay in temperature significantly increases the $CO_2$ density (it becomes 0.558 g/mL) and, in turn, its solvent power together with the amount of ethanol used. In this case, this is the $CO_2$ density which prevails on xanthophylls vapor pressure to favor their extraction.

As discussed later in the part on the modeling of SFE extraction **(Figure 4),** extraction time of 110 min did not lead to significantly better yields in xanthophylls as compared to what is observed with 30 min extraction time. This means that xanthophylls extraction is already completed or almost completed at 30 min of extraction time. Therefore, it seems useless to waste $CO_2$ and ethanol with longer extraction times. After 30 min of SFE in the best conditions for xanthophylls extraction, a consumption of 30 min* 3 mL/min*0.830=74.7 g $CO_2$ is already achieved, which comes down to 149 kg $CO_2$ per kg of sample. Such $CO_2$ consumption, although being quite high, is in accordance with the summary of $CO_2$ consumptions in SFE applied to fruits and vegetables matrices performed by De Melo, Silvestre, & Silva, (2014). $CO_2$ recycling can be used in pilot-scale or industrial-scale installations.

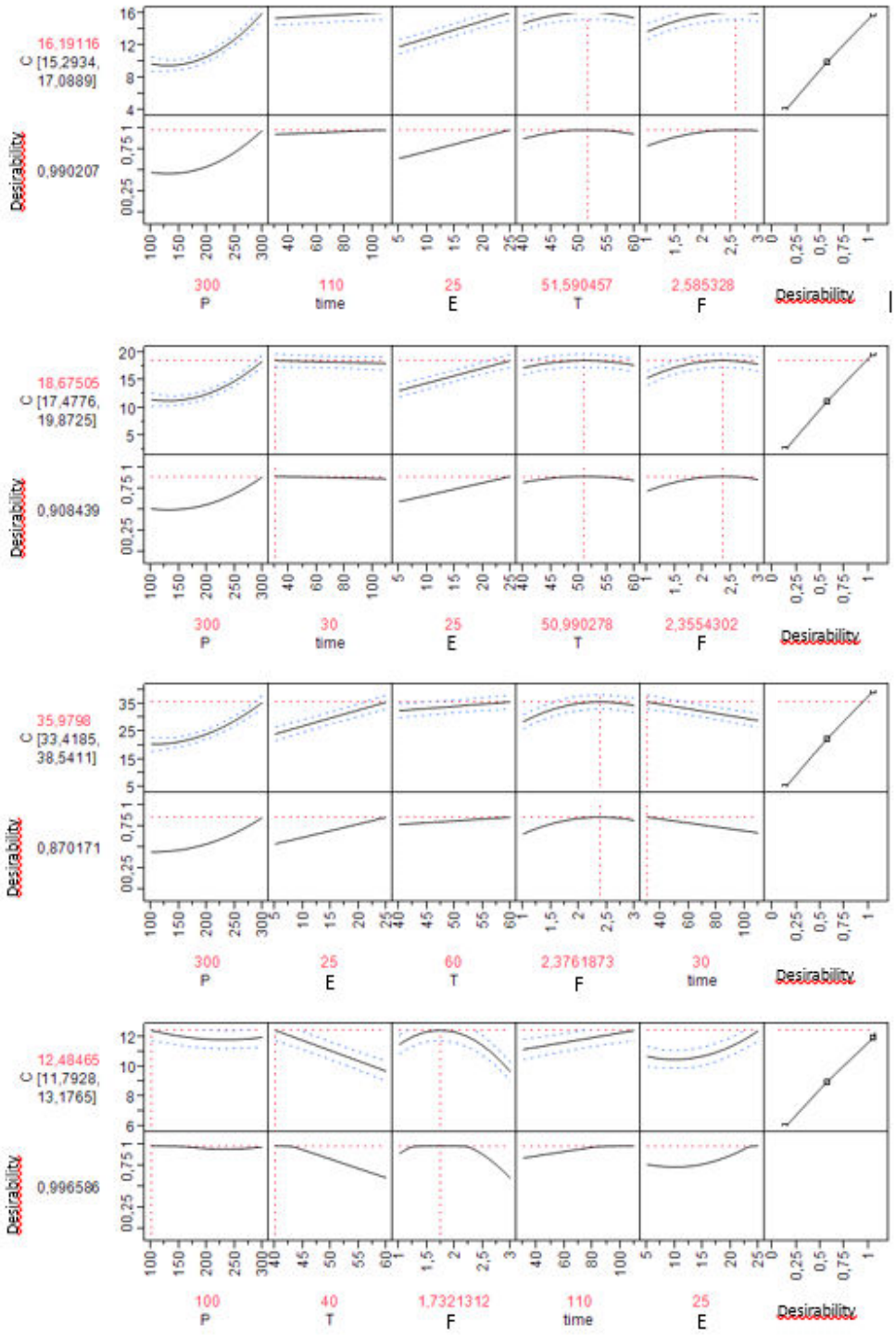



**Figure 4:** Prevision profiler's outputs of JMP10 software after maximization of the desirability function for extraction yields, C, in µg/g of fruit powder: Optimum extraction conditions are given while curves show how factors level changes affect the extraction yield. Lutein (a), zeaxanthin (b), β-cryptoxanthin (c), β-carotene (d).

Finally, it was somewhat surprising to observe that a $CO_2$ flow of 3 mL/min instead of a $CO_2$ flow of 1 mL/min was part of the worst experimental extraction conditions (100 bars, 60°C, 30 min, 5% ethanol (w/w) and 3 mL/min $CO_2$ flow). To explain this counter-intuitive observation, we hypothesize that the residence time of $CO_2$ in the extractor is too low with such extraction conditions thus limiting the available time for solutes to solubilize into the mixture $CO_2$-ethanol. Our DoE did not contain an experiment with 100 bars, 60°C, 30 min, 5% ethanol (w/w) and 1 mL/min $CO_2$ flow. So we could not check this hypothesis experimentally. However and for example, when applying 1 mL/min in the prediction profiler of our DoE in JMP10 (**Figure 4**), a predicted extraction yield of 7.40 ± 0.83 µg lutein/g of persimmon powder was obtained. This predicted yield is significantly higher as compared to the yield of 5.01 ± 0.01 µg lutein/g of persimmon powder experimentally observed (see **Table 2**) when using 3 mL/min $CO_2$ flow. This tends to show that, in some conditions, increasing the $CO_2$ flow does not systematically increase the extractions yields and that the residence time of $CO_2$ in the extractor must also be considered, especially when using low density $CO_2$.

*3.3.2. β-carotene extraction*

As can be seen in **Table 2**, the experimental SFE conditions leading to the best β-carotene extraction yield of 11.19 ± 0.47 µg/g of persimmon powder were 100 bars, 40 °C, 30 min, 25 % EtOH and 1 mL/min $CO_2$ . However, this yield is not significantly different from the one (10.56 ± 0.62 µg/g) achieved with the best experimental SFE conditions observed for xanthophylls (300 bars, 60 °C, 30 min, 25 % Ethanol (w/w) and 3 mL/min $CO_2$).**Table 2** clearly shows that a good extraction yield of β-carotene can be achieved with moderate $CO_2$ density (d=0.558 g/mL at 100 bars-40°C) and $CO_2$ flow (1 mL/min) ensuring a sufficient contact time between $CO_2$ ethanol and the solutes to be extracted. Although β-carotene is a nonpolar molecule, its high molecular weight implies the use of high mass % of ethanol as co-solvent (25 %). Once more, extraction time of 30 min only was enough to achieve the best experimental β-carotene extraction yield. In accordance with our observations on xanthophylls extraction, this means that β-carotene extraction can be completed before or at 30 min extraction time, in appropriate conditions. Taking a look to the worst SFE conditions for β-carotene extraction, which were found to be the same as for xanthophylls (100 bars, 60°C, 30 min, 5 % ethanol (w/w) and 3 mL/min $CO_2$ flow), we can observe that an increase from 40°C (best conditions) to 60°C (worst conditions), together with a $CO_2$ flow increase and decrease of the ethanol %, has a negative effect on the β-carotene extraction yield, which falls from 11.19 ± 0.47 to 6.36 ± 0.47 µg /g of persimmon powder. Next to the smaller amount of ethanol used, this observation is also likely to be due to (i) a strong decay of the $CO_2$ density (d=0.291 g/mL at 100 bars-

60°C) not counter-balanced by the β-carotene vapor-pressure increase and (ii) to a moderate $CO_2$ flow of 2 mL/min. According to **Table 2** it however appears that, passing from the best to the worst experimental condition tested, β-carotene extraction is less affected in relative value as compared to xanthophylls. Indeed, β-carotene extraction yield is less than two times decreased whereas lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin extraction yields are about three times, four times and five times reduced, respectively.

*3.3.3. SFE Extraction modeling*

*3.3.3.1 Xanthophylls SFE extraction modeling*

As can be seen in **Table 3** and data in supplementary materials, the use of a second order linear model with only two-factors interactions (equation 1) was shown to provide satisfying predictions, of the experimentally observed carotenoids yields. Only terms with factors and two-factor interactions showing *p*-value below 0.05 were kept. $R^2$ values of 0.90, 0.91, 0.88, 0.89 and 0.89 were hence observed with lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene and the sum of the latter, respectively. Average extraction yields over the 56 extractions were found to be 9.46 ± 2.41, 11.08 ± 2.81 , 19.36 ± 5.42, 8.89 ± 1.26 and 48.82 ± 11.46 µg/g of persimmon powder with lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene and the sum of the latter, respectively. These results are quite in accordance with Zhou, Zhao, Sheng, Tao, & Yang, (2011) who used organic solvent extraction at atmospheric pressure, and Zaghdoudi et al, (2015), who used pressurized organic solvent extraction, also called accelerated solvent extraction (ASE). Both authors observed that all-*trans*-β-cryptoxanthin was the most abundant of the four carotenoids in persimmon (*Diospyros kaki*), followed by zeaxanthin. However, and as observed with accelerated solvent extraction, the SFE extraction gives much better extraction results for lutein as compared to what was observed by Zhou , Zhao, Sheng, Tao, & Yang, (2011) with extraction at atmospheric pressure (9.46 ± 2.41 µg/g in this study versus 0.69 ± 0.64 µg/g in Zhou and others study).

Next to the quantitative aspects and quality of the predictive model for the four carotenoids and their sum, it can be seen from **Table 3** and **Figure 4** that, whatever the studied carotenoids, pressure, P, and % ethanol, E, are the most significant factors affecting extraction (strong coefficient with associated *p*-value < 0.0001). Time comes in third position, while Temperature (T), and $CO_2$ flow (F), do not appear as significant factors, excepted for β-carotene. The extraction models of the three xanthophylls are, except for few minor interactions, quite similar in terms of trends and, as seen previously in **Table 3**, the best experimental SFE conditions for their extraction are the same (P= 300 bars, T=60°C, time= 30 min,

E=25%, F=3 mL/min) and are close to the ones (based on the model) suggested by the outputs of the prevision profiler of JMP10 software presented in **Figure 4**.

**Table 3.** Model parameters coefficients (and their associated *p*-values between brackets) for the prediction of the SFE extraction yields of carotenoids from persimmon. Coefficients have to be used with coded levels for each factor (for instance 100 bars is equivalent to -1, etc…).

| Model parameters | Parameters coefficients and their associated p-value | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **lutein** | **zeaxanthin** | **β-cryptoxanthin** | **β-carotene** | **4 carotenoids** |
| **P (bar)** | 2.1202 (< 0.0001) | 2.3123 (< 0.0001) | 4.1043 (< 0.0001) | 0.4723 (< 0.0001) | 9.0092 (<0.0001) |
| **E (%)** | 1.1482 (< 0.0001) | 1.5522 (< 0.0001) | 3.1322 (<0.0001) | 0.7031 (< 0.0001) | 6.5357 (< 0.0001) |
| **time (min)** | 0.3581 (0.0140) | 0.5482 (0.0019) | NS | 0.2528 (0.0053) | 1.7972 (0.0171) |
| **T (°C)** | NS | NS | NS | -0.4221 (<0.0001) | NS |
| **F (mL/min)** | NS | NS | NS | -0.1825 (0.0397) | NS |
| **P*P** | 2.2788 (< 0.0001) | 2.5277 (< 0.0001) | 3.9110 (<0.0001) | 0.3551 (0.1145)* | 9.7094 (< 0.0001) |
| **P*E** | 0.6807 (< 0.0001) | 0.5416 (0.0036) | 0.9344 (0.0181) | NS | 2.2593 (0.0053) |
| **P*F** | 0.5980 (0.0002) | 0.7222 (0.0002) | 1.5491 (0.0002) | 0.3591 (0.0003) | 3.2285 (0.0001) |
| **T*F** | NS | -0.4619 (0.0117) | -0.7666 (0.0499) | NS | -1.5802 (0.0457) |
| **F*E** | 0.5158 (0.0012) | 0.5425 (0.0035) | 1.1592 (0.0039) | NS | 2.3372 (0.0040) |
| **T*T** | -1.0244 (0.0073) | -1.0921 (0.0150) | NS | NS | -3.2855 (0.0884)* |
| **time*E** | NS | -0.4306 (0.0182) | -1.3052 (0.0014) | -0.1748 (0.0576)* | NS |
| **F*F** | -0.9515 (0.0168) | -1.7150 (0.0005) | -3.7862 (<0.0001) | -1.7700 (<0.0001) | -7.3162 (0.0006) |
| **P*time** | NS | -0.3858 (0.0333)* | -0.9676 (0.0146) | -0.2248 (0.0161) | -1.7754 (0.0257) |
| **F*time** | NS | NS | -0.9068 (0.0215) | -0.4066 (<0.0001) | -1.7658 (0.0264) |
| **P*T** | 0.3258 (0.0334) | 0.3805 (0.0356) | 1.0996 (0.0060) | 0.3832 (0.0001) | NS |
| **T*time** | NS | NS | -0.7780 (0.0467) | (-0.2292) (0.0143) | -1.4961 (0.0578) |
| **T (°C)** | NS | NS | NS | -0.4221 (<0.0001) | NS |
| **T*E** | NS | NS | NS | -0.3489 (0.0004) | NS |
| **E*E** | NS | NS | NS | 0.8536 (0.0004) | NS |
| **$R^2$** | **0.90** | **0.91** | **0.88** | **0.89** | **0.89** |

NS: Non significant parameters (coefficient *p*-value < 0.05).

*: these parameters were kept because their coefficient *p*-value was only slightly higher than 0.05, with non-negligible improvement of the absolute yields in carotenoids.

For instance, for lutein, the best extraction conditions identified through our design of experiment and in our experimental domain are P=300 bars, T=51.6 °C, time=110 min, E=25% and F=2.6 mL / min, leading to a predicted extraction yield, of 16.19 ± 0.90 µg of lutein per g of persimmon powder. But since time only slightly affects the extraction yields between 30 and 110 min, it appears much more appropriate to fix it at 30 min. Doing so, a predicted extraction yield of 15.47 ± 0.89 µg of lutein per g of persimmon powder is obtained, which is not significantly different from what is predicted using 110 min instead of 30 min extraction time (**Figure 5)** and also not so different from the 15.46 ± 0.56 µg lutein per g of persimmon powder effectively observed in the best experimental conditions mentioned in **Table 2.** This also confirms that (i) the lutein extraction is completed before 30 min of extraction and (ii) that it is therefore possible, by using 30 min or less as extraction time instead of 110 min, to also significantly decrease $CO_2$ and ethanol consumption. According to the prediction profiler, using (P=300 bars, T=51 °C, time=30 min, E=25%, F=2.4 mL/min) would lead to 18.67 ± 1.19 µg of zeaxanthin per g of persimmon powder, which is not significantly different from the experimentally observed 16.81 ± 1.19 µg of zeaxanthin per g of persimmon powder effectively observed in our best experimental conditions. In the same way, using (P=300 bars, T=60°C, time=30 min, E=25%, F=2.4 mL/min) would lead to 35.98 ± 2.55 µg of β-cryptoxanthin per g of persimmon powder, which is not significantly different from the experimentally observed 33.23 ± 2.91 µg of β-cryptoxanthin per g of persimmon powder effectively observed in the best experimental conditions.

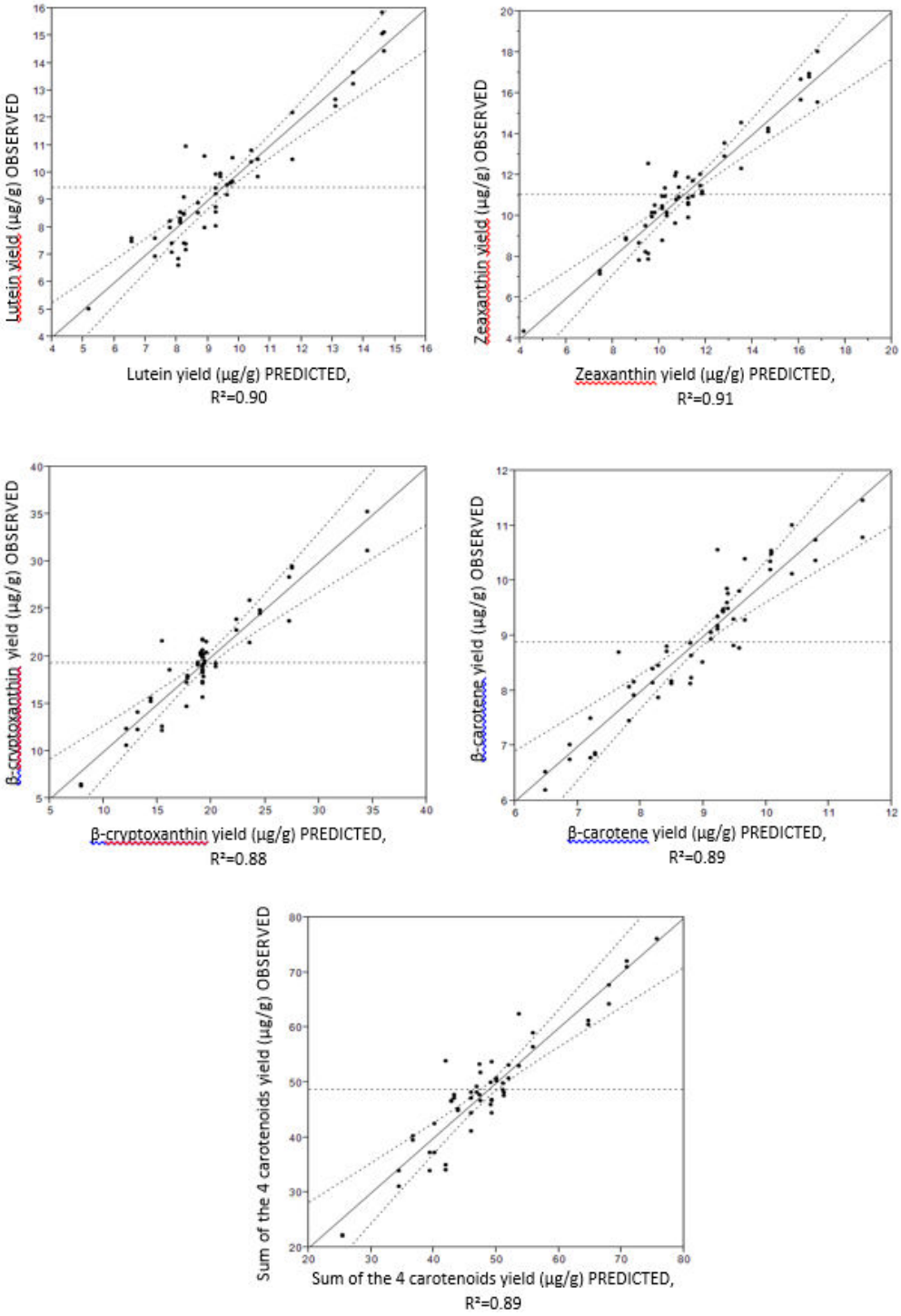



**Figure 5:** Extracted vs predicted extraction yields of carotenoids (in µg/g fruit powder) for the four individual carotenoids and their sum. Dotted lines represent the average extraction yields over 56 extractions. Lutein (a), zeaxanthin (b), β-cryptoxanthin (c), β-carotene (d), sum of the four carotenoids (e).

*3.3.3.2 β-carotene SFE extraction modeling.*

As seen in **Table 3**, the model equation describing β-carotene SFE extraction yields is different as compared to what was observed with xanthophylls. β-carotene extraction is affected by the five factors of the model, especially ethanol, temperature and pressure. When looking at JMP10 prediction profiler's outputs on **Figure 4**, one clearly visualizes that, after maximization of the desirability function (which corresponds to a maximization of the predicted extraction yield based on coefficients from **Table 2** in our experimental domain), the prediction profiles are quite similar for xanthophylls extraction and these profiles are strongly different from the one of β-carotene extraction, showing the importance of the lack of polar groups in β-carotene as compared to xanthophylls. According to this prediction profiler, the best predicted extraction conditions for β-carotene are P=100 bars, T=40°C, time=110 min, E=25 % and F=1.73 mL/min. In these conditions, a predicted extraction yield of 12.48 ± 0.47µg of β-carotene per g of persimmon powder is observed, which is only very slightly better than the best β-carotene extraction yield of 11.19 ± 0.69 µg/g, which was experimentally observed in almost similar and more economical conditions: 100 bars, 40°C, 30 min, 25% ethanol and 1 mL/min $CO_2$ flow.

Since, for xanthophylls as well as for β-carotene, no significant differences were found between the best extraction yields experimentally observed (and the corresponding extraction conditions) and the best extraction yields predicted by the models (and their corresponding extraction condition), it appeared useless to perform validation experiments in the best predicted conditions. One can finally note that the best extractions yields experimentally observed or predicted are often requiring extreme levels for the factors of our DoE, which means that the optimum conditions leading to maximized extraction yields are somewhere outside of our experimental domain. For instance and besides other factors, it is obvious that it would have been interesting to use pressure above 300 bars and temperature above 60 °C in order to find the real technical (not economical) optimum conditions instead of the best conditions in our experimental domain. We could not do so due to materials limitations and related safety aspects.

