



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA1

DEPARTEMENT DEBIOTECHNOLOGIE

Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales

## **MEMOIRE**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la nature et de la vie.

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

## **THEME**

**Mise en évidence des effets biologiques des composés  
phénoliques extraits des fruits du pommier,  
aux états frais et conservé**

**Présenté par**

Mme BELOUAD Dalya.

**Soutenu le 30 Juin 2018**

**Devant le jury composé de:**

Mme OUTTAR F.	MCB	USDB	Président
Mme BELGUENDOUZ R.	MCA	USDB	Examinatrice
Mme BENFKIH-ALLAL L.	Pr	USDB	Promotrice
Mme CHEBATA N.	MAA	USDB	Co-promotrice

Année universitaire 2017-2018

## **Dédicace**

Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour et de reconnaissance à ceux me sont chers :

A mes très chers et formidables parents pour leur éducation, leur patience et leur encouragement, ce qui m'a permis de réussir.

Je dédie également ce travail à mes adorables enfants Yanis et Malak ainsi qu'à mon cher mari qui ont été patients.

A mes chers frères : Mehdi, Soufiane et Abderahmane.

A mes grands-mères à qui je souhaite santé et longue vie.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines.

A mon amie Kherbouche Soumia.

## Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à Dieu et au concours des personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais en particulier adresser toute ma gratitude aux personnes suivantes qui m'ont encadré, orienté, aidé et conseillé :

**Madame le professeur BENFKIH-ALLAL L.**, ma promotrice qui m'a éclairé, guidé et précieusement dirigé pour la réalisation de ce mémoire.

**Madame CHEBATA N.**, ma co-promotrice de m'avoir conseillé, orienté et fourni des outils nécessaires à la réussite de ce travail.

**Madame OUTTAR F.**, pour l'honneur et l'amabilité d'avoir bien accepté de présider notre jury.

**Madame ARRAR K.**, de m'avoir soutenue, encouragée et orientée ainsi que d'avoir fait partie du jury en qualité d'examinatrice de ce travail.

**Madame BELGUENDOZ R.**, de m'avoir honoré en faisant partie du jury en qualité d'examinatrice de ce travail.

**Madame LARBI C.**, pour sa gentillesse et son aide par les moyens de laboratoire de biologie pour les analyses spectrométriques.

Je voudrais aussi exprimer mes remerciements au personnel de **l'Institut INRAA** notamment à mes collègues du laboratoire « Biotechnologie et Amélioration des Plantes » et du laboratoire de « Biotechnologie Alimentaire » de m'avoir ouvert leurs portes et fourni le matériel nécessaire à la réalisation des analyses.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à toutes celles et ceux qui ont apporté de près ou de loin leur concours et surtout pour leur confiance et leur support inestimable.

À tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

# Sommaire

	<b>Page</b>
<b>Introduction générale</b>	
<b>Chapitre I : Revue bibliographique</b>	
<b>1. La pomme.....</b>	<b>1</b>
1.1.Origines.....	1
1.2.Étymologie.....	1
1.3. Description du fruit.....	2
1.4. Culture.....	3
1.5. Production et consommation.....	4
1.5.1. Production mondiale : .....	4
1.5.2. Production en Algérie : .....	4
<b>2. Composition chimique.....</b>	<b>5</b>
2.1. Hydrates de carbone.....	5
2.2. Acides organiques.....	6
2.3. Vitamines.....	6
2.4. Oligoéléments.....	6
<b>3. Les Polyphénols de la pomme.....</b>	<b>7</b>
3.1. Classification des polyphénols de la pomme.....	8
3.1.1. Acides phénoliques.....	8
3.1.2. Flavonoïdes.....	9