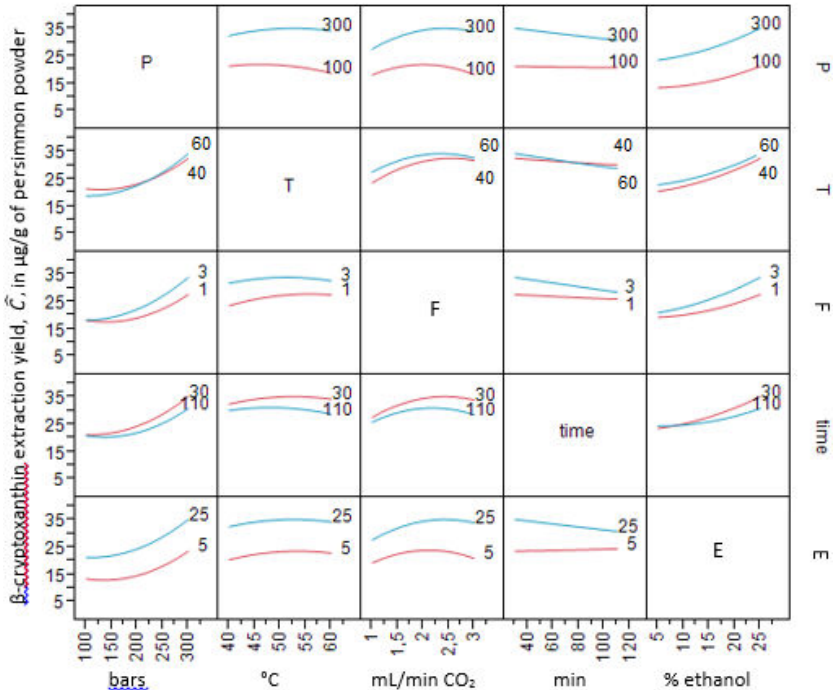
*3.3.4. Factors interaction in our experimental domain*

Factors interactions are often not really discussed in most of articles on SFE extraction. **Figure 6** shows the interaction matrices generated with JMP10 for β-cryptoxanthin and β-carotene. For xanthophylls, only interactions related to β-cryptoxanthin extraction are discussed below because the three xanthophylls extractions are very close in terms of modeling (key factors, factors interactions and factors levels). When two interaction curves are parallel this means that there is no significant interaction between corresponding factors. The main observations below, besides other observations, are made in our experimental domain only.

*3.3.4.1 Trends in factors interactions related to β-cryptoxanthin extraction.*

Many observations can be made from **Figure 6a**. Whatever the temperature, the yield strongly increases when pressure increases. At 300 bars, the best yield is achieved at 60°C, while at 100 bars the yield is higher at 40°C. The intercept between both curves at about 250 bars means that, above this pressure, the decay in $CO_2$ density (and therefore solvent power) when working at 60°C instead of 40°C, is counterbalanced by the increase in β-cryptoxanthin vapor pressure, thus leading to a better solubility of β-cryptoxanthin in a $CO_2$ that is however less dense at 60°C (0.832 g/mL at 300 bars) than at 40°C (0.929 g/mL at 300 bars). In a more general standpoint, for any other factor, much better yields are always observed at 300 bars than at 100 bars. For a given $CO_2$ flow, better yields are always observed when pressure increases. When pressure rises from 100 to 300 bars, the use of 3 mL/min $CO_2$ flow gives a much better yield than 1 mL/min. Whatever the other factors, there is no positive effect of a rise of extraction time from 30 min to 110 min on the yield, meaning that 30 min extraction time is enough to complete the extraction. Better yields are always observed with 25% ethanol. There is never a positive effect of a rise in extraction time from 30 min to 110 min on the yield, meaning that 30 min extraction time is enough to complete the extraction. Whatever the other factor, better yields are observed at 3 mL/min $CO_2$ flow.

**(a)**




**(b)**

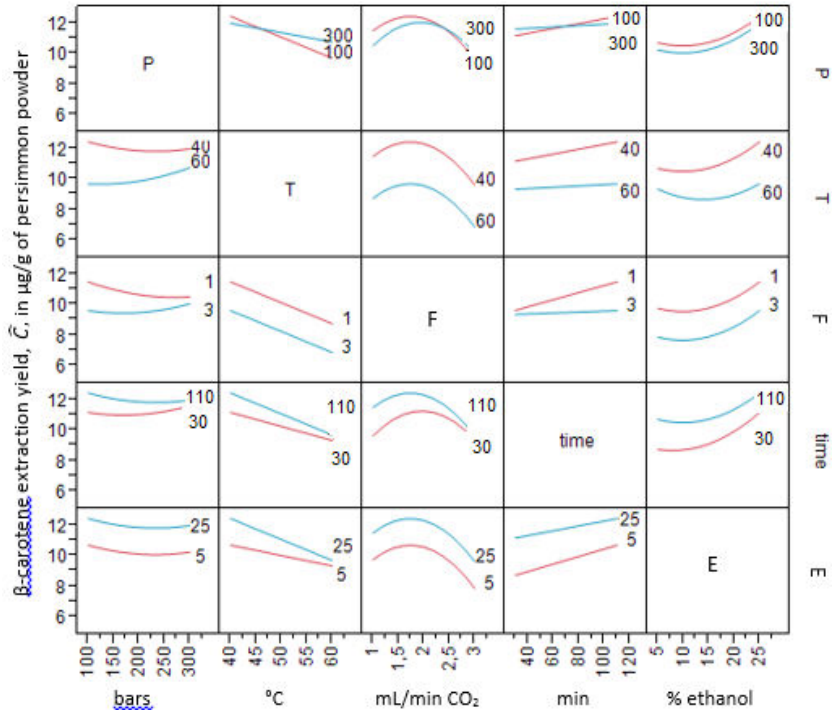



**Figure 6:** JMP10 interactions profiler's output matrix for β-cryptoxanthin (a) and β-carotene (b) SFE extraction (P, Pressure; T, Temperature; F, Flow; time; E, Ethanol %).

*3.3.4.2 Trends in factors interactions related to β-carotene extraction.*

According to **Figure 6b**, whatever the other factor, the yield is always better at 40°C (high density $CO_2$) than at 60°C. The difference between yields at 40°C and 60°C, at 1 mL/min and 3 mL/min, at 110 min and 30 min extraction time, decreases when pressure increases. Whatever the pressure, high $CO_2$ flow rate of 3 mL/min is never the good choice and1 mL/min is preferable. Whatever the pressure between 100 and 300 bars, 110 min extraction time provides slightly but not significantly better extraction yields than 30 min extraction time. Whatever the other factor, 25% ethanol (w/w) gives significantly and logically better extraction yields. Not surprisingly, because of changes in density, the yield decreases more at 100 bars than at 300 bars, when the temperature increases. At 60°C, the $CO_2$ density is still of 0.832 g/mL at 300 bars while it is only 0.293 g/mL at 100 bars. In any case, 100 bar and 40°C appears as a good choice for β-carotene SFE extraction because in these conditions, the $CO_2$ density (0.565 g/mL) is much lower than the one of $CO_2$ at 300 bars and 40°C (0.929 g/mL) for equivalent extraction yields. So using low pressure (100 bars) $CO_2$ at 40°C is technically and economically preferable (lower energy consumption for the pumps and $CO_2$ saving).

*3.4 Comparison of SFE extraction yields with Soxhlet extraction yields*

Data shows the relative extraction yields achieved in the best SFE extraction conditions identified in our experimental plan for xanthophylls and for β-carotene are not shown **(Figure 7)** In this case the yields achieved with the Soxhlet extractions were taken as a 100 % reference. Under the best SFE conditions identified for xanthophylls extraction (300 bars, 60°C, 3 mL/min, 25 % ethanol (w/w), 30 min), relative extraction yields of 128 %, 124 %, 153 %, 121 % and 135 % were observed with lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene and their sum, respectively. When using the best SFE conditions for β-carotene extraction (100 bars, 40°C, 2 mL/min, 25% ethanol (w/w), 30 min), significant decay in relative yields were observed for xanthophylls relative yields, which felt in the range [70-90%], while β-carotene reached a relative yield of 126 %. These good relative yields show the efficiency of the SFE extraction since they were achieved in one step extraction with environmentally friendly solvents ($CO_2$ and ethanol), after only 30 min extraction time instead of 6 hours with the Soxhlet method. SFE extraction also required 33 mL ethanol for the xanthophylls extraction and 15 mL for the β-carotene in their respective best extraction conditions, which is preferable as compared to the 250 mL of methanol: THF 1:1 (v/v) mixture used for each Soxhlet extraction.

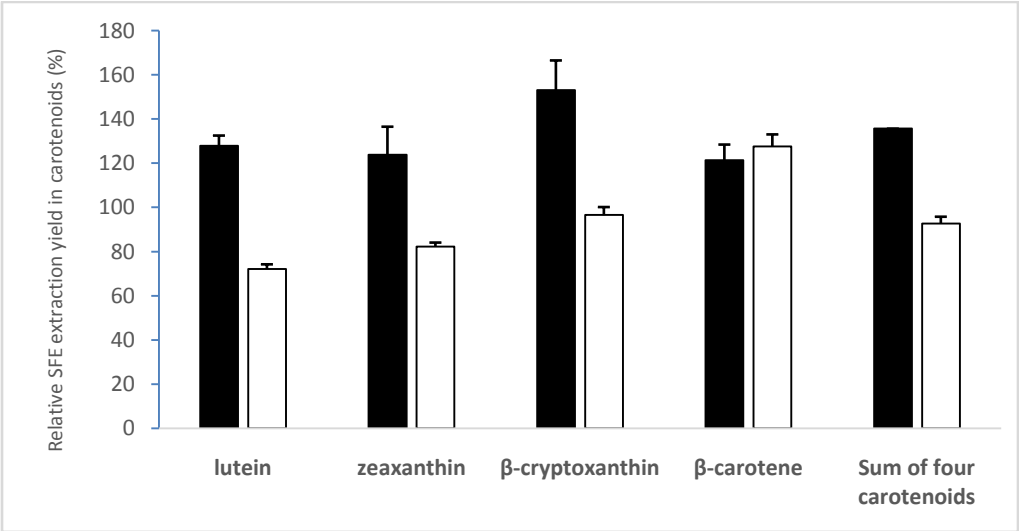



**Figure 7:** Best relative SFE extraction yields expressed in % for xanthophylls (black bars) and all-trans-β-carotene (white bars).Soxhlet extraction was used as the reference method (n=2) and the relative extraction yields was expressed in % as [(yield in µg/g of fruit powder achieved with SFE extraction)/(yield in µg/g of fruit powder achieved with the Soxhlet reference extraction)]*100

## 4. Conclusion

With help of a response surface methodology and based on the use of a small scale SFE installation with accurate control of process factors, we could investigate the effect of 5 key factors (pressure, temperature, $CO_2$ flow, co-solvent mass %, extraction time) on the extraction yield of carotenoids from persimmon as well as their interactions in the experimental domain 100-300 bars , 40-60°C, 1-3 mL/min $CO_2$ flow, 5-25 % (w/w) ethanol, and 30-110 min extraction time. Next to the identification of the best extraction conditions in our experimental domain, the DoE revealed that the SFE extractions of xanthophylls such as β-cryptoxanthin and of carotenes such as β-carotene require quite different factors levels in pressure and temperature, with different consequences in terms of $CO_2$ density (solvent power) and likely carotenoids vapour pressure, but also in terms of $CO_2$ flow. β-cryptoxanthin was better extracted at 300 bars, 60°C, 3 mL/min $CO_2$, 25 % ethanol and 30 min (high $CO_2$ density at high temperature with high $CO_2$ flow). β-carotene was better extracted at 100 bars, 40°C, 1 mL/min $CO_2$, 25 % ethanol and 30 min (moderate $CO_2$ density at low temperature with low $CO_2$ flow). In the best extraction conditions of our experimental domain, carotenoids extraction from our 0.5 g fruit powder was already completed after 30 min with better yields than the ones observed with the reference Soxhlet method. Such information obtained with a small scale installation may be helpful for the design of large scale carotenoids SFE extraction processes.

564 **5. Acknowledgements**

565 This study was supported by the Lorraine Region (France) and the ICEEL CARNOT Institute, Nancy,
566 France. The PhD thesis of Khalil Zaghdoudi was granted by the Tunisian Ministry of Higher Education.

567

568 **6. References**

569 Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of
570 carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, *56*, 49-73.

571 Anunciato, T.P., & Da Rocha Filho, P.A. (2011). Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics,
572 nutraceuticals and cosmeceuticals. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11, 51-54.

573 Arvayo-Enriquez, H., Mondaca-Fernande, I., Gortarez-Moroyoqui, P., Lopez-Cervantes, J., & Rodriguez
574 Ramirez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Method*, *5*(12), 2916-
575 2924.

576 Breithaupt, D.E. (2004). Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring
577 additives: applicabilty of accelerated solvent extraction. *Food Chemistry*, *86*(3), 449-456.

578 Cadoni, E., De Giorgi, M.R., Medda, E., & Poma, G. (2000). Supercritical $CO_2$ extraction of lycopene and β-
579 carotene from ripe tomatoes. *Dyes and Pigments*, 44. 27-32.

580 Darr, D., and Fridovich, I. (1994). Free radicals in cutaneous biology. *Journal of Investigative*
581 *Dermatology,* 102(5). 671-675.

582 De Melo M.M.R., Silvestre A.J.D., & Silva C.M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices:
583 Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *Journal of Supercritical*
584 *Fluids*, 92.115-176.

585 Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galan, M., Garrido-Fernandez, J., Pérez-Galvez, A., &
586 Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient
587 biological activities. *Food Research International*, *46*, 438-450.

Guedes, A. C., Gião, M. S., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Pintado, M. E., Duarte, C. M. M., Malcata, F. X. (2013). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *Journal of Food Engineering*, *116*(2), 478–482.

Hart, D. J., Scott, K. J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, *54*, 101-111

Heinonen, M. I, Ollilainen, V., Linkola, E. K., Varo, P. T., Koivistoinen, P. E. (1989). Carotenoids in Finnish foods: vegetables, fruits, and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 655-659.

Huang W, Li ZS, Niu H, Li D, Zhang J. 2008. Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *Journal of Food Engineering,* 89(3):298-302..

Hubaux, A. & Vos, G. (1970). Decision and detection limits for calibration curves. *Analytical Chemistry*, *42*, 849-855.

Scott, K. .J., Finglas, P. M., Seale, R., Hart, D. J., de Froidmont-Görtz, I. (1996). Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in food. *Food Chemistry*, *57*(1), 85-90

Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxydants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *70*, 102-110.

Kassama L. S., Shi J, Mittal G. S. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation and PurificationTechnolgy*, 60(3):278-284.

Maiani, G., Caston M. J., Catasta, G., Toti, E., Goni, Canbrodon, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., & Schlemm, .U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(S2), 194-218.

Mezzomo, M., Maestri, B., Dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis*and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, *85*, 1383–1391.

615 Mustafa, A., Tervino, L.M., & Turner, C. Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-
616 products. (2012). *Molecules*, 17, 1809-1818

617 Takahashi, M., Watanabe, H., Kikkawa, J., Ota, M., Watanabe, M., Sato, Y., Inomata, H., & Sato, N. (2006).
618 Carotenoids extraction from japanese persimmon (Hachiya-kaki) peels by supercritical $CO_2$ with ethanol.
619 *Analytical Sciences, 22,* 1441-1447.

620 Taylor, P. R., Dawsey, S., & Albanes D.(1990). Cancer prevention trials in China and Finland. *Annals of*
621 *Epidemiology,*1(2),195-203.

622 Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M.,
623 Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., & Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of
624 carotenoids from: Tunisian kaki (Diospyros kaki L.), peach (Prunus persica L.), and apricot (Prunus
625 armeniaca L.). *Food Chemistry*, 184, 131-139.

626 Zhou, C., Zhao, D., Sheng, Y., Tao, J. & Yang, Y. (2011). Carotenoids in fruits of different persimmon
627 cultivars. *Molecules*, *16*(1), 624-636.

628

629

# Chapitre VI : Propriétés de quenching d'$^1O_2$ des caroténoïdes

# VI Propriétés de quenching d'oxygène singulet des caroténoïdes

## VI.1 Contexte

Dans les deux chapitres précédents, nous avons mis en évidence l'intérêt de l'extraction accélérée par solvant sous pression (ASE). Trois facteurs ont été étudiés : la température (40, 60 ou 80°C), le % de méthanol dans un solvant binaire méthanol : THF (20, 60 ou 100 %), et le temps d'extraction au travers du nombre de cycles d'extractions statiques de 5 min. Ainsi nous avons utilisé le $CO_2$ supercritique en tant que solvant supercritique, en présence d'éthanol comme cosolvant afin d'extraire aussi bien les carotènes que les xanthophylles à partir des persimmon. Afin de rechercher les conditions optimales d'extraction, nous avons utilisé avec succès une approche par plan d'expériences basée sur la définition de surfaces de réponse *via* un plan central composite à faces centrées (α=1). Cinq facteurs ont été considérés : pression (P, bars), température (T, °C), débit de $CO_2$ (D, mL/min), pourcentage en cosolvant (E, % éthanol), temps d'extraction (t, min), avec trois niveaux par facteur.

Après avoir acquis une meilleur compréhension et une maîtrise de l'extraction des caroténoïdes à partir des persimmon, abricot et pêche et la comparaison de leur profils caroténoïdiques après l'optimisation de l'extraction par ASE et $CO_2$ supercritique + solvant, ces études nous ont permis de mettre en évidence l'intérêt des deux procédés d'extraction comparé à la méthode de référence (extraction par Soxhlet) pour l'extraction de caroténoïdes issue des trois fruits.

L'extraction par solvant accélérée (ASE), rarement appliquée à des matrices alimentaires dans la littérature, s'est révélée particulièrement efficace pour l'étude des profils caroténoïdiques des 3 fruits étudiés. Le modèle d'extraction optimisé à 40°C, (MeOH/THF) (20/80) (v/v) pendant 5 min en consommant des petits volumes de solvant (30 ± 1,5 mL) comparé à l'extraction conventionnelle à pression atmosphérique, nous a servi comme un support de départ pour la purification et la séparation des caroténoïdes à partir des fruits de persimmon, étant donné la grande variété et la quantité de caroténoïdes (xanthophylles mais aussi carotènes) observés dans ce fruit.

Dans le but d'étudier le potentiel des caroténoïdes extraits et purifiés à partir des fruits de persimmon, nous avons utilisé le modèle déjà obtenu au cours de l'extraction avec ASE. La purification a été effectuée pour les caroténoïdes extraits *via* de nombreux runs d'HPLC semi-préparative sur phase C30, en adaptant le gradient aux nouvelles conditions opératoires (volume d'injection = 3,5 mL et débit de phase mobile = 4 mL/min).

Afin d'évaluer le potentiel d'inhibition d'oxygène singulet des caroténoïdes extraits et purifiés, nous utilisons la porphyrine P1COOH pour la production d'oxygène singulet. Ce photosensibilisateur est synthétisé par notre équipe et présente des rendements quantique de formation d'$^1O_2$ de 0,70 dans l'éthanol et 0,87 dans le toluène. Au cours de cette étude, les spectres de fluorescence des caroténoïdes sont enregistrés ainsi que les durées de vie d'$^1O_2$ en présence de concentrations croissantes en caroténoïdes. Nous avons estimé l'efficacité de quenching à travers la constante $K_Q$ determinée à partir des courbes de Stern-Volmer.

Cette étude a fait l'objet d'un manuscrit soumis à la revue *Photochemistry and Photobiology* en octobre 2015.

# Extraction, identification and photophysical characterization of carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.)

**Khalil Zaghdoudi[1-2], Philippe Arnoux[1], Bauyrzhan Myrzakhmetov[1], Orleans Ngomo[1,3], Régis Vanderesse[4], Céline Frochot [1]*, Yann Guiavarc'h[1]**

[1] Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France

[2] Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, Tunisie

[3]Laboratoire des substances actives et pollution, ENSAI – University of Ngaoundere, Ngaoundere, Cameroun

[4] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France

*Author to whom correspondence should be addressed

☎: +33 (0)3 83 17 51 15

Fax:+33 (3)83 32 29 75

✉: celine.frochot@univ-lorraine.fr

**Short title**: "Carotenoids from Persimmon"

Submitted to Photochemistry and Photobiology in October 2015.

**Abstract**

Carotenoid pigments were extracted and purified from persimmon fruits using accelerated solvent extraction (ASE). 11 pigments were isolated and 5 of them could be identified as all-*trans*-violaxanthine, all-*trans*-lutein, all-t*rans*-zeaxanthin all-*trans*-cryptoxanthin and all-*trans*-β-carotene. Absorption and fluorescence spectra were recorded. In order to evaluate the potential of $^1O_2$ quenching of the purified carotenoids, we used a porphyrin (P1COOH) as photosensitizer to produce $^1O_2$. The rate constants of singlet oxygen quenching ($K_q$) have been determined by monitoring the near-infrared (1270 nm) luminescence of $^1O_2$ produced by photosensitizer excitation. The lifetime of singlet oxygen were measured in the presence of increasing concentrations of carotenoids using hexane as solvent. Results of the recorded $K_q$ values shows that, all-t*rans*-β-cryptoxanthin, all-t*rans*-β-carotene, all-t*rans*-lycopene and all-t*rans*-zeaxanthin quenches singlet oxygen efficiently in hexane with associated $K_q$ values of 1.6 $10^9$, 1.3 $10^9$, 1.1 $10^9$ and 1.1 $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ respectively, whereas low $K_q$ (less than $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$) were recorded for lutein, violaxanthin, 5,6-epoxy-α-carotene and the not identified xanthophyll.

**Keywords:** persimmon, carotenoids, purification, singlet oxygen, quenching, porphyrin.

## 1. Introduction

Carotenoids are one of the most widespread lipidic soluble pigments in nature; more than 750 naturally occurring carotenoids have been identified. They are produced as secondary metabolites by all photosynthetic organisms (plants, fungi, yeasts and non-photosynthetic bacteria) but there are merely accumulated from the diet in human and animals (Rodriguez-Amaya, Rodriguez, & Amaya-Farfan, 2006; Rodriguez-Concepcion, 2010). Carotenoids contribute to both organoleptic and nutritional properties of food and food by-products providing red, yellow or orange colors for fruits and vegetables. They are used as food colorants in other foods and animal products such as egg yolk, butter, crustaceans, trout, salmon and shrimp (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2009). They contribute also to the pigmentation of birds' plumage (LaFountain, Pacheco, Prum, & Frank, 2013). Generally most carotenoids can be derived from C40 tetraterpenoids polyene backbone including a system of conjugated double bonds in which the $\pi$ electrons are effectively delocalized over the entire chain; the skeleton can carry cyclic ends groups with substitution of functional groups containing oxygen (W. Stahl & Sies, 2003). Through their structure, carotenoids are classified into two main groups (i) carotenes called also carotenoids hydrocarbon containing only carbon and hydrogen (ii) xanthophylls or oxygenated carotenoids which may contain different functional groups (epoxy, methoxy, hydroxy, carbonyl and carboxyl acid groups) (Ibañez, Herrero, Mendiola, & Castro-Puyana, 2011; Rivera & Canela, 2012). The most characteristic feature of carotenoids is light absorption of the long conjugated double bonds system in the high-energy zone of the visible region (400-500 nm). Such conjugated chain structure is crucial for the functioning of carotenoids especially in photosynthetic organisms and photoprotection in all living organisms, (Fiedor & Burda, 2014). Carotenoids are involved in photosystem assembly, light harvesting providing protection from excess light absorption through the energy dissipation and radical detoxification (Namitha & Negi, 2010). Besides the role of carotenoids in photosynthesis and photoprotection, they are involved in prevention of several human diseases. Many lines of evidence support their cardioprotective role, higher levels of serum carotenoids has shown to be associated with decreased risk of NT-pro and BNP levels suggesting the prevention from cardiac overload. High level of lutein and β-cryptoxanthin in human plasma were suggested to prevent from the acute myocardial infarction (Koh, Yuan, Wang, Lee, Lee, Yu, et al., 2011; Suzuki, Ishii, Kitagawa, Kuno, Kusuhara, Ochiai, et al., 2013).

(Fuhrman, Elis, & Aviram, 1997) have shown that the antioxidant mechanism of β-carotene and lycopene is responsible both in reducing the LDL cholesterol level and in the inhibition of HMG-CoA reductase. 10 µM concentrations of β-carotene and lycopene have shown to lowers the risk of cardiovascular disease (CVD) by inhibiting the synthesis of cholesterol in microphage cell lines. Many

investigation and epidemiologic study has proven that carotenoids reduce and prevent the development of ROS-mediated disorders related to oxidative stress through their antioxidant activity, and represent a part of the antioxidant defense system in the human organism (Perera & Yen, 2007). Some prospective studies have shown a correlation between the consumption of carotenoids rich fruits and vegetables and a decreased risk of many types of cancer (Block, Patterson, & Subar, 1992; Key, 2011; Steinmetz & Potter, 1996; Temple, 1999; Temple & Gladwin, 2003; Willett, 2010). Lycopene is regarded as a potent agent against the risk of prostate cancer, through the enhancement of the oxidation stress defense system (Wertz, Siler, & Goralczyk, 2004), α, and β-carotene was reported to decrease liver tumor development (Murakoshi, Nishino, Satomi, Takayasu, Hasegawa, Tokuda, et al., 1992). Other epidemiological data suggest the anticancer properties of canthaxanthin, it was reported that canthaxanthin exerted cancer chemopreventive activities in UV-B induced mouse skin tumorigenesis and breast carcinogenesis (Grubbs, Eto, Juliana, & Whitaker, 1991; Santamaria, Bianchi, Arnaboldi, Ravetto, Bianchi, Pizzala, et al., 1988), it can also suppress human colon cancer cells proliferation (Onogi, Okuno, Matsushima-Nishiwaki, Fukutomi, Moriwaki, Muto, et al., 1998), astaxanthin exhibit inhibitory activity in relation to cancer development in urinary bladder (Kuno, Hirose, Yamada, Hata, Qiang, Asano, et al., 2006; Tanaka, Morishita, Suzui, Kojima, Okumura, & Mori, 1994), and colorectum (Tanaka, Kawamori, Ohnishi, Makita, Mori, Satoh, et al., 1995) through cell proliferation suppression.

High on the list of carotenoids functions is protection against damage mediated by light, they can act as quencher to prevent the formation of $^1O_2$, in biological systems (plants chloroplast, photosynthetic bacteria and blood serum) and in presence of sensitizers such as bacteriochlorophyll, chlorophyll or protoporphyrin IX, which absorb light and generate $^1O_2$, carotenoids can quench the triplet state energy from the sensitizer or from $^1O_2$ (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2008). Foote et al. were the first to carry out a comprehensive study of $^1O_2$ quenching mechanisms by β-carotene (Foote, Chang, & Denny, 1970a, 1970b; Foote & Denny, 1968; Foote, Denny, Weaver, Chang, & Peters, 1970). They observed two mechanisms: quenching of triplet state PS or $^1O_2$ by carotene and isomerization of *cis*-β-carotene to *trans*-β-carotene after energy transfer with oxygen.

Most of the carotenoids extraction process follows a standard path: (i) release of carotenoids pigments from their matrices, (ii) impurities removal with liquid-liquid or solid-liquid extraction (Oliver & Palou, 2000), (iii) the saponification of the extract to remove chlorophylls and lipids to release pigments in a clean form specially xanthophylls which are usually found in fatty-acid esterified form. Traditional extraction techniques using organic solvent are reported to consume a huge solvents volumes, time demanding and present low extraction yield, selectivity and reproducibility (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014; Murillo, Giuffrida, Menchaca, Dugo,

Torre, Melendez-Martinez, et al., 2013). However automated laboratory scale such as accelerated solvent extraction (ASE) remains a good alternative for carotenoids extraction since it involves the use of liquid solvents at elevated temperature and pressure which allow a liquid extraction solvent form above its boiling point (Mendiola, Herrero, Cifuentes, & Ibanez, 2007; Mustafa & Turner, 2011). Other problems associated with carotenoids analysis is the unavailability of standard compounds with high purified form, due to their instability as well as the presence of the cis isomers in such compounds, (Oliver & Palou, 2000). Extensive research detailing extractions steps from plant tissues and analytical methods to assay carotenoids in food matrices are well reviewed (Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014; Arvayo-Enriquez, Mondaca-Fernandez, Gortarez-Moroyoqui, Lopez-Cervantes, & Rodriguez-Ramirez, 2013; Kimura & Rodriguez-Amaya, 2002; Mustafa & Turner, 2011).

One particular application of these carotenes for $^1O_2$ quenching is their use in the construction of Photo Molecular Beacons (PMB). PMB are molecular structures characterized by a change in the photophysical properties after activation by a biological target. They are composed of an energy acceptor and an energy donor, connected by a link (usually a peptide) sensitive to an endogenous stimulus. In the initial state, the acceptor and the donor are maintained sufficiently close to allow a transfer of energy and thus prevent the photophysical properties of the donor to be expressed. In the field of photodynamic therapy (PDT), this concept has been developed by the Zheng's team to increase the selectivity of the treatment (Zheng, Chen, Stefflova, Jarvi, Li, & Wilson, 2007). Indeed, they coupled a pyropheophorbide-a as a donor to a carotenoid as an acceptor *via* a peptide selectively cleaved by caspase-3. GDEVDGSGK was chosen as the peptide sequence. In proximity of the PS, the carotenoid quenches $^1O_2$ generation through PS triplet-state energy transfer and/or $^1O_2$ scavenging. In presence of caspase-3, a cleavage of the peptide was observed and the pyropheophorbide's photophysical properties restored (Chen, Stefflova, Niedre, Wilson, Chance, Glickson, et al., 2004). Since then, different PMB have been designed using pyropheophorbide-a and Black Hole Quencher 3 (BHQ3) as donor/acceptor pair, targeting different substrates (Chen, Jarvi, Lo, Stefflova, Wilson, & Zheng, 2007; Chen, Liu, Lo, Wilson, & Zheng, 2009; Lo, Chen, Stefflova, Warren, Navab, Bandarchi, et al., 2009; Lovell, Chen, Huynh, Jarvi, Wilson, & Zheng, 2010; Lovell, Chen, Jarvi, Cao, Allen, Liu, et al., 2009). Our team also developed a PMB triggering Matrix Metalloproteinases-2 and -9 (Verhille, Benachour, Ibrahim, Achard, Arnoux, Barberi-Heyob, et al., 2012).

The aim of the study was to try to find new carotenoids, which would have a potential application in PDT as $^1O_2$ quenchers. We extracted and purified 11 carotenoids from persimmon fruit cultivated in Tunisia and known for its richness in carotenoids pigments, using accelerated solvent extraction (Zaghdoudi, Pontvianne, Framboisier, Achard, Kudaibergenova, Ayadi-Trabelsi, et al., 2015). After purification, we could determine the structure of 5 of them and evaluated their potential as singlet

oxygen quencher in hexane.

## 2. Materials & Methods

### *2.1. Chemicals*

All-*trans*-β-carotene (Type II synthetic, purity > 95%), lutein from marigold, β-cryptoxanthin (purity > 97%), zeaxanthin (purity > 95%), lycopene from tomato (purity > 90 %), butylated hydroxy toluene (BHT, purity ≥ 99%) and triethylamine (TEA, purity ≥ 99%) were obtained from Sigma-Aldrich (Shnelldorf, Germany). HPLC organic solvents were of analytical grade: methanol (MeOH), absolute ethanol (EtOH), chloroform and hexane were from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), methyl-tert-butyl-ether (MTBE) was from Fisher Scientific (Loughborough, UK), petroleum ether (PE) was from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained from a purified water system Arium® 611UV from Sartorius (Göttingen, Germany) with a resistivity of 18.2 MΩ*cm. Sodium chloride (NaCl, purity > 99%) and potassium hydroxide (KOH, purity > 99%) were obtained from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Florisil 100-200 mesh (Sigma-Aldrich, Shnelldorf, Germany). Liquid Nitrogen was from Air Liquide (Nancy, France). The synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin (P1COOH) has been described elsewhere (Chouikrat, Champion, Vanderesse, Frochot, & Moussaron, 2015).

### *2.2. Fruit materials*

The present study focuses on persimmon fruit (*Diospyros kaki*. L) cultivated in Tunisia (persimmon known under the appellation “Krima”); 27 persimmons fruits were harvested at full maturity from three selected trees.

### *2.3. Samples preparation & characterization*

Selected fruits were immediately washed with distillated water and placed in hermetical polystyrene boxes in which we added some liquid nitrogen in order to prevent oxidation reactions, before to be stored at -20°C. 5 kg of each whole fruits (flesh and peel) were manually sliced into approximately 2 g pieces, frozen at -80°C and at once freeze-dried during 48 hours with a pilot CryoTec freeze-dryer (Saint-Gély-du-Fesc, France) with a separated cold trap at -70°C, plates temperature set to -20°C at a working pressure of 15 Pa. Freeze-dried fruits pieces were then placed in a desiccator containing $P_2O_5$ in order to prevent water sorption. After freeze-drying, fruits pieces were immediately grounded with a Moulinex coffee grinder (Ecully, France). Small amount of liquid nitrogen were added to prevent oxidation during grinding. Powders were stored in a desiccator containing $P_2O_5$ in order to prevent water sorption and their residual water content was measured after 24 h at 105°C.

Particle size distribution of fruits powders were measured through dynamic light scattering with a Malvern Mastersizer 2000 apparatus (Malvern, UK) in absolute ethanol.

### *2.4. Accelerated solvent extraction of carotenoids*

Carotenoid extraction experiments were carried out in a static mode with a Dionex ASE 350 extractor (Salt Lake City, UT, USA), using 12 stainless steel cells of 22 mL volume. 60 mL amber vials were used for extracts collection. Common extraction parameters were as follows: (i) 2 g of fruit powder was loaded into the cell and residual cell volume was partially filled with 2 mm glass beads; (ii) the cell was filled with solvent to a pressure of 1500 psi (103 bars); (iii) heat was applied for a initial heat-up time of 5 min; (iv) static extraction with all system valves closed was performed with a 5 min cycle time; (v) the cell was rinsed with 60% of the cell volume with extraction solvent; (vi) the solvent was purged from the cell with $N_2$ gaz for 60 s; and (vii) the system was depressurized. Extraction solvents, MeOH and THF were degassed for 30 min by ultrasonic bath Sonoclean® Labo Moderne (Paris, France) before use. 2 g of Florisil was added as dispersing agent for persimmon powder. Extraction parameters were set according to the common optimal conditions found in our previous study through an experimental design (Zaghdoudi, et al., 2015) as follow: temperature was set at 40°C, 5 min static time extraction (1 cycle), binary extraction solvent (MeOH/THF, 20/80, v/v) under 103 bars.

### *2.5. Preparation of ASE carotenoids extracts for HPLC semi-preparative purification*

Pressurized liquid carotenoids extracts were prepared according to the method described in (Zaghdoudi, et al., 2015) and was conducted under limited light. At first, ASE extract was homogenized with a vortex (Scientific Industries Inc., New York, U.S.A) at 13,500 rpm during 1 min before being filtered under vacuum through a AP 25 glass fiber filter disc of 2µm porosity (Millipore, Darmstadt, Germany). Then, 10 mL of the filtrate was added to 10 mL of 10 % (w/v) aqueous sodium chloride solution and carotenoids were transferred to a 10 mL petroleum ether phase containing 0.1 % BHT (w/v) using a liquid-liquid extraction repeated at least 3 times in order to achieve a total transfer of carotenoids toward the petroleum ether phase. Organic phase was subsequently washed three times with 10 mL of ultrapure water in order to remove residual NaCl traces under neutral pH. Petroleum ether was then evaporated at 30 °C under nitrogen flow using a Turbo Vap® LV (Biotage AB, Uppsala, Sweden). The residue was rapidly dissolved in 5 mL of mobile phase (MeOH/MTBE, 1/1, v/v) containing 0.1 % BHT (w/v) and filtered through 0.45 µm PVDF syringe filters (Pall Life Sciences, Ann Arbor, PN, USA). Then the filtered solution was mixed with 2.5 mL of MeOH containing 0.1% BHT (w/v) and saponified with 2.5 mL of 20 % (w/v) methanolic KOH solution under nitrogen, in the dark,

for 1 h, at room temperature. Finally the saponified sample was injected for the semi preparative assay.

### *2.6. Semi preparative HPLC reversed phase carotenoids purifications*

Carotenoids purification were performed by reverse phase chromatography on a preparative Gilson HPLC system GX-271 consisting, a GX-271 Handler injector/collector equipped with a single syringe pump 402, a 322 Semi-preparative HPLC pump and a 156 DAD detector at 450 nm from Gilson (Middelton, USA) controlled with a Trilution LCv2.1 software. We used a 250×4.6 mm ID S-5 µm YMC C30 semi preparative column coupled with a 10×4.0 mm ID S-5µm guard cartridge semi preparative column (ImChem, Versailles, France). Purification assay was performed at 25°C. Mobile phase consisted in a gradient of MeOH containing 0.05 M of ammonium acetate (A), and MTBE (B). Both solvent A and B contained 0.1% BHT (w/v) and 0.05% of triethylamine (TEA) (w/v). Flow rate was 4.0 mL/min and injected volume was 3.0 mL. The gradient profile of the mobile phase was set as follows: linear increasing gradient from 2% B to 20 % B in 60 min; linear increasing gradient from 20 % B to 95 % B in 20 min; linear gradient at 95% B in 10 min; decreasing from 95% in B to 2% in B in 5 min and linear gradient at 2 % B in 5 min. The column was equilibrated for 10 min at the starting conditions before each injection. Before each batch of HPLC semi preparative purification, stabilization time of the column was 30 min, and a blank (MeOH/MTBE, 1/1, v/v) was injected. The same pooled fraction of each carotenoids were collected and then concentrated at 30 °C under nitrogen flow using a Turbo Vap® LV (Biotage AB, Uppsala, Sweden) in amber glass vials prior to characterization.

### *2.7. Identification of unknown carotenoids*

In order to identify additional carotenoids and compare the fruits carotenoids profiles, LC-MS runs were performed in positive APCI mode with a Shimadzu LCMS-2020 mass spectrometer (Shimadzu, France). A scanning rate of 2143 u/s was used in the range 50-2000 amu. Nebulizing gaz flow was fixed to 1.5 mL/min. Interface voltage and temperature were 4.5 kV and 250°C, respectively. The gradient profile of the mobile phase was set as follows: linear increasing gradient from 5% B to 30 % B in 30 min; linear increasing gradient from 30 % B to 95 % B in 20 min; linear decreasing gradient from 95 % B to 5 % B in 10 min. The column was equilibrated for 5 min at the starting conditions before each injection.

### *2.8. Photophysical properties*

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda EZ 210) double beam UV-Visible

spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Horiba JobinYvon Fluorolog-3 (FL3-222) spectrofluorimeter equipped with a 450 W Xenon lamp, a thermostated cell compartment (25°C), a R928 (HAMAMATSU Japan) UV-visible photomultiplier and a liquid nitrogen cooled InGaAs infrared detector (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). The excitation spectrometer is a SPEX double grating monochromator (1200 grating/mm blazed 330 nm). The fluorescence was measured by the UV-Visible detector through a SPEX double grating monochromator (600 grooves /mm blazed 1 nm). Singlet oxygen lifetime measurements of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin (P1COOH) with or without carotenoid have been performed on a TEMPRO-01 spectrophotometer (Horiba JobinYvon – Palaiseau France) composed with a pulsed diode excitation source SpectraLED-415 emitting at 415 nm, cuvet compartment, a Seya-Namioka type emission monochromator (600–2000 nm) and a H10330-45 near-infrared photomultiplier tube with thermoelectric cooler (HAMAMATSU) as detection system. The system is monitored by a single photon counting controller FluoroHub-B and the software DataStation and DAS6 (Horiba JobinYvon).

Stern Volmer equation was used to evaluate the constant quenching $K_d$ of $^1O_2$ by the different carotenoids $\tau_0/\tau = 1 + K_d[Car]$ with $\tau_0$ is the $^1O_2$ lifetime after excitation of P1COOH in toluene without carotenoid, $\tau$ is the $^1O_2$ lifetime after excitation of P1COOH in hexane with carotenoid and [Car] is the concentration of carotenoid. Concentration of P1COOH was kept to 1.5 $10^{-7}$ mol/L. Carotenoids was added with a ratio of [Car]/[P1COOH] equal to 1,100,500,1000,3000,5000,10000.

## 3. Results and discussion

### *3.1. ASE carotenoids extract & Semi-preparative purification of carotenoids*

**Figure 1** shows the particle size distribution of persimmon freeze dried powder used for carotenoids extraction. All the particles present a diameter below 500 µm (>95 % of the total volume).

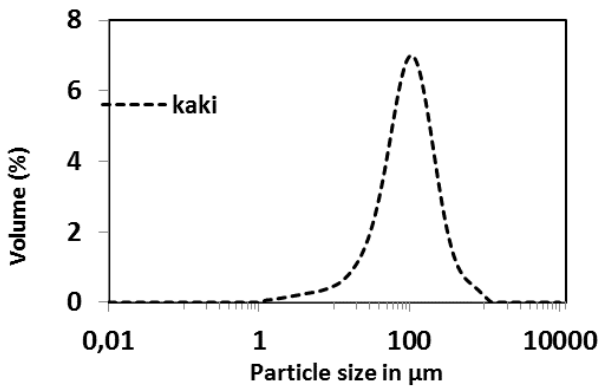



**Figure 1**: Particle size distribution of persimmon freeze dried powder

Analytical HPLC separation conditions of persimmon carotenoids are well described previously (Zaghdoudi, et al., 2015). We used the same analytical YMC C30 column 250*4.6 mm ID S-5 µm coupled with a 10*4.0 mm ID S-5 µm guard cartridge column. **Figure 2** shows the ASE carotenoids extracts chromatogram. 11 carotenoids could be detected due to their absorption at 450 nm and retention times are given in **Table 1**. Their masses were calculated and are also given in **Table 1.** Five of the 11 purified carotenoids were identified using commercial standards and LC-PDA-MS (APCI positive mode) that is to say compound 1, 2, 3, 6 and 9 as violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β-crypthoxanthin and β-carotene respectively (Zaghdoudi, et al., 2015).

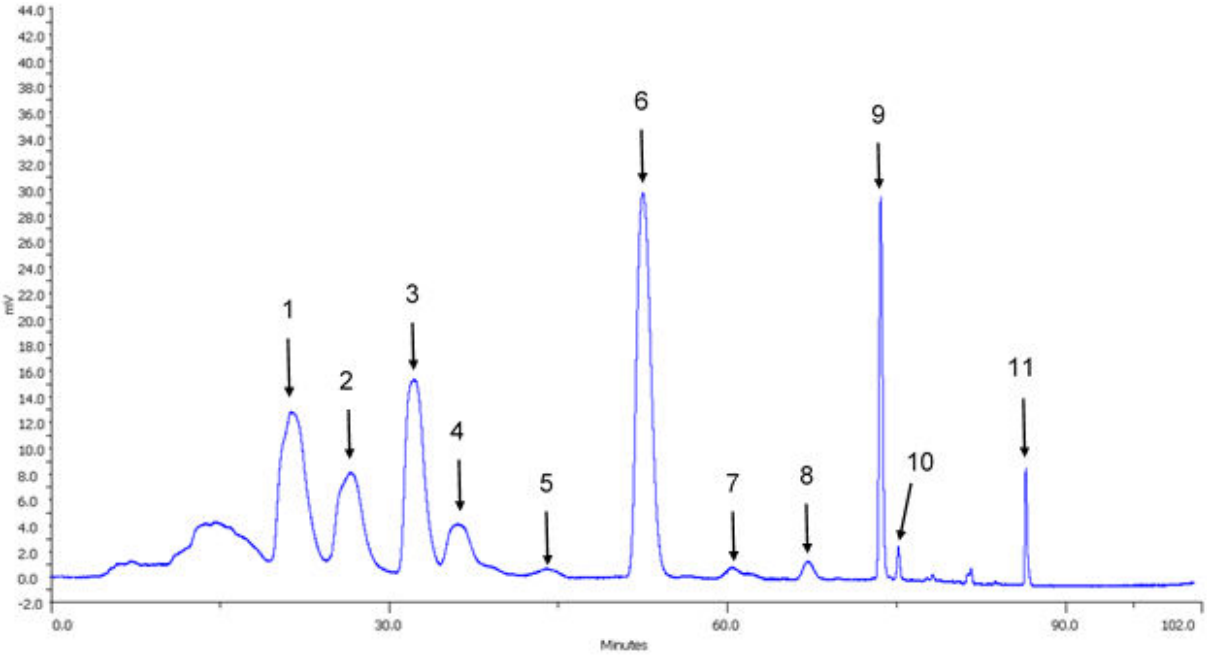



**Figure 2**: $C_{30}$ semi preparative chromatogram of carotenoids extract from persimmon

### *3.2. Identification of purified carotenoids*

Each of the 11 compounds was isolated and their absorption and fluorescence spectra were recorded.