	<b>Page</b>
3.1.2.1. Découverte des flavonoïdes.....	9
3.1.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes.....	9
3.1.2.3. Structure chimique et classification.....	10
➤ Flavan-3-ols.....	11
➤ Dihydrochalcones.....	13
➤ Flavonols.....	13
➤ Les Anthocyanes.....	14
3.2. Propriétés biologiques des polyphénols.....	15
3.2.1. Propriétés antioxydantes.....	15
3.3. Effet de la température de stockage sur les polyphénols et l'activité antioxydante.....	15
 <b>Chapitre II: Matériel et méthodes</b>	
<b>1. Matériels:.....</b>	<b>17</b>
1.1. Matériel végétal .....	17
1.2. Matériel non biologique .....	17
<b>2. Méthodes:.....</b>	<b>18</b>
2.1. Préparation des échantillons.....	18
2.2. Principe de lyophilisation.....	19
2.3. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes.....	19
2.3.1. Extraction des polyphénols totaux par décoction (extraction solide/liquide).....	20
2.3.2. Extraction des polyphénols totaux par macération dans l'éthanol aqueux (extraction solide/liquide) .....	20

	<b>Page</b>
2.4. Mise en évidence des différents composés phénoliques : .....	22
2.4.1. Mise en évidence des polyphénols totaux: .....	22
2.4.2. Mise en évidence des flavonoïdes (Réaction à la cyanidine) .....	22
2.4.3. Mise en évidence des tanins: .....	22
2.4.4. Mise en évidence des Anthocyanes: .....	23
2.5. Extraction des flavonoïdes (extraction liquide/liquide).....	23
2.5.1. Affrontement par l'éther de pétrole: .....	23
2.5.2. Extraction des différentes fractions flavoniques: .....	23
2.5.2.1. Affrontement par l'éther diéthylique .....	24
2.5.2.2. Affrontement par l'acétate d'éthyle.....	24
2.5.2.3. Affrontement par le n-butanol.....	26
2.6. Calcul des rendements des différentes fractions.....	26
2.7. Dosage des phénols totaux.....	26
2.8. Dosage des flavonoïdes.....	27
2.9. Mesure de l'activité antioxydante.....	28
2.10. Analyse des données.....	29
 <b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>	
<b>Résultats.....</b>	<b>30</b>
1. Effet de la lyophilisation sur le poids des pelures de pomme .....	30
2. Préparation des extraits polyphénoliques de pommes " <i>Golden Delicious</i> ".....	30
2.1. Par décoction .....	30

	<b>Page</b>
2.2. Par macération .....	31
3. Tests phyto-chimiques .....	31
3.1. Test phyto-chimique sur les macérats éthanoliques .....	31
3.2. Test phyto-chimique sur les solutions aqueuses .....	33
4. Détermination du rendement des solutions polyphénolique et flavonoïque.....	33
4.1. Rendement en polyphénols totaux .....	33
4.2. Rendement des différentes fractions flavoniques: .....	35
5. Dosage des polyphénols.....	36
6. Dosage des différentes fractions flavoniques.....	37
7. Activité antioxydante: .....	39
8. Analyse globale comparée des effets seuls et combinés des polyphénols totaux et des fractions.....	45
<b>Discussion.....</b>	<b>50</b>
Conclusion.....	<b>54</b>
Résumé	
Références bibliographiques	

## Liste des Figures

N°	Intitulé	Page
<b>Figure 1</b>	Variétés anciennes de pommes aux formes particulières.....	2
<b>Figure 2</b>	Coupe transversale de pomme.....	3
<b>Figure 3</b>	Production mondiale de la pomme (FAO - 2013) .....	4
<b>Figure 4</b>	Les acides hydroxycinnamique.....	7
<b>Figure 5</b>	Squelette carboné des flavonoïdes.....	9
<b>Figure 6</b>	Différentes structures de noyaux de flavonoïdes.....	9
<b>Figure 7</b>	Les catéchines.....	11
<b>Figure 8</b>	Les dihydrochalcones.....	11
<b>Figure 9</b>	Les flavonols.....	12
<b>Figure 10</b>	Noyau des anthocyanines.....	12
<b>Figure 11</b>	Variation de la couleur des anthocyanines avec le pH.....	13
<b>Figure 12</b>	Pomme <i>Golden Delicious</i> .....	15
<b>Figure 13</b>	A et B : Pelures de pomme lyophilisées et non lyophilisées conservée à 4°C et -20°C.....	16
<b>Figure 14</b>	Appareil de lyophilisation Alfa 1-2.....	17
<b>Figure 15</b>	Protocole d'extraction des polyphénols totaux (Hamia et al. ,2014)....	19
<b>Figure 16</b>	Extraction des flavonoïdes (extraction liquide/liquide) .....	24
<b>Figure 17</b>	Aspect de l'extrait phénolique après évaporation sous vide.....	32
<b>Figure 18</b>	Variation des rendements flavonoïques des pelures de pomme en relation avec la température de conservation et la lyophilisation.....	33