#### 3.2.1. UV-visible and fluorescence spectrum

In **Figure 3** we collected the absorption spectra of identified compounds. The maximum of absorption bands and ratio band III/band II are gathered in **Table 1**. Due to the retention time and the analysis of the absorption spectra, it was possible to determine the nature of some compounds.

*All trans-violaxanthin (peak 1):* $[M+H]^+$ m/z, $\lambda_{max}$, absence of *cis*-peak, and short retention time are in perfect accordance with the identification of all-*trans*-violaxanthin, which contains 2 hydroxyl and 2

epoxy groups. All-*trans*-violaxanthin was already identified in persimmon. However the observed % (III/II) is of 50 instead of 98, which may be due to the origin of the petroleum ether that we used. Petroleum ether is not a well-defined molecule but a mixture of C5 and C6 hydrocarbons.

*All trans-lutein (peak 2):* $[M+H]^+$ m/z, $\lambda_{max,}$ absence of *cis*-peak, and short retention time similar to the one of the standard are in perfect accordance with the identification of all-*trans*-lutein, which contains 2 OH groups and should indeed have a slightly longer retention time as compared to violaxanthin. All-*trans*-lutein was already identified in persimmon. However the observed % (III/II) is of 25 instead of 60, which may also be due to the origin of the petroleum ether that we used.

*All trans-zeaxanthin (peak 3):* collected characteristics perfectly fit the data from literature. The retention time is also in accordance with the one of the standard.

*Not identified (peak 4):* The $[M+H]^+$ m/z of 601 indicates a xanthophyll with 4 oxygens. The fact that, despite these fours oxygens, this xanthophyll has a longer retention time than lutein and even zeaxanthin indicates that this is a *cis*-form of xanthophyll and we indeed observed a slight *cis*-peak at 330 nm and an associate % $A_B/A_{II}$ of 14 %.

*5,6-epoxy-α-carotene suspected (peak 5):* $[M+H]^+$ m/z, $\lambda_{max,}$ absence of *cis*-peak as well as % III/II suggest the presence of 5,6-epoxy-α-carotene.

*All-trans-β-cryptoxanthin (peak 6):* collected characteristics fit the data from literature. The retention time is also in accordance with that of the standard. This xanthophyll is known to be the most present carotenoid in persimmon.

*Not identified (peak 7):* $[M+H]^+$ m/z of 553 and 537 indicate a mixture of one single-oxygenated xanthophyll and of one carotene, with retention times not allowing separation with the fractions collector of the preparative chromatography equipment. A very slight increase in absorbance is observed at 330 nm, which could indicate a *cis*-form. It is not possible to say more.

*cis-isomere of β-carotene, position 13 supposed (peak 8)*: mass indicates that this is a carotene and the presence of a slight peak at 330 nm indicates a *cis*-form of carotene. $\lambda_{max}$ as well as % (III/II) indicate that it is very likely a *cis*-isomere of β-carotene. However, the % $A_B/A_{II}$ is lower as compared to the one found by De Rosso (de Rosso & Mercadante, 2007) but in a different solvent. Therefore, this position 13 of the *cis*-isomerization can only be supposed.

*All-trans-β-carotene (peak 9)*: collected characteristics perfectly fit the data from literature. The retention time is also in accordance with that of the standard.

*Cis-isomere of ß-carotene, position 9 supposed (peak 10):* mass indicates that this is a carotene and the presence of a slight peak at 330 nm indicates a *cis*-form of carotene. $\lambda_{max}$ as well as % (III/II) indicate that it is very likely a *cis*-isomere of β-carotene. But the % $A_B/A_{II}$ is higher as compared to the one found by De Rosso (de Rosso & Mercadante, 2007) but in a different solvent. This % should also be lower than the one of 13-*cis*-β-carotene, which is not the case. So the position 9 of the *cis*-isomerization can only be supposed.

*All-trans-lycopene (peak 11):* all-trans lycopene was perfectly identified, especially with its characteristic set of $\lambda_{max}$.

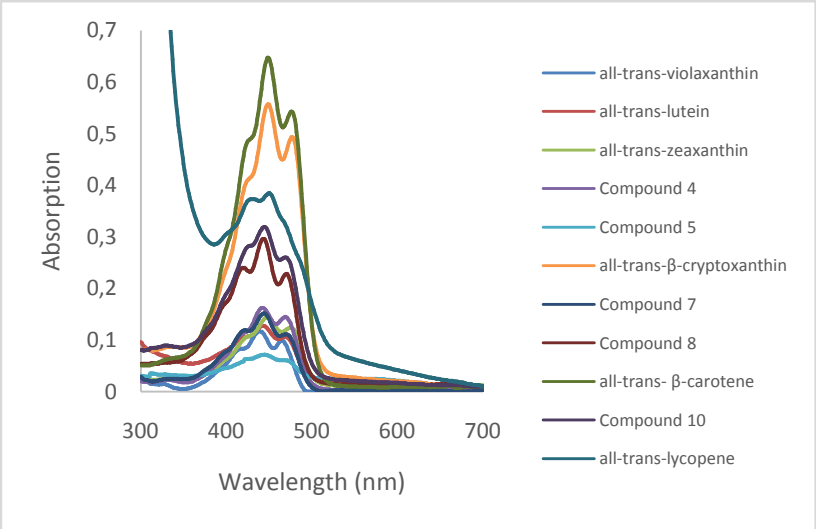



**Figure 3**: Absorption spectra of all the purified carotenoids in petroleum ether

**Table 1.** Characteristics of carotenoids from persimmon obtained from preparative chromatography

**$\lambda_{max}$** and fine spectral data were observed on UV-VIS spectrum of each collected carotenoid, in a powder form, in petroleum ether.

| Peak | Carotenoid | OH / epoxy | $t_R$ (min) | $\lambda_{max}$ (nm)[a] | % III/II[a,b] | % $A_B/II$[a, c] | $[M+H]^+$ (m/z) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | **all-*trans*-violaxanthin** | 2/2 | 18 | 416/440/465 (416/440/465) | 50 (98) | 0 | 601 |
| **2** | **all-*trans*-lutein** | 2/0 | 23 | 420/443/469 (421/445/474) | 25 (60) | 0 | 569 |
| **3** | **all-*trans*-zeaxanthin** | 2/0 | 28 | 424/448/475 (424/449/476) | 25 (25) | 0 | 569 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | not identified (*cis*-xanthophyll with 4 oxygens) | 4 | 32 | 330/422/444/469 | 43 | 14 | 601 |
| 5 | 5,6-epoxy-α-carotene suspected | 0/1 | 43 | 421/445/470 (418/441/469)* | 0 (10)* | 0 | 553 |
| **6** | **all-*trans*-*β*-cryptoxanthin** | 1/0 | 52 | 426/449/476 (425/449/476) | 36 (25) | 0 | 553 |
| 7 | not identified (mixture of monoxygenated xanthophyll and carotene) | ? | 62 | 330/423/444/470 | 10 | 18 | mixture 537/553 |
| 8 | *cis*-isomere of *β*-carotene, position 13 (supposed) | 0/0 | 67 | 332/421/443/470 (338/420/444/470)* | 16 (12)* | 20 (47)* | 537 |
| **9** | **all-trans- *β*-carotene** | 0/0 | 74 | 426/449/476 (425/450/477) | 23 (25) | 0 | 537 |
| 10 | *cis*-isomere of *β*-carotene, position 9 (supposed) | 0/0 | 75 | 331/424/445/469 (330/420/444/472)* | 11 (20)* | 26 (18)* | 537 |
| **11** | **all-*trans*-lycopene** | 0/0 | 86 | 444/470/502 (444/470/501) | 66 (65) | 0 | 537 |

[a] values between brackets without * correspond to spectral characteristics also found in petroleum ether and compiled by Rodriguez Amaya (2001). Values between brackets with * correspond to spectral characteristics along a methanol/MTBE gradient observed by De Rosso and Mercadante (2007), who also used a C30 column.

[b] ratio of the height of the longest-wavelength absorption peak, designated III, and that of the middle absorption peak, designated II, taking the minimum between the two peaks as baseline, multiplied by 100.

[c] the relative intensity of the cis-peak is expressed as $\%A_B/A_{II}$ (Figure 3), which is the ratio of the height of the *cis*-peak, designated $A_B$, and that of the middle main absorption peak, designated $A_{II}$, multiplied by 100.

**Figure 4** shows fluorescence spectra of the different carotenoids purified from persimmon fruits in petroleum ether.

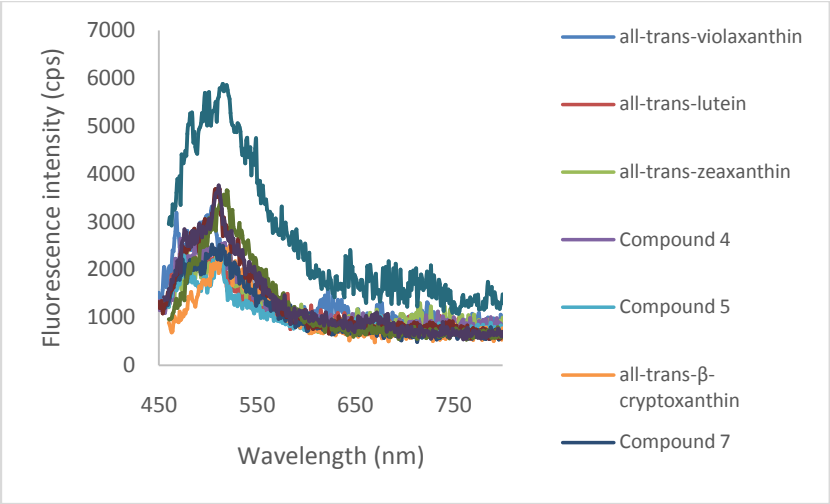



**Figure 4**: Fluorescence spectra of all compounds in petroleum ether

### *3.3. Singlet oxygen quenching by carotenoids*

In order to evaluate the potential of $^1O_2$ quenching, we used a porphyrin (P1COOH) to produce $^1O_2$ and we add different amounts of carotenoid. As an example, we presented in Figure 5, the $^1O_2$ decay of P1COOH without all-*trans*-β-carotene and with increasing amount of all-*trans*-β-carotene.

Due to this decay, the Stern-Volmer plot can be built and the quenching constant evaluated. Data are already available in the literature and reported in table 2. Nevertheless, no evaluation of quenching constant in hexane has been done. We reported our values in table 3.

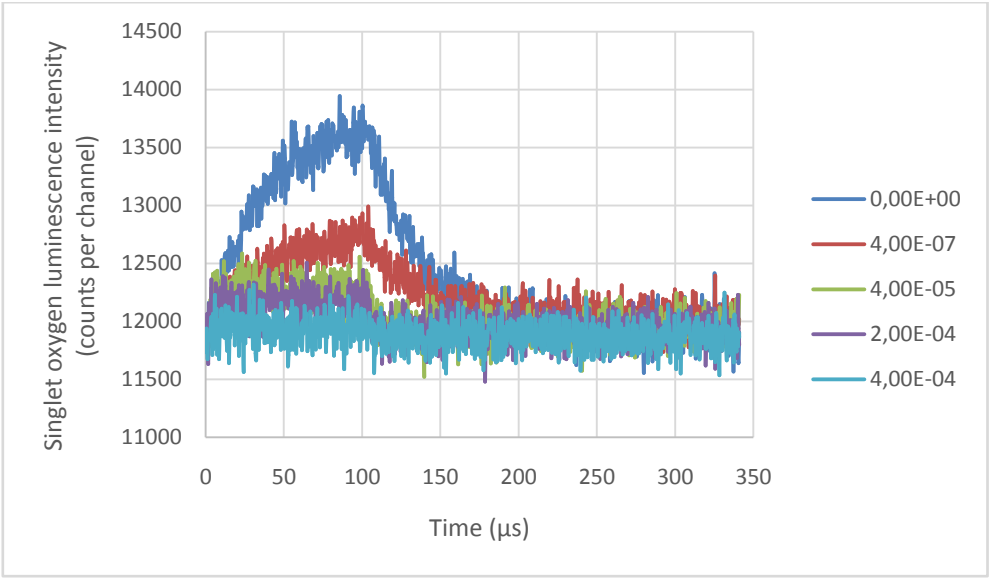



**Figure 5**: $^1O_2$ decay of P1COOH without all-*trans*-β-carotene and with increasing amount of all-*trans*-β -carotene, $\lambda_{exc}$= 408 nm, [P1COOH]= 1.5 $10^{-7}$ mol/L in hexane.

We chose a photosensitizer able to produce large amount of $^1O_2$ the porphyrin (P1COOH). Indeed, this molecule has been synthesized by our group and we found that the $^1O_2$ quantum yield in ethanol is 0.70 and 0.87 in toluene. Others photosensitizers have been taken in the literature to evaluate the potential of fluorescence or $^1O_2$ quenching of various carotenoids. Dreuw *et al*. (Dreuw, Fleming, & Head-Gordon, 2003) studied the chlorophyll fluorescence quenching by xanthophylls by time-dependent density-functional theory (TDDFT) and configuration interaction singles (CIS). Naqvi *et al*. also used the chlorophyll a (Naqvi, Melo, Raju, Javorfi, Simidjiev, & Garab, 1997). Cantrell et al. excited Bengal Rose and (4-(1-pyrene)butyric acid), (Cantrell, McGarvey, Truscott, Rancan, & Bohm, 2003) like Ramel (Ramel, Birtic, Cuine, Triantaphylides, Ravanat, & Havaux, 2012) to produce $^1O_2$. Fiedor et al. used bacteriopheophytin-a (Fiedor, Fiedor, Haessner, & Scheer, 2005) and Scholz et al. TPP (5,10,15,20-tetraphenyl-porphin) to evaluate β-carotene quenching (Scholz, Dedic, Svoboda, & Hala, 2011). Chantrell et al. also used another porphyrin, the protoporphyrin IX dimethyl ester (Chantrell, McAuliffe, Munn, Pratt, & Land, 1977).

To detect $^1O_2$ quenching, we recorded the decay of $^1O_2$ in presence of increasing amounts of carotenoids. Others techniques are described in the literature such as thermal dissociation of NDP02 and are reported in **Table 2**. In this table, we gathered all literature data we found for β-crypthoxanthin, β-carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin and violaxanthin. We observed myriad values of $K_q$ recorded for investigated carotenoids. The differences between the values might be attributed to the different experimental conditions used for $^1O_2$ production and detection. In our study all the compounds in hexane and checked the validity of our experiments with β-carotene in toluene. We found a value similar to the one of the literature (3.9. $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ in our case, 14. $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ for (Conn, Schalch, & Truscott, 1991).

According to our results, the rate constants of quenching of $^1O_2$ by β-crypthoxanthin, β-carotene, and lycopene recorded in hexane showed that this pigments quenches efficiently $^1O_2$ production, with associated ($K_q$) values of 1.6 $10^9$, 1.3 $10^9$ and 1.1 $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$. β-crypthoxanthin showed the higher quenching efficiency (1.6 $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$). In organic solvents carotenoids with 10 or 11 conjugated double bond quench singlet oxygen at near the diffusion limit. β-crypthoxanthin, β-carotene, lycopene contained between 11 C=C and 13 C=C conjugated double bonds (table 3), which explain the high $K_q$ values obtained. The little differences in the rate constants between the three carotenoids in hexane can be explained by the similarity of the number of C=C conjugated double bonds for these carotenoids. The hydroxylated forms of carotenoids lutein, zeaxanthin, violaxanthin, 5,6-epoxy-α-carotene and the not identified xanthophyll (peak 4) revealed smaller quenching rate constants. This

421 could be explained by a possible chemical reaction between $^1O_2$ and the hydroxyl group of
422 xanthophylls. Moreover, xanthophylls are well dissolved in polar solvent but not in non-polar solvent
423 such as hexane. This might lead to aggregation and decrease of the quenching rate constants.
424
425 **Table 3:** Bimolecular rate constants $K_q$ of the quenching of $^1O_2$ by carotenoids from persimmon fruits
426 in hexane.

| Carotenoids | Nb of C=C and OH group | $K_q$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) |
|---|---|---|
| **β-carotene in toluene** | 11 C=C | $3.9\ 10^9$ |
| **β-carotene in Hexane** | 11 C=C | $1.1\ 10^9$ |
| **β-cryptoxanthin** | 11 C=C and 1 OH | $1.6\ 10^9$ |
| **lycopene** | 13 C=C | $1.1\ 10^9$ |
| **Lutein** | 11 C=C and 2 OH | $8.0\ 10^8$ |
| **Zeaxanthin** | 11 C=C and 2 OH | $6.0\ 10^7$ |
| **Peak 4** | - | $7.2\ 10^7$ |
| **5,6-epoxy-α-carotene** | 10 C=C and 1 OH, 2 epoxy | $3.8\ 10^7$ |
| **Violaxanthin** | 9 C=C, 2 OH and 2 epoxy group | $5.8\ 10^7$ |

427

428 **Table 2:** $K_q$ of carotenoids in different solvent, methods of $^1O_2$ production and $^1O_2$ quenching

| Carotenoides | $k_Q$ $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ (solvent) | $^1O_2$ production | Method of $^1O_2$ quenching detection | References |
|---|---|---|---|---|
| lycopene | **17** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **18** ($C_6H_5CH_3$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **19**($C_6H_{14}$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **9.0** ($CHCl_3$) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Devasagayam, Werner, Ippendorf, Martin, & Sies, 1992) |
| | **19** ($CHCl_3$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **14** ($CCl_4$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **13.8** ($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | EP-1 | DPBF | (Ouchi, Aizawa, Iwasaki, Inakuma, Terao, Nagaoka, et al., 2010) |
| | **31**($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989; Di Mascio, Sundquist, Devasagayam, & Sies, 1992) |
| | **8.8** ($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | $DMNO_2$ | $^1O_2$ emission | (Beutner, Bloedorn, Frixel, Blanco, Hoffmann, Martin, et al., 2001) |
| | **17.5**($EtOH/CHCl_3/H_2O$ 50/50/1) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **31** ($EtOH/CHCl_3/H_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **0.13** (ascorbic acid in methanol) | NN | $^1O_2$ emission | (Böhm, Edge, & Truscott, 2011) |
| | **23-25** (reverse micelle (RM)) | RB | DMA | (Montenegro, Nazareno, Durantini, & Borsarelli, 2002) |
| | 8.8 ($CHCl_3$) | $DMNO_2$ | $^1O_2$ emission | (Beutner, et al., 2001) |
| | **9** ($EtOH/CHCl_3/H_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Wilhelm Stahl & Sies, 1993) |
| β-carotene | **13.0** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **13.8** ($C_6H_6$) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis / $^1O_2$ emission | (Rodgers & Bates, 1980) |
| | **12.5-14** ($C_6H_6$) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis / $^1O_2$ emission | (Wilkinson & Ho, 1978) |
| | **13** ($C_6H_6$) | Anthracene | DPBF | (Farmilo & Wilkinson.F, 1973) |
| | 14 (toluene) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | 1991) |
| | **14** ($C_6H_{14}$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **5.0** ($CHCl_3$) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Devasagayam, Werner, Ippendorf, Martin, & Sies, 1992) |
| | **14.0** ($EtOH/CHCl_3/H_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **12** ($EtOH/CHCl_3/H_2O$ : 50/50/1) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **10.8** ($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | EP-1 | DPBF | (Ouchi, et al., 2010) |
| | **4.2** ($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989; Di Mascio, Sundquist, Devasagayam, & Sies, 1992) |
| | **8.4** ($EtOH/CHCl_3/D_2O$ 50/50/1) | $DMNO_2$ | $^1O_2$ emission | (Beutner, et al., 2001) |
| | **30** ($MeOH/C_6H_6$ 1/4) | MB | 2-methyl-2-penten | Foote et al., (1970) |
| | **5** ($MeOH/C_6H_6$ 1/4) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis / $^1O_2$ emission | (Foote & Denny, 1968) |
| | **13** ($MeOH/C_6H_6$ 1/4) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis / $^1O_2$ emission | Foote (1979) |
| | **10.9** ±0.5 (THF) | TPP | $^1O_2$ emission | (Scholz, Dedic, Svoboda, & Hala, 2011) |
| | **2.3** (DPPC) | RB and PBA | $^1O_2$ emission | (Cantrell, McGarvey, Truscott, Rancan, & Bohm, 2003) |
| | **9.9** ($CCl_4$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **5.9** ($CCl_4$) | 1H-P + RB | $^1O_2$ emission | (Murasecco-Suardi, Oliveros, Braun, & Hansen, 1988) |
| | **0.7** ($CCl_4$) | Porphyrin | $^1O_2$ emission | (Krasnovsky, 1979) |
| | **11** ($CHCl_3$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **8.1** ($CHCl_3$) | $DMNO_2$ | $^1O_2$ emission | (Beutner, et al., 2001) |
| | **23** ($C_6H_6$ / MeOH : 3/2) | MB / RB | $^1O_2$ emission | Mathews-Roth et al., (1974) |
| | **1.5** ($CD_3OD$) | 1H-P / RB | $^1O_2$ emission | (Murasecco-Suardi, Oliveros, Braun, & Hansen, 1988) |
| | **0.35** (Ascorbic acid in MeOH) | NN | $^1O_2$ emission | (Böhm, Edge, & Truscott, 2011) |
| | **5** ($H_2O$/ $(CH_3)_2CO$ 12/88) | Riboflavin | GC with thermal conductivity | (Li, King, & Min, 2000) |
| | **12.67** (reverse micelle (RM)) | RB | DMA | (Montenegro, Nazareno, Durantini, & Borsarelli, 2002) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **5** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Wilhelm Stahl & Sies, 1993) |
| Lutein | **11.0** ($C_6H_6$) | TPP | $^1O_2$ emission | (Oliveros, Braun, Aminiansaghafi, & Sliwka, 1994) |
| | **16** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **8.0** (EtOH/$CH_2Cl_2$/$H_2O$; 50:50:1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **0.11** (DPPC) | RB and PBA | $^1O_2$ emission | (Cantrell, McGarvey, Truscott, Rancan, & Bohm, 2003) |
| | **9.24** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | EP-1 | DPBF | (Ouchi, et al., 2010) |
| | **2.4** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$ emission | (Di Mascio, Sundquist, Devasagayam, & Sies, 1992) |
| | **21** (MeOH/$C_6H_6$ 1/4) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis / $^1O_2$ emission | Foote 1979 |
| | **1.3** (ascorbic acid in methanol) | NN | $^1O_2$ emission | (Böhm, Edge, & Truscott, 2011) |
| | **10-33** reverse micelle (RM) | RB | DMA | (Montenegro, Nazareno, Durantini, & Borsarelli, 2002) |
| β-cryptoxanthin | **7.31** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | EP-1 | DPBF | (Ouchi, et al., 2010) |
| | **1.8-6** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989; Di Mascio, Sundquist, Devasagayam, & Sies, 1992) |
| Zeaxanthin | **12.6** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **12** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **2.8** ($C_6H_6$) | Anthracene/Naphtalene | Radiolysis /$^1O_2$ emission | (Rodgers & Bates, 1980) |
| | **10** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **0.23** (DPPC) | RB and PBA | $^1O_2$emission | (Cantrell, McGarvey, Truscott, Rancan, & Bohm, 2003) |
| | **10.5** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | EP-1 | DPBF | (Ouchi, et al., 2010) |
| | **3.0** (EtOH/$CHCl_3$/$D_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **10** (EtOH/$CHCl_3$/$H_2O$ 50/50/1) | $NDPO_2$ | $^1O_2$emission | (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989) |
| | **0.77** (ascorbic acid in methanol) | NN | Radiolysis / $^1O_2$ emission | (Böhm, Edge, & Truscott, 2011) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Violaxanthin | **16** ($C_6H_6$) | Phenazine | $^1O_2$ emission | (Conn, Schalch, & Truscott, 1991) |
| | **9** reverse micelle (RM) | RB | DMA | (Montenegro, Nazareno, Durantini, & Borsarelli, 2002) |

DHIR: -3,3-dihydroxyisorenieratene; $DMNO_2$: 1,4-dimethyl-1,4-naphthalene endoperoxide; DPBF: 1,3-Diphenylisobenzofuran; DMA: 9,10-dimethylanthrancene; EP-1: 3-(1,4-epidioxy-4-methyl-1,4-dihydro-1-naphtyl propionic acid); EtOH: ethanol; 1-HP: 1H-Phenalen-1-one; MB : methylene blue ; $NDPO_2$: 3,3'-(1,4-naphtalylene dipropionate); NN: (1-nitronaphtelene); PBA: 4-(1-pyrene)butyric acid; RB: Rose Bengal, RM : system of sodium (bis-2-ethylhexanyl)sulfosuccinate) in (hexane/$H_2O$); TPP: tetraphenylporphyrin. Hex: hexane; Car: carotenoid.

## 4. Conclusion

In summary, the photophysical properties (absorption, fluorescence, quenching of singlet oxygen) of carotenoids extracted and purified from persimmon fruits were investigated in hexane using porphyrin as photosensitizer for $^1O_2$ production. From the 8 investigated carotenoids, β-cryptoxanthin, β-carotene and lycopene showed high quenching efficiency compared to xanthophylls (lutein, violaxanthin, zeaxanthin, 5,6-epoxy-α-carotene and the not identified xanthophyll). The kinetic analysis of results obtained from Stern-Volmer plot showed that β-cryptoxanthin quench as efficiently singlet oxygen as β-carotene and lycopene with $K_q$ values of 1.6 $10^9$, 1.3 $10^9$, and 1.1 $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$. Lower values than $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ were recorded for xanthophylls in hexane. We should notice that the bimolecular rate constants of quenching of $^1O_2$ ($K_q$) depend on the carotenoids structure such as the number of conjugated double bonds and the presence or absence of hydroxyl and epoxy group.

## References

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry, 56*, 49-73.

Arvayo-Enriquez, H., Mondaca-Fernandez, I., Gortarez-Moroyoqui, P., Lopez-Cervantes, J., & Rodriguez-Ramirez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods, 5*(12), 2916-2924.

Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Blanco, I. H., Hoffmann, T., Martin, H. D., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schulke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl, W., & Walsh, R. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of ss-carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 81*(6), 559-568.

462 Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention - a Review of the
463 Epidemiologic Evidence. *Nutrition and Cancer-an International Journal, 18*(1), 1-29.
464 Böhm, F., Edge, R., & Truscott, T. G. (2011). Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (O-
465 1(2)) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochimica Polonica, 59*(1), 27-
466 30.
467 Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2008). *Carotenoids. Natural function* (Vol. 4): Springer.
468 Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2009). *Carotenoids. Nutrition and Health.* (Vol. 5): Birkhäuser
469 Verlag, Basel, Switzerland.
470 Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Rancan, F., & Böhm, F. (2003). Singlet oxygen quenching by
471 dietary carotenoids in a model membrane environment. *Archives of Biochemistry and Biophysics,*
472 *412*(1), 47-54.
473 Chantrell, S. J., McAuliffe, C. A., Munn, R. W., Pratt, A. C., & Land, E. J. (1977). Excited-States of
474 Protoporphyrin-Ix Dimethyl Ester - Reaction of Triplet with Carotenoids. *Journal of the Chemical*
475 *Society-Faraday Transactions I, 73*, 858-865.
476 Chen, J., Jarvi, M., Lo, P. C., Stefflova, K., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2007). Using the singlet oxygen
477 scavenging property of carotenoid in photodynamic molecular beacons to minimize
478 photodamage to non-targeted cells. *Photochemical & Photobiological Sciences, 6*(12), 1311-
479 1317.
480 Chen, J., Liu, T. W. B., Lo, P. C., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2009). "Zipper" Molecular Beacons: A
481 Generalized Strategy to Optimize the Performance of Activatable Protease Probes. *Bioconjugate*
482 *Chemistry, 20*(10), 1836-1842.
483 Chen, J., Stefflova, K., Niedre, M. J., Wilson, B. C., Chance, B., Glickson, J. D., & Zheng, G. (2004).
484 Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation.
485 *Journal of the American Chemical Society, 126*(37), 11450-11451.
486 Chouikrat, R., Champion, A., Vanderesse, R., Frochot, C., & Moussaron, A. (2015). Microwave-assisted
487 synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-
488 10,15,20-triphenylchlorin. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 19*(4), 595-600.
489 Conn, P. F., Schalch, W., & Truscott, T. G. (1991). The Singlet Oxygen and Carotenoid Interaction. *Journal*
490 *of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 11*(1), 41-47.
491 de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-
492 PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(13), 5062-
493 5072.
494 Devasagayam, T. P. A., Werner, T., Ippendorf, H., Martin, H. D., & Sies, H. (1992). Synthetic Carotenoids,
495 Novel Polyene Polyketones and New Capsorubin Isomers as Efficient Quenchers of Singlet
496 Molecular-Oxygen. *Photochemistry and Photobiology, 55*(4), 511-514.
497 Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet
498 Oxygen Quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 274*(2), 532-538.
499 Di Mascio, P., Sundquist, A. R., Devasagayam, T. P. A., & Sies, H. (1992). Assay of Lycopene and Other
500 Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers. In *Methods in Enzymology; Carotenoids, Part A:*
501 *Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation*, vol. 213 (pp. 429-438).
502 Dreuw, A., Fleming, G. R., & Head-Gordon, M. (2003). Chlorophyll fluorescence quenching by
503 xanthophylls. *Physical Chemistry Chemical Physics, 5*(15), 3247-3256.
504 Farmilo, A., & Wilkinson.F. (1973). Mechanism of Quenching of Singlet Oxygen in Solution.
505 *Photochemistry and Photobiology, 18*(6), 447-450.
506 Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and
507 Disease. *Nutrients, 6*(2), 466-488.

Fiedor, J., Fiedor, L., Haessner, R., & Scheer, H. (2005). Cyclic endoperoxides of beta-carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1709*(1), 1-4.

Foote, C. S., Chang, Y. C., & Denny, R. W. (1970a). Chemistry of Singlet Oxygen .10. Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. *Journal of the American Chemical Society, 92*(17), 5216-5218.

Foote, C. S., Chang, Y. C., & Denny, R. W. (1970b). Chemistry of Singlet Oxygen .11. Cis-Trans Isomerization of Carotenoids by Singlet Oxygen and a Probable Quenching Mechanism. *Journal of the American Chemical Society, 92*(17), 5218-5219.

Foote, C. S., & Denny, R. W. (1968). Chemistry of Singlet Oxygen .7. Quenching by Beta-Carotene. *Journal of the American Chemical Society, 90*(22), 6233-6235.

Foote, C. S., Denny, R. W., Weaver, L., Chang, Y., & Peters, J. (1970). Quenching of Singlet Oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences, 171*(1), 139-148.

Foote, C.S. Quenching of singlet oxygen. Chapt. 5, In Singlet Oxygen, Academic Press, New York, 1979, pp 139-171

Fuhrman, B., Elis, A., & Aviram, M. (1997). Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 233*(3), 658-662.

Grubbs, C. J., Eto, I., Juliana, M. M., & Whitaker, L. M. (1991). Effect of Canthaxanthin on Chemically-Induced Mammary Carcinogenesis. *Oncology, 48*(3), 239-245.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J., & Castro-Puyana, M. (2011). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In *Marine Bioactive Compounds*, (pp. 55-98): Springer US.

Key, T. J. (2011). Fruit and vegetables and cancer risk. *British Journal of Cancer, 104*(1), 6-11.

Kimura, M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2002). A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chemistry, 78*(3), 389-398.

Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Lee, Y. P., Lee, B. L., Yu, M. C., & Ong, C. N. (2011). Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese Health Study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 21*(9), 685-690.

Krasnovsky, A. A. (1979). Photo-Luminescence of Singlet Oxygen in Pigment Solutions. *Photochemistry and Photobiology, 29*(1), 29-36.

Kuno, T., Hirose, Y., Yamada, Y., Hata, K., Qiang, S. H., Asano, N., Oyama, T., Zhi, H. L., Iwasaki, T., Kobayashi, H., & Mori, H. (2006). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. *Oncology Reports, 15*(3), 533-538.

LaFountain, A. M., Pacheco, C., Prum, R. O., & Frank, H. A. (2013). Nuclear magnetic resonance analysis of carotenoids from the burgundy plumage of the Pompadour Cotinga (Xipholena punicea). *Archives of Biochemistry and Biophysics, 539*(2), 133-141.

Li, T. L., King, J. M., & Min, Y. B. (2000). Quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in riboflavin photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D-2. *Journal of Food Biochemistry, 24*(6), 477-492.

Lo, P. C., Chen, J., Stefflova, K., Warren, M. S., Navab, R., Bandarchi, B., Mullins, S., Tsao, M., Cheng, J. D., & Zheng, G. (2009). Photodynamic Molecular Beacon Triggered by Fibroblast Activation Protein on Cancer-Associated Fibroblasts for Diagnosis and Treatment of Epithelial Cancers. *Journal of Medicinal Chemistry, 52*(2), 358-368.

Lovell, J. F., Chen, J., Huynh, E., Jarvi, M. T., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2010). Facile Synthesis of Advanced Photodynamic Molecular Beacon Architectures. *Bioconjugate Chemistry, 21*(6), 1023-1025.

Lovell, J. F., Chen, J., Jarvi, M. T., Cao, W. G., Allen, A. D., Liu, Y., Tidwell, T. T., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2009). FRET Quenching of Photosensitizer Singlet Oxygen Generation. *Journal of Physical Chemistry B, 113*(10), 3203-3211.

Mathews-Roth, M. M. (1974). Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization. Photochemistry and Photobiology, *19*, 217-222.

Mendiola, J. A., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A, 1152*(1-2), 234-246.

Montenegro, M. A., Nazareno, M. A., Durantini, E. N., & Borsarelli, C. D. (2002). Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. *Photochemistry and Photobiology, 75*(4), 353-361.

Murakoshi, M., Nishino, H., Satomi, Y., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Iwashima, A., Okuzumi, J., Okabe, H., Kitano, H., & Iwasaki, R. (1992). Potent Preventive Action of Alpha-Carotene against Carcinogenesis - Spontaneous Liver Carcinogenesis and Promoting Stage of Lung and Skin Carcinogenesis in Mice Are Suppressed More Effectively by Alpha-Carotene Than by Beta-Carotene. *Cancer Research, 52*(23), 6583-6587.

Murasecco-Suardi, P., Oliveros, E., Braun, A. M., & Hansen, H. J. (1988). Singlet-Oxygen Quenching by Carotenoids - Steady-State Luminescence Experiments. *Helvetica Chimica Acta, 71*(5), 1005-1010.

Murillo, E., Giuffrida, D., Menchaca, D., Dugo, P., Torre, G., Melendez-Martinez, A. J., & Mondello, L. (2013). Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry, 140*(4), 825-836.

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta, 703*(1), 8-18.

Namitha, K. K., & Negi, P. S. (2010). Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50*(8), 728-760.

Naqvi, K. R., Melo, T. B., Raju, B. B., Javorfi, T., Simidjiev, I., & Garab, G. (1997). Quenching of chlorophyll a singlets and triplets by carotenoids in light-harvesting complex of photosystem II: Comparison of aggregates with trimers. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 53*(14), 2659-2667.

Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A, 881*(1-2), 543-555.

Oliveros, E., Braun, A. M., Aminiansaghafi, T., & Sliwka, H. R. (1994). Quenching of Singlet Oxygen (1-Delta-G) by Carotenoid Derivatives - Kinetic-Analysis by near-Infrared Luminescence. *New Journal of Chemistry, 18*(4), 535-539.

Onogi, N., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Fukutomi, Y., Moriwaki, H., Muto, Y., & Kojima, S. (1998). Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutrition and Cancer-an International Journal, 32*(1), 20-24.

Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S.-i., & Mukai, K. (2010). Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Carotenoids and Food Extracts in Solution. Development of a Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(18), 9967-9978.

Perera, C. O., & Yen, G. M. (2007). Functional properties of carotenoids in human health. *International Journal of Food Properties, 10*(2), 201-230.

Ramel, F., Birtic, S., Cuine, S., Triantaphylides, C., Ravanat, J.-L., & Havaux, M. (2012). Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiology, 158*(3), 1267-1278.

Rivera, S., & Canela, R. (2012). Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules, 17*(9), 11255-11268.

Rodgers, M. A. J., & Bates, A. L. (1980). Kinetic and Spectroscopic Features of Some Carotenoid Triplet-States - Sensitization by Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology, 31*(6), 533-537.

Rodriguez-Amaya, D. B., Rodriguez, E. B., & Amaya-Farfan, J. (2006). Advances in food carotenoids research: chemical and technological aspects, implications in human health. *Malaysian Journal of Nutrition, 12*(1), 101-121.

Rodriguez-Concepcion, M. (2010). Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch. Biochem. Biophys., 504*(1), 118-122.

Santamaria, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Ravetto, C., Bianchi, L., Pizzala, R., Andreoni, L., Santagati, G., & Bermond, P. (1988). Chemoprevention of Indirect and Direct Chemical Carcinogenesis by Carotenoids as Oxygen Radical Quenchers. *Annals of the New York Academy of Sciences, 534*, 584-596.

Scholz, M., Dedic, R., Svoboda, A., & Hala, J. (2011). TPP and singlet oxygen quenching by carotene in solution. *Journal of Molecular Structure, 993*(1-3), 474-476.

Stahl, W., & Sies, H. (1993). Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. In *Annals of the New York Academy of Sciences; Carotenoids in human health*, vol. 691 (pp. 10-19).

Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine, 24*(6), 345-351.

Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *Journal of the American Dietetic Association, 96*(10), 1027-1039.

Suzuki, K., Ishii, J., Kitagawa, F., Kuno, A., Kusuhara, Y., Ochiai, J., Ichino, N., Osakabe, K., Sugimoto, K., Yamada, H., Ito, Y., Hamajima, N., & Inoue, T. (2013). Association of Serum Carotenoid Levels With N-Terminal Pro-Brain-Type Natriuretic Peptide: A Cross-Sectional Study in Japan. *Journal of Epidemiology, 23*(3), 163-168.

Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K., & Hara, A. (1995). Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis, 16*(12), 2957-2963.

Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A., & Mori, H. (1994). Chemoprevention of Mouse Urinary-Bladder Carcinogenesis by the Naturally-Occurring Carotenoid Astaxanthin. *Carcinogenesis, 15*(1), 15-19.

Temple, N. J. (1999). Fruits, vegetables, and cancer prevention trials. *Journal of the National Cancer Institute, 91*(13), 1164-1164.

Temple, N. J., & Gladwin, K. K. (2003). Fruit, vegetables, and the prevention of cancer: Research challenges. *Nutrition, 19*(5), 467-470.

Verhille, M., Benachour, H., Ibrahim, A., Achard, M., Arnoux, P., Barberi-Heyob, M., Andre, J. C., Allonas, X., Baros, F., Vanderesse, R., & Frochot, C. (2012). Photodynamic Molecular Beacons Triggered by MMP-2 and MMP-9: Influence of the Distance Between Photosensitizer and Quencher onto Photophysical Properties and Enzymatic Activation. *Current Medicinal Chemistry, 19*(32), 5580-5594.

Wertz, K., Siler, U., & Goralczyk, R. (2004). Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 430*(1), 127-134.

Wilkinson, F., & Ho, W. T. (1978). Electronic-Energy Transfer from Singlet Molecular-Oxygen to Carotenoids. *Spectroscopy Letters, 11*(7), 455-463.

Willett, W. C. (2010). Fruits, Vegetables, and Cancer Prevention: Turmoil in the Produce Section. *Journal of the National Cancer Institute, 102*(8), 510-U519.

Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-Cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., & Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (Diospyros kaki L.), peach (Prunus persica L.) and apricot (Prunus armeniaca L.). *Food Chemistry, 184*, 131-139.

Zheng, G., Chen, J., Stefflova, K., Jarvi, M., Li, H., & Wilson, B. C. (2007). Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104*(21), 8989-8994.

656

# Conclusions & perspectives

# Conclusions et Perspectives

***Bref rappel du contexte et des objectifs de la thèse***

La thérapie photodynamique (PDT) est une technique utilisée cliniquement pour traiter certaines maladies de la peau, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et certains types de cancer. Elle fait intervenir trois composants : une molécule photosensible ou photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène. Après administration du PS, celui-ci va se localiser plus ou moins sélectivement dans les zones tumorales où il est alors activé par irradiation lumineuse à une longueur d'onde et une puissance données. Ceci engendre la formation de produits hautement réactifs et cytotoxiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont l'oxygène singulet $^1O_2$, qui entraînent la destruction des tissus tumoraux par nécrose ou apoptose. Afin d'améliorer la sélectivité du traitement, différentes pistes sont actuellement exploitées dont l'élaboration de « *photodynamic molecular beacon* » (PMB), conçus pour ne produire de l'oxygène singulet qu'au niveau de la cible tumorale. Dans un PMB, le photosensibilisateur (PS) est associé *via* un peptide à un inhibiteur de l'oxygène singulet appelé quencher (Q). Ce quencher Q inhibe la formation d'$^1O_2$ tant que le composé n'a pas atteint sa cible. Une fois la zone cancéreuse atteinte, des enzymes spécifiques clivent le peptide, libérant ainsi le photosensibilisateur qui retrouve alors sa capacité à former de l'oxygène singulet. Trouver un couple PS/quencher Q adéquat reste un challenge en PDT. Les propriétés photophysiques particulières des caroténoïdes et leur aptitude à inhiber la production d'oxygène singulet font de ces derniers des quenchers potentiellement utilisables pour l'élaboration de PMB.

Chez les plantes, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) sont des pigments associés à la photosynthèse qui ont deux rôles principaux : un rôle de collecteur de lumière (transfert à la chlorophylle de l'énergie lumineuse qu'ils absorbent dans les gammes du spectre situées entre le violet et le rouge) et un rôle photoprotecteur en protégeant le(s) système(s) photosynthétique(s) contre les dommages photooxydatifs(production d'oxygène singulet et de chlorophylle à l'état triplet) liés à une exposition trop intense à la lumière (récupération de l'énergie excédentaire captée par la chlorophylle en cas d'excès de lumière et dissipation de cette énergie sous forme de chaleur évitant ainsi la détérioration de l'appareil photosynthétique de la plante). Ceci s'opère, entre autre, *via* le cycle des xanthophylles (conversion de la violaxanthine en antéraxanthine puis en zéaxanthine par dé-époxydations successives, et inversement en absence de lumière). *Cette aptitude à capter de l'énergie présente un intérêt potentiel*

*à ne pas négliger dans la perspective de la conception de PMB utilisables en thérapie photodynamique ciblée.*

Les caroténoïdes demeurent des molécules difficiles à extraire et purifier au sein de matrices biologiques complexes, essentiellement végétales (fruits et légumes). Ceci est en partie dû à leur sensibilité vis-à-vis de l'oxygène et de la lumière, nécessitant une protection maximale vis-à-vis de ces deux éléments durant la phase d'extraction/purification/stockage. Ce sont également des molécules très coûteuses sous forme pure (environ 500 €/mg), rarement disponibles commercialement.

**Dans ce contexte les 3 objectifs de cette thèse étaient donc :**

- Une meilleure compréhension et maîtrise de l'extraction et purification de caroténoïdes issus de fruits produits en Tunisie (le persimmon, la pêche et l'abricot) en vue de la comparaison de leurs profils caroténoïdiques. Il s'agissait principalement de comparer les performances et intérêts de procédés d'extraction non-conventionnels tels que l'extraction accélérée par solvant sous pression (ASE) et l'extraction par fluide supercritique en présence de cosolvant (SFE) avec la méthode d'extraction classique par solvant organique à pression atmosphérique, dite méthode de Soxhlet ***(Résultats : Chapitre 4 et chapitre 5)***,
- La valorisation de fruits produits en Tunisie grâce à une étude des principes actifs les composant (en particulier les carotènoïdes),
- L'étude du potentiel des caroténoïdes extraits et purifiés, dont certains sont non disponibles commercialement, à être utilisés seuls comme quenchers de l'oxygène singulet déjà formé, *via* des mesures photophysiques ***(Résultats : Chapitre 6)***.