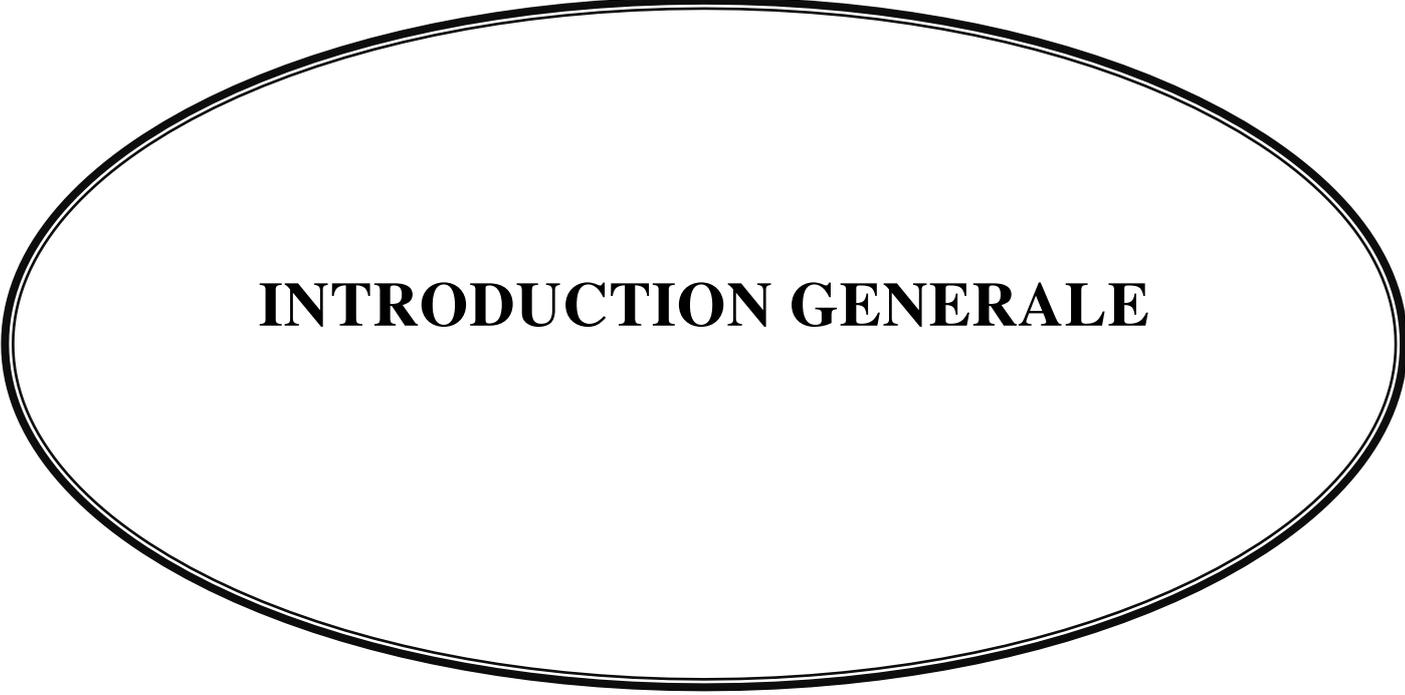
<b>Figure 19</b>	Représentation linéaire de l'acide gallique.....	34
<b>Figure 20</b>	Courbe étalon quercétine.....	35
<b>Figure 21</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des polyphénols totaux.....	37
<b>Figure 22</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante de l'acide ascorbique.....	38
<b>Figure 23</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavoniques de pelures de pomme conservées à -20°C lyophilisées .....	39
<b>Figure 24</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavoniques de pelures de pomme conservées à 4°C lyophilisées .....	40
<b>Figure 25</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavoniques de pelures de pomme conservées à -20°C non lyophilisées.....	41
<b>Figure 26</b>	Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavoniques de pelures de pomme conservées à 4°C non lyophilisées.....	42
<b>Figure 27</b>	Effets des facteurs physiques seuls sur l'inhibition de l'oxydation par les polyphénols totaux obtenus à partir des pelures de pomme.....	44
<b>Figure 28</b>	Effets des facteurs physiques combinés sur l'inhibition de l'oxydation par les extraits flavoniques obtenus à partir des pelures de pomme.....	45
<b>Figure 29</b>	Effets des facteurs physiques combinés sur l'inhibition de l'oxydation par les extraits flavoniques obtenus à partir des pelures de pomme.....	47