***Conclusions du chapitre 4: Accelerated solvent extraction of carotenoids from Tunisian Kaki (Diospyros kaki L.), peach (Prunus persica L.) and apricot (Prunus armeniaca L.)***

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'intérêt de l'extraction accélérée par solvant sous pression (ASE) pour l'extraction de caroténoïdes issus des trois fruits. Trois facteurs ont été étudiés : la température (40, 60 ou 80°C), le % de méthanol dans un solvant binaire méthanol/THF (20, 60 ou 100 %), et le temps d'extraction au travers du nombre de cycle d'extraction statique de 5 min (1, 3 ou 5). Le nombre de cycles d'extractions statiques n'influant pas sur les concentrations en caroténoïdes quantifiés, nous avons (i) fixé le nombre de cycle d'extraction de 5 min à 1, (ii) effectué un plan d'expériences testant uniquement les effets de la température et du % de méthanol sur les rendements

d'extraction des 4 caroténoïdes pour lesquels nous possédions des standards (forme all-*trans* de la lutéine, de la zéaxanthine, de la β-cryptoxanthine et du β-carotène). Ce plan était constitué de 7 expériences (4 points extrêmes et un point central, répétées 3 fois). Chaque combinaison étant testée en triplicata pour chaque fruit, un total de 63 extractions a donc été effectué.

Dans notre domaine expérimental, des surfaces de réponses ont été établies sur la base d'un modèle linéaire de premier ordre avec interactions simples. Les conditions optimales trouvées pour les xanthophylles aussi bien que pour les carotènes sont : 1 seule cycle d'extraction de **5 min** à **40°C** avec un ratio volumique méthanol/THF de **80/20** impliquant une consommation de seulement **30 mL** de solvant d'extraction (MeOH/THF) à une pression de **103 bars**. Pour les trois fruits, le rendement relatif d'extraction exprimé en % du rendement observé par extraction Soxhlet, était de **87 %** (et 100 % pour le β-carotène). Les avantages de l'ASE sont ici évidents dans la mesure où l'extraction est considérée comme achevée au bout de 5 minutes d'extraction au lieu de 6 heures environ avec le Soxhlet, à plus basse température (40 °C au lieu de 66°C avec le Soxhlet), en utilisant seulement 30 mL de solvant au lieu de 250 mL avec le Soxhlet. Ce procédé consomme donc nettement moins de temps, d'énergie thermique et de solvant.

De manière surprenante, des conditions d'extraction optimales similaires ont été observées pour les xanthophylles (polaires) et les carotènes (apolaire) vis-à-vis du solvant d'extraction. L'usage d'une pression d'extraction élevée (103 bars) d'une part, et d'un solvant assez peu polaire et aprotique tel que le THF, efficace aussi bien pour les xanthophylles que les carotènes, peut expliquer ce résultat.

Des $R^2$ de 0,77 à 0,92 ont été obtenus pour toutes les surfaces de réponse avec une distribution normale des résidus mise en évidence par un test de Shapiro-Wilk. Des effets significatifs sur le rendement d'extraction ont été observés aussi bien pour le % de méthanol que pour la température et leur interaction.

La comparaison des profils caroténoïdique des trois fruits témoigne de la richesse du persimmon en all-*trans*-β-cryptoxanthine et en all-*trans*-zéaxanthine, tandis que l'abricot est le plus riche en all-*trans*-β-carotène. La pêche, elle, présente un profil caroténoïdique assez équilibré entre xanthophylles et carotènes sans caroténoïdes très majoritaires et aussi abondants que ceux trouvés dans le persimmon ou l'abricot. Les sommes des 4 teneurs en caroténoïdes quantifiés (lutéine, zéaxanthine, β-cryptoxanthine et β-carotène) sont de de 67,84 ± 9,03, 66,22 ± 4,03 et 39,83 ± 1,11 µg/g de poudre de fruit chez le persimmon, l'abricot et la pêche, respectivement.

L'extraction par solvant accélérée (ASE), rarement appliquée à des matrices alimentaires dans la littérature, s'est révélée particulièrement efficace pour l'étude des profils caroténoïdiques des 3 fruits étudiés. Cette méthode d'extraction demeure toutefois une méthode nécessitant l'usage de solvants organiques en quantités qui, bien que beaucoup plus faibles que celles utilisées en Soxhlet, n'en demeurent pas moins non négligeables.

Nous avons donc choisi de nous intéresser à un autre procédé d'extraction : l'extraction par fluide supercritique (*Supercritical Fluid Extraction : SFE*) en utilisant le $CO_2$ comme fluide supercritique. Etant donné la grande variété et la quantité de caroténoïdes (xanthophylles mais aussi carotènes) observés dans le persimmon lors de l'étude d'extraction par méthode ASE, nous avons décidé de focaliser notre étude d'extraction par $CO_2$ supercritique sur le persimmon.

***Conclusions du chapitre 5: Response surface methodology applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of carotenoids from Persimmon (Diospyros kaki L.)***

Dans cette étude, nous avons utilisé le $CO_2$ supercritique en tant que solvant supercritique, en présence d'éthanol comme cosolvant afin d'extraire aussi bien les carotènes que les xanthophylles.

Afin de rechercher les conditions optimales d'extraction des caroténoïdes du persimmon nous avons pu utiliser avec succès une approche par plan d'expériences basée sur la définition de surfaces de réponse *via* un plan central composite à faces centrées ($\alpha$=1). Cinq facteurs ont été considérés : pression (P, bars), température (T, °C), débit de $CO_2$ (D, mL/min), pourcentage en cosolvant (E, % éthanol), temps d'extraction (t, min), avec trois niveaux par facteur. Avant ce travail, aucune étude d'extraction de caroténoïdes par SFE impliquant un plan d'expérience à 5 facteurs n'avait encore été décrite dans la littérature.

Le plan composite contenant 28 expériences, toutes réalisées en duplicata, a permis de modéliser et d'optimiserl'extraction des caroténoïdes représentée par leur concentration C, en µg/ g de matière sèche (poudre de fruit).

Un modèle linéaire de second ordre avec interaction à deux facteurs a été appliqué avec des effets significatifs considérés pour des valeurs de *p* inférieure à 0,05. La normalité de la distribution des 58 résidus a été confirmée par un test de Shapiro-Wilk, pour chacun des quatre caroténoïdes quantifiés.

Les conditions d'extraction optimales ont ainsi pu être identifiées dans notre domaine expérimental, pour les xanthophylles et pour les carotènes. Les rendements d'extraction relatifs à chaque caroténoïde ont ensuite été comparés à ceux obtenus par Soxhlet.

Les conditions d'extraction optimales identifiées dans notre domaine expérimental ont été :

- 300 bars, 60°C, 30 min, 25% EtOH (w/w) et 3 mL/min $CO_2$ pour la lutéine, la zéaxanthine et la β-cryptoxanthine sous forme all-*trans*.
- 100 bars, 40 °C, 30 min, 25 % EtOH et 1 mL/min $CO_2$ pour le all-*trans*-β-carotène.

Au-delà de l'identification des meilleures conditions d'extraction de notre domaine expérimental, le plan d'expérience utilisé a également révélé que l'extraction des xanthophylles et des carotènes requiert des pressions et températures très différentes, avec diverses conséquences en terme de densité de $CO_2$ (et donc de pouvoir solvant de ce $CO_2$) et probablement de pression de vapeur des caroténoïdes. Le débit de $CO_2$, et donc son temps de séjour dans l'extracteur, s'est également révélé important avec un débit lent préférable aussi bien techniquement qu'économiquement. Les xanthophylles étaient mieux extraits avec un $CO_2$ à haute densité et haute température avec un faible débit. Dans ce cas, l'augmentation de la tension de vapeur des caroténoïdes était donc compensée par l'augmentation de densité et de pouvoir solvant du $CO_2$. A l'inverse, le β-carotène, lui, était mieux extrait en utilisant un $CO_2$ de densité modérée à faible température et faible débit. Ceci très certainement parce-que, à forte température et même à forte densité, l'augmentation de la tension de vapeur du β-carotène n'était pas compensée par l'augmentation de densité (et donc de pouvoir solvant) du $CO_2$. Ceci montre bien qu'une forte densité de $CO_2$, trop souvent assimilée à la garantie d'une meilleure extraction, n'est pas le seul paramètre à considérer lors d'une extraction par $CO_2$ supercritique.

Enfin, pour les quatre caroténoïdes quantifiés (3 xanthophylles et 1 carotène), l'extraction des caroténoïdes à partir des 0,5 g de poudre de fruit s'est révélée être achevée au bout de 30 min seulement d'extraction, peut-être avant, dans les meilleures conditions utilisées. Ceci avec des rendements d'extraction légèrement supérieurs à ceux observés par la méthode de référence de type Soxhlet elle-même. Ces informations obtenues sur une petite installation d'extraction SFE pourraient s'avérer utiles pour la mise au point d'un procédé d'extraction à plus grande échelle.

***Conclusion du chapitre 6: Carotenoids as quenchers of singlet oxygen for the design of new photodynamic molecular beacon (PMB)***

Dans cette étude, nous avons tout d'abord pu extraire les caroténoïdes contenus dans 700 g de poudre de persimmon lyophilisé, en utilisant plusieurs runs d'extractions ASE successifs dans les meilleures conditions identifiées au chapitre 4. Nous avons effectué une purification des caroténoïdes extraits *via* de nombreux runs d'HPLC semi-préparative sur phase C30, en adaptant le gradient aux nouvelles conditions opératoires (volume d'injection = 3,5 mL et débit de phase mobile = 4 mL/min). La collecte de fractions correspondant à 11 caroténoïdes différents a ainsi pu être réalisée. Des analyses *via* LC-PDA-MS ont ensuite permis d'identifier la majorité de ces caroténoïdes sur base de leur temps de rétention, de leur masse et de leur signature spectrale (absorption) dans le domaine UV-visible. Après évaporation de la phase mobile, reprise dans de l'eau puis lyophilisation, les poudres correspondant aux 11 pics caroténoïdiques ont pu être obtenues (sauf pour le lycopène, repris dans l'éther de pétrole car obtenu en quantité non manipulable).

Après cette phase préparatoire particulièrement lourde et fastidieuse, une étude des propriétés photophysiques de plusieurs des caroténoïdes identifiés a enfin pu être réalisée. Les spectres UV-Visible en solvant pur (Hexane) ont été enregistrés, tout comme les spectres de fluorescence. Enfin, le potentiel quencher de ces caroténoïdes vis-à-vis de l'oxygène singulet a pu être évalué *via* la définition des constantes de quenching, Kd, du $^1O_2$ sur base de l'équation de Stern-Volmer et *via* la comparaison expérimentale des durées de vie du $^1O_2$ après excitation de la porphyrine $P_1COOH$ (le photosensibilisateur) dans l'éther de pétrole SANS puis AVEC différentes concentrations en caroténoïdes. Dans l'hexane, les composés quenchers présentant les plus grandes constantes de quenching sont la β-cryptoxanthine, le β-carotène et le lycopène, sous leur forme *all-trans*.

***Perspectives***

Si nous avons pu identifier des conditions optimales d'extractions de caroténoïdes dans nos domaines expérimentaux (aussi bien en ASE que SFE), nous n'avons en revanche pas pu trouver le véritable optimum d'extraction car ce dernier était en dehors de nos domaines experimentaux, ces derniers étant limités par les caractéristiques de nos équipements (température, pression, débit, etc…)

Concernant l'ASE, un test à 100 % de THF comme solvant ainsi que l'usage d'une température plus basse auraient été intéressants. Par ailleurs, l'étude de l'impact de la granulometrie de la poudre de fruit et de la proportion de Florisil utilisée en mélange avec la poudre aurait pu être ajoutée comme facteur dans le

plan d'expériences. Pour autant, la granulométrie de notre poudre était en accord avec les recommendations de Thermo Scientific™-Dionex™. Les variations de pressions possibles avec notre équipement ASE ne permettent par ailleurs pas de faire varier largement la pression (80-140 bars). 103 bars est la pression de consigne recommandée par Thermo Scientific™-Dionex™. Faire varier la pression n'était donc pas intéressant dans le cas de l'ASE.

Concernant l'usage de la SFE, en revanche, il serait intéressant de pouvoir effectuer des extractions en utilisant un $CO_2$ supercritique à des **pressions supérieures à 300 bars**. Des équipements tels que ceux disponibles chez SEPAREX SA (Champigneulle, France) pourraient permettre d'effectuer des tests à des pressions allant juqu'à 1000 bars. Ces hautes pressions permettent d'obtenir des $CO_2$ supercritiques de densité proche de 1,2 à basse température (ex : d=1.18 à 1000 bars et 40°C) ayant des pouvoirs solvants plus importants. L'usage de plus faibles quantités d'éthanol en co-solvant serait sans doute alors possible. Les temps d'extraction pourraient aussi être diminués. Cependant, les pilotes continus permettant d'atteindre de telles pressions sont indisponibles à l'échelle du laboratoire et ne sont pas non plus adaptés à de petits extraits de poudre de fruits. Leur nettoyage entre chaque run d'extraction serait bien plus compliqué et pas forcément adapté à un plan d'expérience. L'étude de l'impact de la granulométrie sur les rendements d'extraction aurait également pu être ajoutée en tant que sixième facteur au plan d'expérience. Mais cela aurait fortement augmenté le nombre d'expériences, déjà important avec 5 facteurs.

Il serait également intéressant d'effectuer une étude cinétique entre 0 et 30 min d'extraction par SFE, dans les meilleures conditions de pression, température et débit identifiées dans nos plans d'expériences appliqués aux xanthophylles et carotène.

L'étude de caroténoides plus spécifiques issus de micro-algues pourrait également s'avérer intéressante. *Haematococcus pluvialis* est par exemple riche en astaxanthine, lutéine et cantaxanthine.

Enfin, au-delà de l'étude des propriétés photophysiques des caroténoïdes, leur utilisation effective en tant que quencher (Q) de l'oxygéne singulet dans un véritable PMB composé d'une porphyrine comme photosensibilisateur (PS), d'un peptide de couplage spécifique et d'un quencher caroténoïdique(Q), permettrait d'évaluer plus concrètement leur intérêt en thérapie photodynamique. Pour ce faire, il faudrait mofifier la structure chimique des carotènoïdes existants afin de pouvoir les coupler de façon covalent au peptide substrat du PMB.

# ANNEXE I

Tableau  AI. 1 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour le kaki exprimé en µg/g de matière sèche.

| T°C | %MeOH | Lutéine | zéaxanthine | β-cryptoxanthine | β-carotène | T °C | % MeOH | % THF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 10,6191149 | 15,6318366 | 25,5535361 | 7,2420141 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 17,0434418 | 22,4769574 | 37,6581411 | 9,014476486 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 10,3676029 | 15,5790005 | 25,1367918 | 7,293020073 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | 1 | 4,56395628 | 5,12600114 | 8,57448753 | 4,576991382 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 4,61146101 | 4,97874451 | 7,77320277 | 4,175847409 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 3,76038636 | 3,82009424 | 5,36555682 | 3,733318982 | **40** | **100** | **0** |
| 0 | 0 | 6,9704094 | 8,91032066 | 13,9864922 | 5,075399968 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 5,24743695 | 6,16200563 | 8,98499416 | 4,184942302 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,59144479 | 3,3200523 | 3,84151404 | 3,044876723 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 6,9704094 | 8,91032066 | 13,9864922 | 5,075399968 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 5,24743695 | 6,16200563 | 8,98499416 | 4,184942302 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,59144479 | 3,3200523 | 3,84151404 | 3,044876723 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 6,9704094 | 8,91032066 | 13,9864922 | 5,075399968 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 5,24743695 | 6,16200563 | 8,98499416 | 4,184942302 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,59144479 | 3,3200523 | 3,84151404 | 3,044876723 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 6,9704094 | 8,91032066 | 13,9864922 | 5,075399968 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 5,24743695 | 6,16200563 | 8,98499416 | 4,184942302 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,59144479 | 3,3200523 | 3,84151404 | 3,044876723 | **60** | **60** | **40** |
| 1 | -1 | 3,69431186 | 3,31272339 | 3,69396931 | 3,269029699 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 3,61177168 | 3,28044262 | 3,6872133 | 3,174279059 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 3,9803348 | 3,76641027 | 4,3896144 | 3,33636112 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | 1 | 3,8955372 | 4,32220228 | 4,15955025 | 3,44754484 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 4,71317213 | 7,26366581 | 6,40280905 | 4,029621828 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 4,5876683 | 3,27288393 | 5,88822638 | 3,987401305 | **80** | **100** | **0** |

Tableau AI. 2 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour le pêche exprimé en µg/g de matière sèche.

| T°C | %MeOH | Lutéine | zéaxanthine | β-cryptoxanthine | β-carotène | T °C | % MeOH | % THF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 9,09882428 | 8,79276445 | 10,0802681 | 11,91982963 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 9,50641318 | 9,09950654 | 10,6292762 | 12,38210082 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 9,45701012 | 9,17395181 | 10,4218414 | 12,45698377 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | 1 | 4,99782529 | 4,22744978 | 5,61870948 | 7,409323995 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 4,45228345 | 3,78573096 | 4,49833268 | 5,781015276 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 4,29812103 | 3,63688783 | 4,44228084 | 5,707658392 | **40** | **100** | **0** |
| 0 | 0 | 4,67342616 | 3,94641633 | 4,25223014 | 4,950689228 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,68308527 | 3,9778692 | 4,225807 | 5,017959146 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,84460498 | 4,12747823 | 4,54025678 | 5,350161063 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,67342616 | 3,94641633 | 4,25223014 | 4,950689228 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,68308527 | 3,9778692 | 4,225807 | 5,017959146 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,84460498 | 4,12747823 | 4,54025678 | 5,350161063 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,67342616 | 3,94641633 | 4,25223014 | 4,950689228 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,68308527 | 3,9778692 | 4,225807 | 5,017959146 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,84460498 | 4,12747823 | 4,54025678 | 5,350161063 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,67342616 | 3,94641633 | 4,25223014 | 4,950689228 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,68308527 | 3,9778692 | 4,225807 | 5,017959146 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,84460498 | 4,12747823 | 4,54025678 | 5,350161063 | **60** | **60** | **40** |
| 1 | -1 | 4,6762323 | 3,90581098 | 4,10281497 | 4,743855374 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 3,89100017 | 3,29199309 | 3,20112099 | 3,733493884 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 4,28158274 | 3,67544167 | 3,70818593 | 4,25630223 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | 1 | 3,60240308 | 3,01176383 | 3,03955854 | 3,659083745 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 3,81061654 | 3,10219448 | 3,22726061 | 3,890117472 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 3,68781799 | 3,11700184 | 3,26966078 | 3,98342277 | **80** | **100** | **0** |

Tableau AI. 3 : Les résultats du plan d'expérience factoriel complet pour l'abricot exprimé en µg/g de matière sèche.

| T°C | %MeOH | Lutéine | zéaxanthine | β-cryptoxanthine | β-carotène | T°C | % MeOH | % THF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 6,88402011 | 4,42703182 | 5,53264172 | 43,64067293 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 7,48196684 | 5,36787168 | 7,08051357 | 51,45395278 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | -1 | 7,43343729 | 5,18860417 | 6,6026457 | 47,57388543 | **40** | **20** | **80** |
| -1 | 1 | 5,33170398 | 3,5771405 | 5,17349603 | 38,18795215 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 5,73094909 | 3,96800735 | 4,66691775 | 29,03465746 | **40** | **100** | **0** |
| -1 | 1 | 6,03889263 | 4,03854837 | 4,93099895 | 33,64592383 | **40** | **100** | **0** |
| 0 | 0 | 4,06349027 | 3,08187083 | 3,3750529 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,72146751 | 2,89529812 | 2,58490614 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,0250233 | 3,0646126 | 3,28701525 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,06349027 | 3,08187083 | 3,3750529 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,72146751 | 2,89529812 | 2,58490614 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,0250233 | 3,0646126 | 3,28701525 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,06349027 | 3,08187083 | 3,3750529 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,72146751 | 2,89529812 | 2,58490614 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,0250233 | 3,0646126 | 3,28701525 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,06349027 | 3,08187083 | 3,3750529 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 3,72146751 | 2,89529812 | 2,58490614 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 0 | 0 | 4,0250233 | 3,0646126 | 3,28701525 | 11,51784767 | **60** | **60** | **40** |
| 1 | -1 | 4,96999181 | 2,94656221 | 3,05886386 | 9,364133986 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 4,78169369 | 3,22917852 | 3,39300405 | 13,64971208 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | -1 | 5,0607971 | 3,10383387 | 3,177129 | 10,23560232 | **80** | **20** | **80** |
| 1 | 1 | 4,29442725 | 3,2657702 | 3,49043198 | 10,87328462 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 4,26503436 | 3,20810903 | 3,35550849 | 10,56792724 | **80** | **100** | **0** |
| 1 | 1 | 4,35310209 | 3,31451413 | 3,43145387 | 10,36328831 | **80** | **100** | **0** |

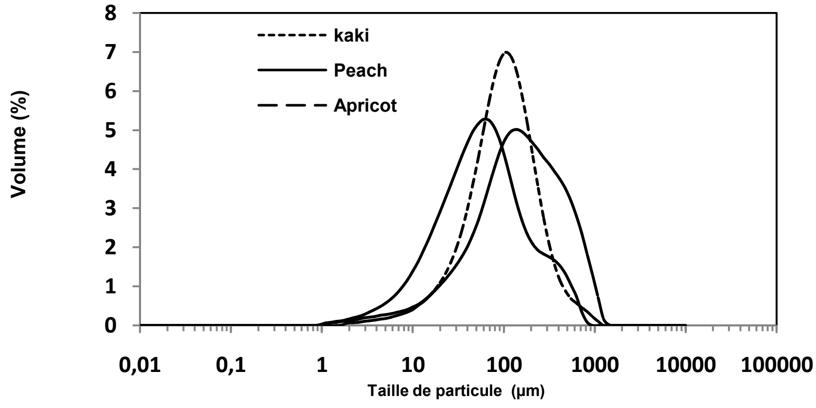



Figure AI.1 : La distribution de taille des particules pour les poudres de Kaki, pêche et abricot, obtenue par granulométrie laser (Diffusion de la lumière).



Figure AI.2 : Etat de la poudre lyophilisée après extraction des caroténoïdes avec ASE conduite sous conditions optimales (persimmon, abricot, pêche).



Figure AI. 3 : Cellules d'extraction d'ASE en acier inoxydable de V= 22 mL

# ANNEXE II

Tableau A II. 1: Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for lutein with ($CO_2$+EtOH) extraction

| P (bar) | T (°C) | F (mL/min) | Time (min) | Ethanol, E (%) | Observed concentration (µg/g) | Predicted concentration (µg/g) | residue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 6,60 | 8,05 | 8,05 |
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 6,85 | 8,05 | 8,05 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 8,90 | 8,67 | 8,67 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 8,54 | 8,67 | 8,67 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 8,23 | 7,79 | 7,79 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 7,99 | 7,79 | 7,79 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 7,48 | 6,54 | 6,54 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 7,59 | 6,54 | 6,54 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,97 | 9,41 | 9,41 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,84 | 9,41 | 9,41 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 6,94 | 7,30 | 7,30 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 7,59 | 7,30 | 7,30 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 8,55 | 8,11 | 8,11 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 8,18 | 8,11 | 8,11 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 5,01 | 5,17 | 5,17 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 5,01 | 5,17 | 5,17 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 7,43 | 7,85 | 7,85 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 7,08 | 7,85 | 7,85 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 7,43 | 8,23 | 8,23 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 8,47 | 8,23 | 8,23 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | 10,96 | 8,30 | 8,30 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | excl | 8,30 | excl |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 10,61 | 8,89 | 8,89 |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 7,98 | 8,89 | 8,89 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 8,32 | 8,10 | 8,10 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 8,22 | 8,10 | 8,10 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 8,05 | 9,25 | 9,25 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,42 | 9,25 | 9,25 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 8,56 | 9,25 | 9,25 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 8,73 | 9,25 | 9,25 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 10,39 | 10,40 | 10,40 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 10,81 | 10,40 | 10,40 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 9,54 | 9,61 | 9,61 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 9,20 | 9,61 | 9,61 |
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 7,17 | 8,30 | 8,30 |
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 7,38 | 8,30 | 8,30 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 8,51 | 8,23 | 8,23 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 9,11 | 8,23 | 8,23 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 10,47 | 11,71 | 11,71 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 12,18 | 11,71 | 11,71 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 10,55 | 9,80 | 9,80 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 9,66 | 9,80 | 9,80 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 9,94 | 9,25 | 9,25 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 9,23 | 9,25 | 9,25 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 14,43 | 14,65 | 14,65 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 15,12 | 14,65 | 14,65 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 13,67 | 13,65 | 13,65 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 13,25 | 13,65 | 13,65 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 9,61 | 9,73 | 9,73 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 9,64 | 9,73 | 9,73 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 12,66 | 13,08 | 13,08 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 12,44 | 13,08 | 13,08 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 15,06 | 14,59 | 14,59 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 15,86 | 14,59 | 14,59 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 10,49 | 10,61 | 10,61 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 9,86 | 10,61 | 10,61 |

Table A II. 2 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for zeaxanthin with ($CO_2$+EtOH) extraction.

| P (bar) | T (°C) | F (mL/min) | Time (min) | Ethanol, E (%) | Observed concentration (µg/g) | Predicted concentration (µg/g) | Residue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 7,18 | 7,45 | -0,27 |
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 7,33 | 7,45 | -0,11 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 11,35 | 10,25 | 1,10 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 10,98 | 10,25 | 0,73 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 10,51 | 9,81 | 0,70 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 10,15 | 9,81 | 0,34 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 8,83 | 8,57 | 0,26 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 8,93 | 8,57 | 0,36 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,97 | 11,44 | -0,47 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 11,71 | 11,44 | 0,27 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 8,22 | 9,41 | -1,18 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 9,54 | 9,41 | 0,13 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 10,15 | 10,34 | -0,19 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 10,02 | 10,34 | -0,32 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 4,36 | 4,15 | 0,21 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 4,36 | 4,15 | 0,21 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 8,68 | 9,13 | -0,45 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 7,83 | 9,13 | -1,30 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 8,80 | 10,14 | -1,33 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 10,37 | 10,14 | 0,23 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | 12,57 | 9,51 | 3,05 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | excl | 9,51 | excl |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 11,96 | 10,68 | 1,28 |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 9,66 | 10,68 | -1,03 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 9,95 | 9,68 | 0,28 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 10,15 | 9,68 | 0,47 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,90 | 11,23 | -1,33 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 11,88 | 11,23 | 0,66 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,55 | 11,23 | -0,68 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,66 | 11,23 | -0,57 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 12,92 | 12,78 | 0,14 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 13,55 | 12,78 | 0,77 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 12,03 | 11,78 | 0,25 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 11,46 | 11,78 | -0,31 |
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 7,87 | 9,51 | -1,64 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 8,15 | 9,51 | -1,37 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 10,48 | 10,14 | 0,34 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 10,94 | 10,14 | 0,80 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 12,33 | 13,52 | -1,18 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 14,57 | 13,52 | 1,06 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 12,13 | 10,74 | 1,39 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 10,81 | 10,74 | 0,07 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 11,42 | 10,84 | 0,58 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 10,93 | 10,84 | 0,09 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 16,79 | 16,43 | 0,36 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 16,96 | 16,43 | 0,52 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 16,69 | 16,07 | 0,62 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 15,70 | 16,07 | -0,37 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 10,86 | 11,24 | -0,38 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 10,86 | 11,24 | -0,38 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 14,28 | 14,67 | -0,38 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 14,12 | 14,67 | -0,54 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 15,58 | 16,81 | -1,23 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 18,04 | 16,81 | 1,23 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 11,18 | 11,86 | -0,68 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 11,08 | 11,86 | -0,78 |

Table A II. 3 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for β-cryptoxanthinwith ($CO_2$+EtOH) extraction.

| P (bar) | T (°C) | F (mL/min) | Time (min) | Ethanol, E (%) | Observed concentration (µg/g) | Predicted concentration (µg/g) | Residue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 10,59 | 12,12 | -1,53 |
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 12,34 | 12,12 | 0,23 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 21,52 | 19,50 | 2,02 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 20,39 | 19,50 | 0,89 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 19,22 | 19,37 | -0,15 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 19,53 | 19,37 | 0,16 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 15,26 | 14,34 | 0,92 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 15,61 | 14,34 | 1,28 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 20,37 | 19,02 | 1,35 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 20,17 | 19,02 | 1,15 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 14,68 | 17,70 | -3,01 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 17,26 | 17,70 | -0,43 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 17,65 | 17,81 | -0,16 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 17,96 | 17,81 | 0,15 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 6,31 | 7,87 | -1,56 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 6,52 | 7,87 | -1,35 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 14,08 | 13,15 | 0,93 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 12,28 | 13,15 | -0,87 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 15,70 | 19,21 | -3,51 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 18,93 | 19,21 | -0,28 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | 21,65 | 15,43 | 6,23 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | excl | 15,43 | excl |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 20,64 | 19,21 | 1,43 |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 18,59 | 19,21 | -0,62 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 18,56 | 16,08 | 2,48 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 18,59 | 16,08 | 2,51 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 17,33 | 19,21 | -1,88 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 21,84 | 19,21 | 2,63 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 18,28 | 19,21 | -0,93 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 18,27 | 19,21 | -0,94 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 22,73 | 22,34 | 0,39 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 23,86 | 22,34 | 1,52 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 18,33 | 19,21 | -0,88 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 19,86 | 19,21 | 0,65 |
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 12,18 | 15,43 | -3,24 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 12,59 | 15,43 | -2,83 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 17,20 | 19,21 | -2,01 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 18,52 | 19,21 | -0,69 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 21,46 | 23,52 | -2,06 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 25,90 | 23,52 | 2,38 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 21,70 | 19,14 | 2,56 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 19,08 | 19,14 | -0,06 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 20,18 | 19,22 | 0,96 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 17,87 | 19,22 | -1,35 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 29,31 | 27,48 | 1,83 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 29,46 | 27,48 | 1,98 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 23,72 | 27,23 | -3,51 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 28,39 | 27,23 | 1,16 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 19,25 | 20,38 | -1,13 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 18,91 | 20,38 | -1,47 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 24,88 | 24,52 | 0,36 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 24,52 | 24,52 | 0,00 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 35,30 | 34,51 | 0,79 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 31,18 | 34,51 | -3,33 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 19,32 | 18,75 | 0,57 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 19,07 | 18,75 | 0,32 |

Table A II. 4 : Detailed experimental data of (RSM) design of experiment for β-carotene with ($CO_2$+EtOH) extraction

| P (bar) | T (°C) | F (mL/min) | Time (min) | Ethanol, E (%) | observed concentration (µg/g) | Predicted concentration (µg/g) | residue |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 6,78 | 7,20 | -0,43 |
| 100 | 40 | 1 | 30 | 5 | 7,49 | 7,20 | 0,29 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 11,45 | 11,54 | -0,08 |
| 100 | 40 | 1 | 110 | 25 | 10,78 | 11,54 | -0,75 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 9,76 | 9,39 | 0,38 |
| 100 | 40 | 3 | 30 | 25 | 9,50 | 9,39 | 0,11 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 7,93 | 7,88 | 0,04 |
| 100 | 40 | 3 | 110 | 5 | 8,16 | 7,88 | 0,28 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 8,94 | 9,11 | -0,18 |
| 100 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,06 | 9,11 | -0,05 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 7,45 | 7,81 | -0,36 |
| 100 | 60 | 1 | 30 | 25 | 8,07 | 7,81 | 0,26 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 8,81 | 8,41 | 0,40 |
| 100 | 60 | 1 | 110 | 5 | 8,71 | 8,41 | 0,30 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 6,53 | 6,48 | 0,05 |
| 100 | 60 | 3 | 30 | 5 | 6,19 | 6,48 | -0,29 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 7,02 | 6,87 | 0,14 |
| 100 | 60 | 3 | 110 | 25 | 6,75 | 6,87 | -0,12 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 9,28 | 9,65 | -0,38 |
| 200 | 40 | 2 | 70 | 15 | 10,40 | 9,65 | 0,74 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | 8,70 | 7,64 | 1,06 |
| 200 | 50 | 1 | 70 | 15 | excl | 7,64 | excl |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | 8,52 | 8,98 | -0,46 |
| 200 | 50 | 2 | 30 | 15 | excl | 8,98 | excl |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 9,85 | 9,38 | 0,47 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 5 | 9,59 | 9,38 | 0,21 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,12 | 9,23 | -0,12 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,56 | 9,23 | 1,33 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,35 | 9,23 | 0,11 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 15 | 9,18 | 9,23 | -0,05 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 10,36 | 10,79 | -0,42 |
| 200 | 50 | 2 | 70 | 25 | 10,74 | 10,79 | -0,05 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 8,82 | 9,48 | -0,66 |
| 200 | 50 | 2 | 110 | 15 | 9,30 | 9,48 | -0,19 |
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 6,84 | 7,28 | -0,44 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 50 | 3 | 70 | 15 | 6,87 | 7,28 | -0,41 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 8,23 | 8,81 | -0,58 |
| 200 | 60 | 2 | 70 | 15 | 8,64 | 8,81 | -0,17 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 8,77 | 9,57 | -0,79 |
| 300 | 40 | 1 | 30 | 25 | 9,81 | 9,57 | 0,24 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 8,86 | 8,79 | 0,07 |
| 300 | 40 | 1 | 110 | 5 | 8,14 | 8,79 | -0,65 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 8,46 | 8,28 | 0,18 |
| 300 | 40 | 3 | 30 | 5 | 7,88 | 8,28 | -0,40 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 10,49 | 10,09 | 0,40 |
| 300 | 40 | 3 | 110 | 25 | 10,54 | 10,09 | 0,46 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,20 | 10,06 | 0,14 |
| 300 | 50 | 2 | 70 | 15 | 10,35 | 10,06 | 0,29 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 8,40 | 8,19 | 0,21 |
| 300 | 60 | 1 | 30 | 5 | 8,14 | 8,19 | -0,05 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 9,47 | 9,31 | 0,16 |
| 300 | 60 | 1 | 110 | 25 | 9,43 | 9,31 | 0,12 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 10,13 | 10,42 | -0,29 |
| 300 | 60 | 3 | 30 | 25 | 11,01 | 10,42 | 0,59 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 8,18 | 8,49 | -0,32 |
| 300 | 60 | 3 | 110 | 5 | 8,13 | 8,49 | -0,37 |

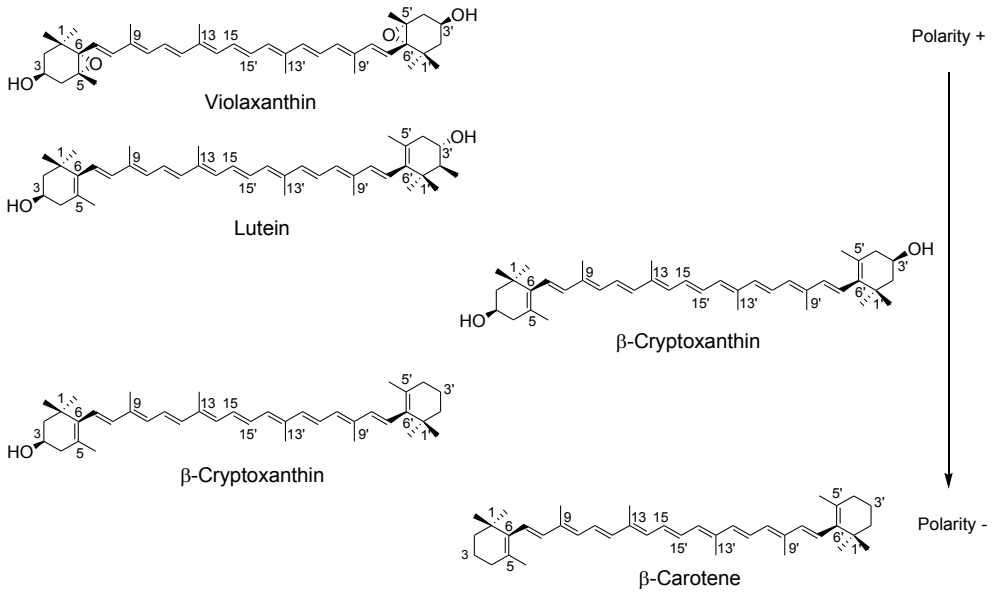



Figure A II.1 : Structures of the all-trans form of the 4 quantified carotenoids of the present study (lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthine, β-carotene). In trends, the polarity of oxygenated carotenoids that are xanthophylls increases with their number of hydroxyl and/or epoxy groups.

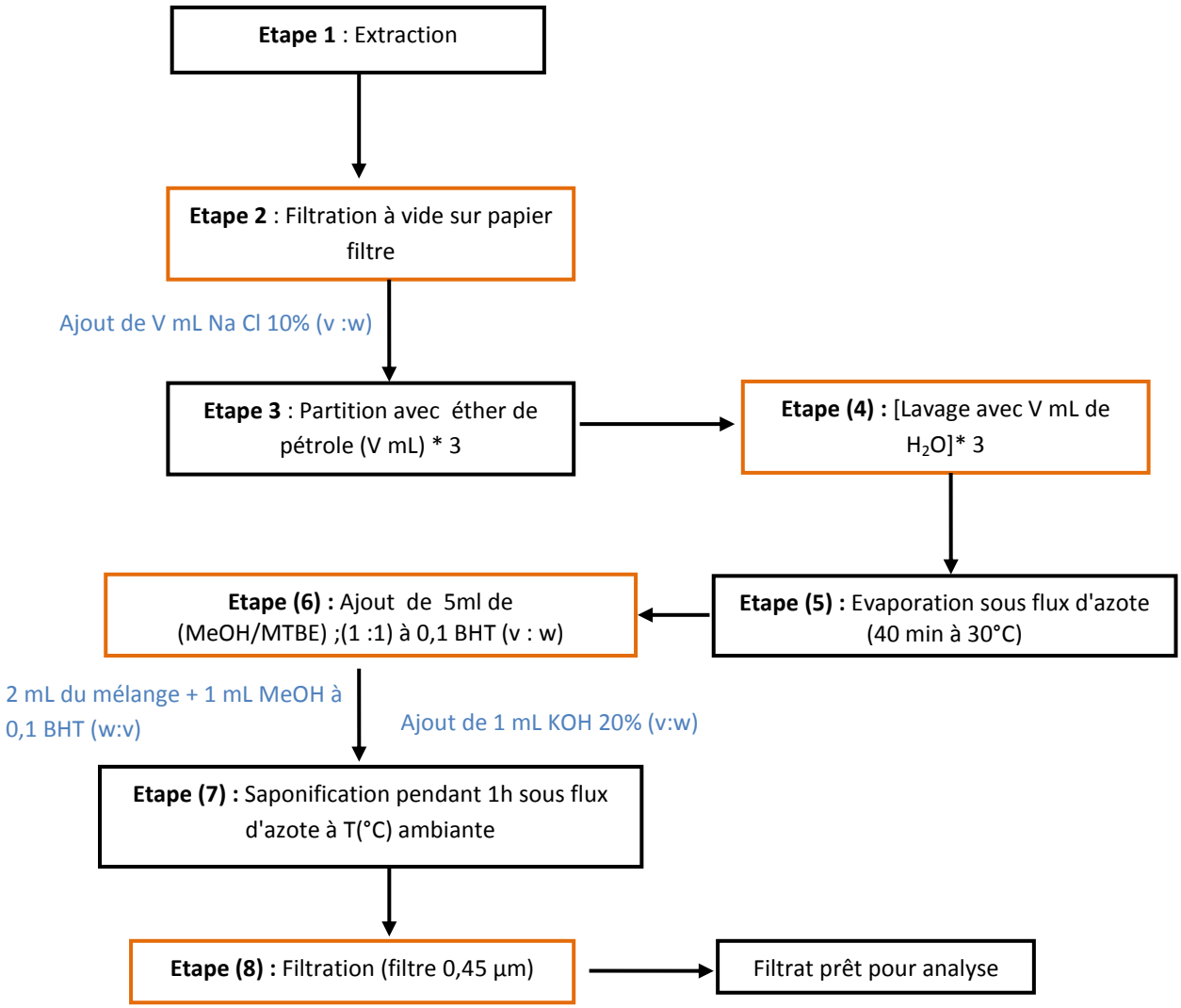



Figure AII.2 : Différents étapes de transformation d'un extrait des caroténoïdes avant analyse.

# ANNEXE III

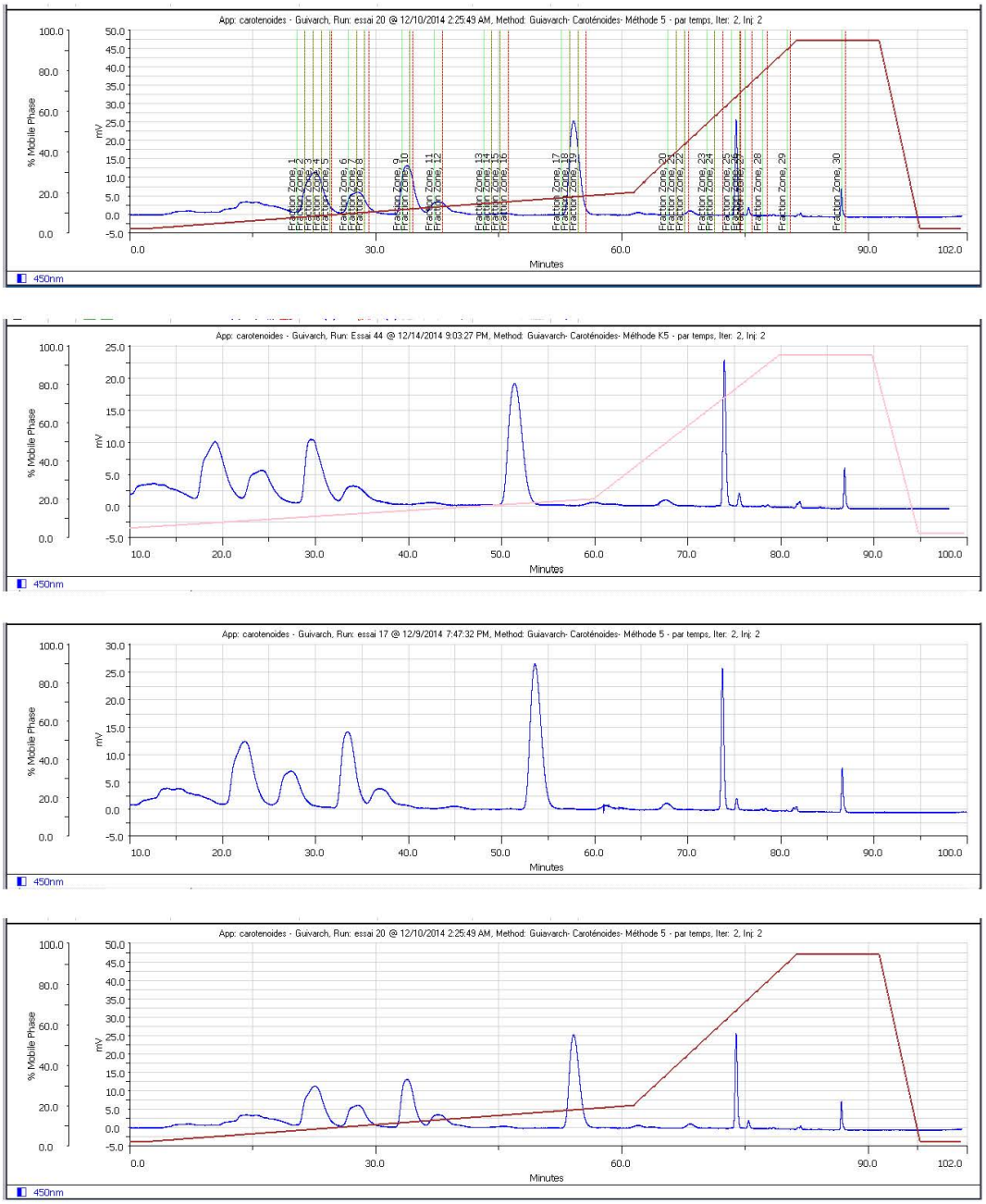



Figure AIII. 1 : Chromatogramme associés à la purification des caroténoïdes sur une colonne semi-préparative C30 YMC des extraits ASE pour le kaki.

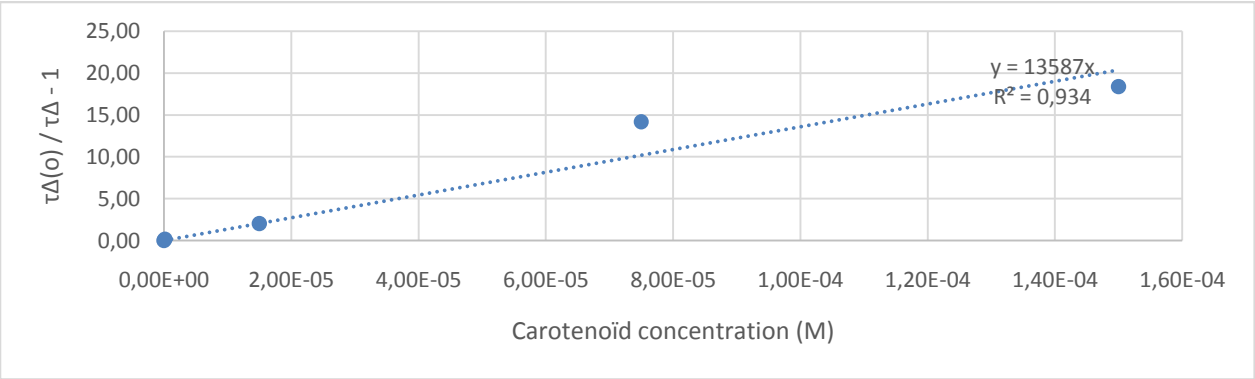



Figure A III.2 : Courbe de Stern-Volmer du β-carotène dans le toluène

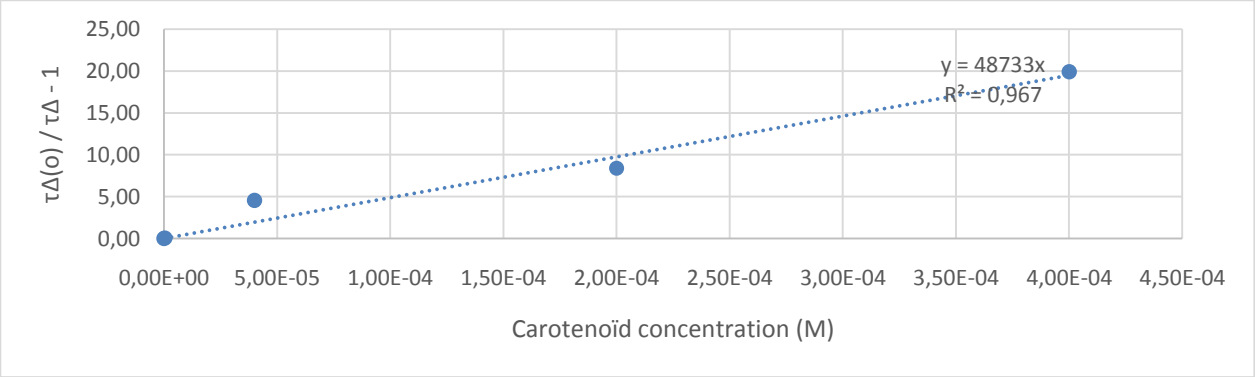



Figure A III.3 : Courbe de Stern-Volmer du β-carotène dans l'hexane.

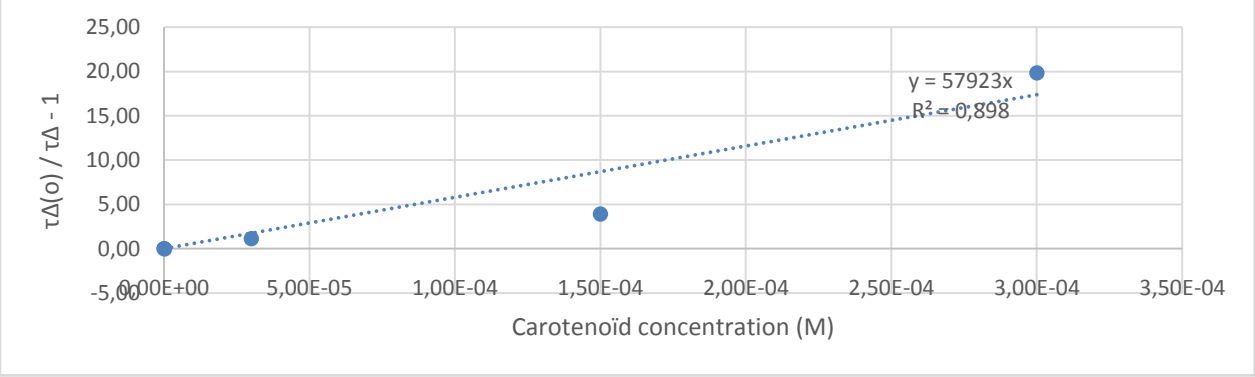



Figure A III. 4 : Courbe de Stern-Volmer du β-cryptoxanthine dans l'hexane.

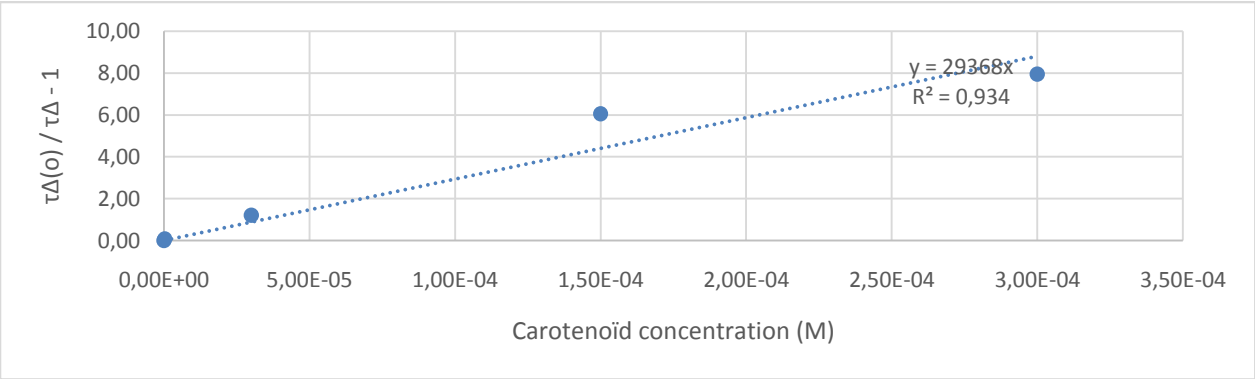



Figure A III. 5 : Courbe de Stern-Volmer de la lutéine dans l'hexane.

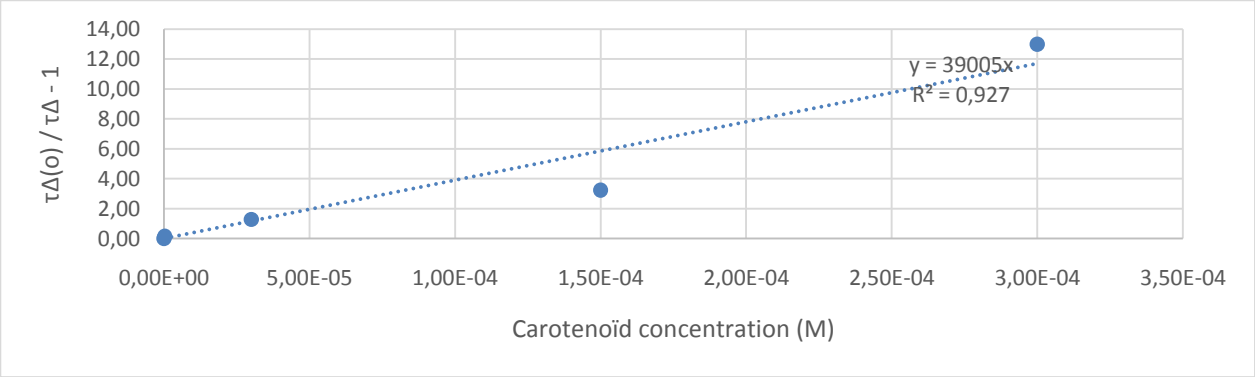



Figure A III. 6 : Courbe de Stern-Volmer du lycopène dans l'hexane

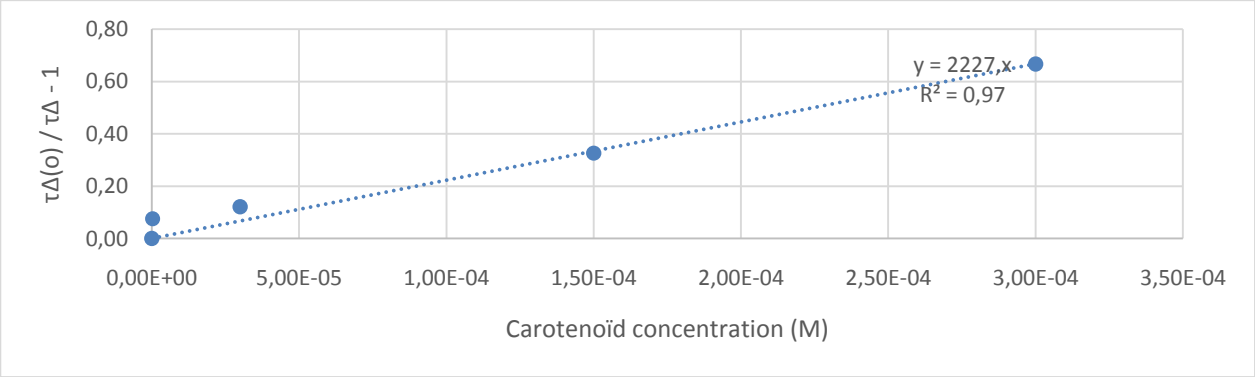



Figure A III. 7 : Courbe de Stern-Volmer du la zéaxanthine dans l'hexane.

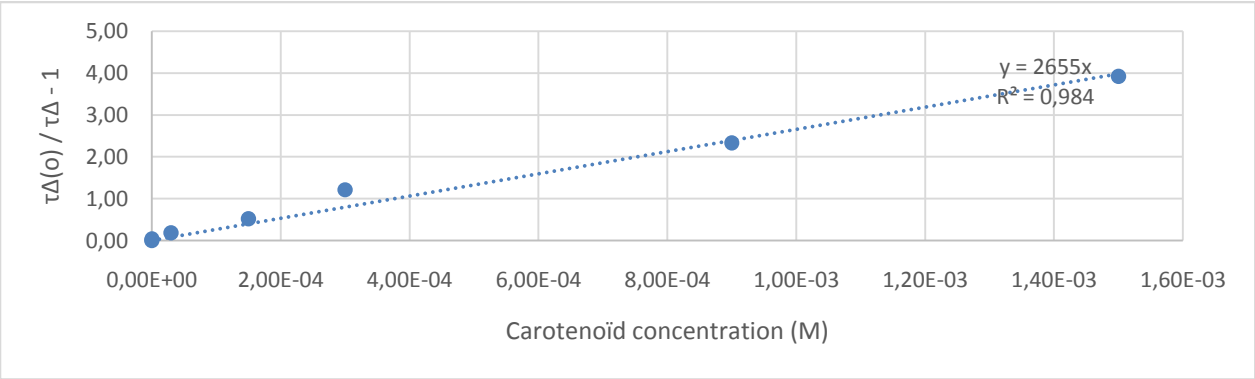



Figure A III. 8 : Courbe de Stern-Volmer du pic 4 dans l'hexane.

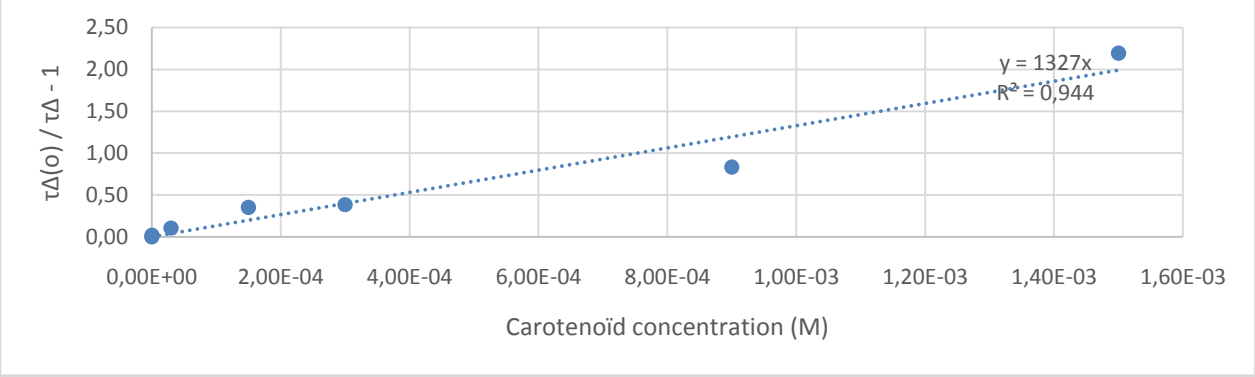



Figure AIII. 9 : Courbe de Stern-Volmer du 5,6-epoxy-α-carotenedans l'hexane.

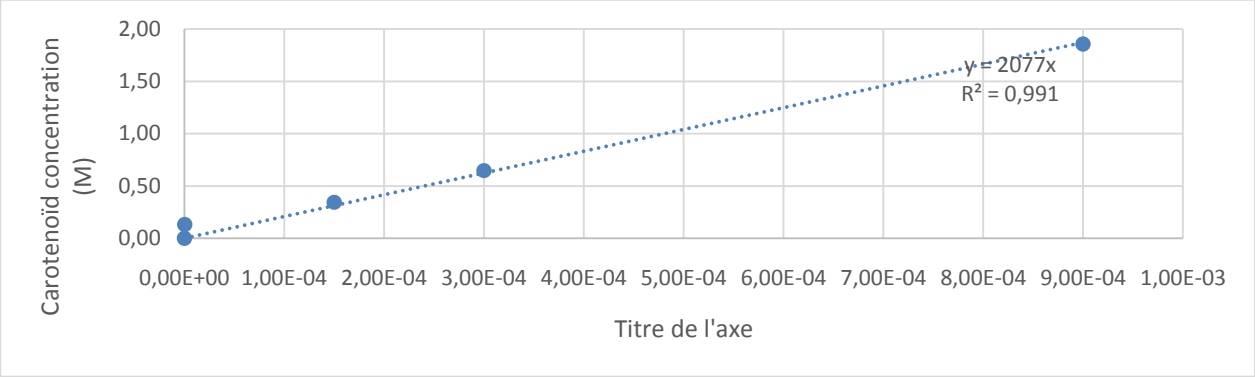



Figure AIII. 10 : Courbe de Stern-Volmer de la violaxanthinedans l'hexane.

## *Résumé*

La thérapie photodynamique (PDT) est une technique utilisée cliniquement pour traiter certaines maladies de la peau, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et certains types de cancer. Elle fait intervenir trois composants : une molécule photosensible ou photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène. Après administration du PS, celui-ci va se localiser plus ou moins sélectivement dans les zones tumorales où ilest alors activé par irradiation lumineuse à une longueur d'onde et une puissance données. Ceci engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) très réactives**,** dont l'oxygène singulet$^1O_2$, qui entraînent la destruction des tissus tumoraux par nécrose ou e .Afin d'améliorer la sélectivité du traitement, différentes pistes sont actuellement exploitées dont l'élaboration de « *photodynamic molecular beacons* » (PMB). Dans un PMB, le photosensibilisateur (PS) est associé *via* un peptide à un inhibiteur $^1O_2$, appelé quencher. Ce quencher inhibe la formation d'$^1O_2$ tant que le composé n'a pas atteint sa cible. Une fois la zone cancéreuse atteinte, des enzymes spécifiques clivent le peptide, libérant ainsi le PS qui retrouve alors sa capacité à former de l'$^1O_2$. Trouver un couple PS/quencher adéquat reste un challenge en PDT. Les propriétés photophysiques particulières des caroténoïdes et leur aptitude à inhiber la production d'$^1O_2$ font de ces derniers des quenchers potentiellement utilisables pour l'élaboration de PMBs. Chez les plantes, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) sont des pigments associés à la photosynthèse, qui ont deux rôles principaux : un rôle de collecteur de lumière et un rôle photoprotecteur en protégeant le(s) système(s) photosynthétique(s) contre les dommages photooxydatifs liés à une exposition trop intense à la lumière. Ceci s'opère, entre autre, *via* le cycle des xanthophylles. Cette aptitude à capter de l'énergie présente un intérêt potentiel à ne pas négliger dans la perspective de la conception de PMB utilisables en thérapie photodynamique.

Dans le cadre de cette thèse en co-tutelle avec la Faculté des Sciences de Bizerte nous avons ciblé les caroténoïdes présents dans trois fruits produits en Tunisie à savoir les persimmons (*Diospyros kaki* L.), les abricots (*Prunus armeniaca* L.) et les pêches (*Prunus persica* L.) connus pour leur richesse globale en ces pigments. Diversprocédés d'extractions ont été étudiés : (i) L'extraction de type Soxhlet par solvants organiques à pression atmosphérique, utilisée comme référence, (ii) l'extraction accélérée par solvant organique (*ASE : Accelerated solvent Extraction*) effectuée sous pression, enfin (iii) l'extraction par $CO_2$ supercritique avec l'éthanol comme cosolvant. Pour ces deux derniers procédés, une approche par plan d'expériences (surfaces de réponses) a été utilisée pour identifier les facteurs clé et les conditions optimales d'extractions de divers caroténoïdes (pression, température, débit, % de cosolvant, temps, nombre de cycles). L'analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-Visible et à la spectrométrie de masse a ensuite permis l'identification et la quantification des caroténoïdes présents dans les extraits obtenus, permettant ainsi de comparer les profils caroténoïdiques propres à chaque fruit et les performances de chaque procédé d'extraction. Cette étude ayant révélé un profil caroténoïdique particulièrement intéressant chez le persimmon par rapport aux autres fruits, une extraction et une purification des caroténoïdes de ce fruit par chromatographie liquide haute pression préparative a ensuite été effectuée afin de disposer d'une quantité suffisante de chaque caroténoïde, et parfois de leurs isomères conformationnels, en vue de l'étude de leurs propriétés photophysiques (absorption, émission de fluorescence, inhibition d'$^1O_2$) et de l'évaluation de leur intérêt potentiel en tant que quencher d'$^1O_2$ dans un édifice de type PMB.



**Mots clés :** thérapie photodynamique (PDT), cancer, fruits,caroténoïdes,photodynamicmoleculerbeacon (PMB), oxygène singulet, extraction par $CO_2$ supercritique, extraction accélérée par solvant organique sous pression, quenching, fluorescence.



## *Abstract*

Photodynamic therapy (PDT) is a clinically used technique for treating skin diseases, age-relatedmacular degeneration but mainly some types of cancer. PDT involves three components: a photosensitive molecule named photosensitizer (PS), light and oxygen. After administration of the PS, this one will be located more or less selectively in tumoral regions where it is activated by light irradiation at appropriate wavelength and power. This leads to the formation of highly reactive and cytotoxic reactive oxygen species (ROS), especially singlet oxygen, resulting in the destruction of the tumor by necrosis or apoptosis. To improve the treatment selectivity, different strategies are being exploited, one of which is the development of "photodynamic molecular beacons" (PMB). In PMB the photosensitizer is linked *via* a peptide to an inhibitor of $^1O_2$ (quencher). This quencher inhibits the formation of $^1O_2$ as long as the compound has not reached its target, namely cancer cells. In order to inhibit the toxicity of the PS in non-target cells and restore toxicity only close to the biological target, it is necessary to find an adequate PS/quencher couple. This remains a challenge for PDT. Carotenoids are interesting candidates due to their specific photophysical properties and ability to inhibit $^1O_2$, which makes them potential quenchers for building PMBs.

In plants, carotenoids (carotenes and xanthophylls) are pigments involved in the photosynthesis, in which they play two main roles: a light collecting role and a protecting role by preserving the photosynthetic systems against photoxydative damages induced by a too intense light exposure. This protection can for instance occur via the well-known xanthophylls cycle. This capacity to catch energy presents a potential interest that should not be neglected in the framework of the design of PMBs usable in photodynamic therapy. Within the framework as part of this PhD thesis in Cotutelle with the Faculty of Sciences of Bizerte, we focused on carotenoids from three fruits produced in Tunisia: persimmon (*Diospyros kaki* L.), apricot (*Prunus armeniaca* L.) and peache (*Prunus persica* L.), known for their global richness in these natural pigments. Three extraction processes were investigated: (i) the Soxhlet extraction based on the use of organic solvent at atmospheric pressure and used as reference, (ii) the accelerated solvent extraction (ASE) using organic solvent under high pressure, and (iii) the supercritical fluid extraction (SFE) using supercritical $CO_2$ and ethanol as cosolvent.

For these two last processes, a design of experiments (Surface Response Design) was used to identify the key factors and optimal extraction conditions of various carotenoids (pressure, temperature, flow, % cosolvent, time, number of cycles). Then, HPLC-PDA coupled with mass spectrometry (MS) enabled the identification and quantification of carotenoids from the extracts. Thus it was possible to compare the profiles in carotenoids content from each fruit as well as the performances of each extraction process. This study showed that the carotenoidic profile in the persimmon was the most interesting as compared to the profiles in the two other fruits. Extraction and purification of the carotenoids from persimmon by preparative high pressure liquid chromatography were then performed in order to have a sufficient amount of each carotenoid and sometimes of their conformational isomers. We finally performed a study of their photophysical properties (absorption, fluorescence emission, $^1O_2$ inhibition) in order to evaluate their potential as $^1O_2$ quencher in molecular construction such as a PMB.



**Keywords:** photodynamic therapy (PDT), cancer, fruits, carotenoids, photodynamic molecular beacon (PMB), singlet oxygen, quenching, fluorescence, accelerated solvent extraction (ASE), Supercritical Fluid Extraction (SFE),