## Liste des Tableaux

N°	Titre du Tableau	Page
<b>Tableau 1</b>	Classement de l'Algérie dans la production mondiale de la pomme (FAO) .....	5
<b>Tableau 2</b>	Les différentes solutions obtenues après chaque extraction.....	19
<b>Tableau 3</b>	Poids des échantillons avant et après la lyophilisation.....	28
<b>Tableau 4</b>	Solution aqueuse obtenue par décoction .....	28
<b>Tableau 5</b>	Solution éthanolique obtenue par décoction.....	29
<b>Tableau 6</b>	Mise en évidence des composés phénoliques présents dans les solutions éthanoliques de pomme " <i>Golden Delicious</i> ".....	30
<b>Tableau 7</b>	Rendement en polyphénols totaux des différents extraits éthanoliques	32
<b>Tableau 8</b>	Concentration des polyphénols totaux de pelures de pomme.....	35
<b>Tableau 9</b>	Concentration des fractions flavonoïques de pelures de pomme.....	37
<b>Tableau 10</b>	IC50% des différents extraits polyphénoliques.....	39
<b>Tableau 11</b>	IC50% des différentes fractions flavonoïques.....	44
<b>Tableau 12</b>	Résultats polyphénoliques et flavonoïques pour analyses de variance	45

## Liste des abréviations

<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice de 50 % d'une activité
<b>Rdt</b>	Rendement
<b>Mv</b>	Matière végétale
<b>Mg EQ/g Mv</b>	Milligramme d'équivalent quercétine par gramme de matière végétale
<b>Mg EAG/g Mv</b>	Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme de matière végétale
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>PPO</b>	Polyphénol oxydase



# **INTRODUCTION GENERALE**

Depuis toujours la pomme est considérée comme un aliment aux vertus thérapeutiques. La pomme est l'un des fruits le plus consommé mondialement avec une production mondiale de 66 millions de tonnes (FAO 2010) et une production nationale de l'ordre de 124,1 qx/ha (MADR 2016).

La pomme est souvent mise en avant, notamment pour ses nombreux effets tels que la diminution du risque de cancer, des maladies cardiovasculaires, de l'asthme et du diabète grâce aux différents constituants entre autres les composés polyphénoliques qui sont considérés comme les molécules actives de la pomme (Boyer *et al.*, 2004). Ainsi de très nombreuses études épidémiologiques et scientifiques traitent des polyphénols de la pomme et leur impact sur la santé.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans tous les fruits et légumes. Ces métabolites interviennent également dans la couleur et dans le potentiel aromatique des fruits (Herrero *et al.* 1999; Song *et al.* 2007). Ces composés sont utilisés comme des agents préventifs anti-inflammatoire, antimicrobien, antiseptique, anticarcinogène, mais essentiellement antioxydants qui défendent contre le stress oxydant. (Bourgaud *et al.*, 2001; Kar, 2007).

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Powers *et al.*, 2010). Pour lutter contre les effets délétères de ces radicaux libres, notre organisme possède des systèmes de défense il y en a ceux qui sont endogènes impliquant des enzymes détoxifiantes (super oxydedismutase, glutathion peroxydase, catalase, etc.) et ceux qui sont exogènes obtenus à partir de notre alimentation (Pan *et al.*, 2008).

Pour cela notre travail a pour objectif de mettre en avant l'effet de la lyophilisation et de la température de conservation de la pomme sur l'activité antioxydante des composés phénoliques. L'efficacité de l'extraction qui est dépendante des conditions du processus et notamment des paramètres de température, du ratio liquide/solide, du débit de solvant, de la taille des particules et les solvants utilisés pour l'extraction des polyphénols sont divers : l'eau ou les mélanges aqueux, acidifiés ou non, l'éthanol, le méthanol, l'acétone, autres solvants organiques et/ou chlorés.

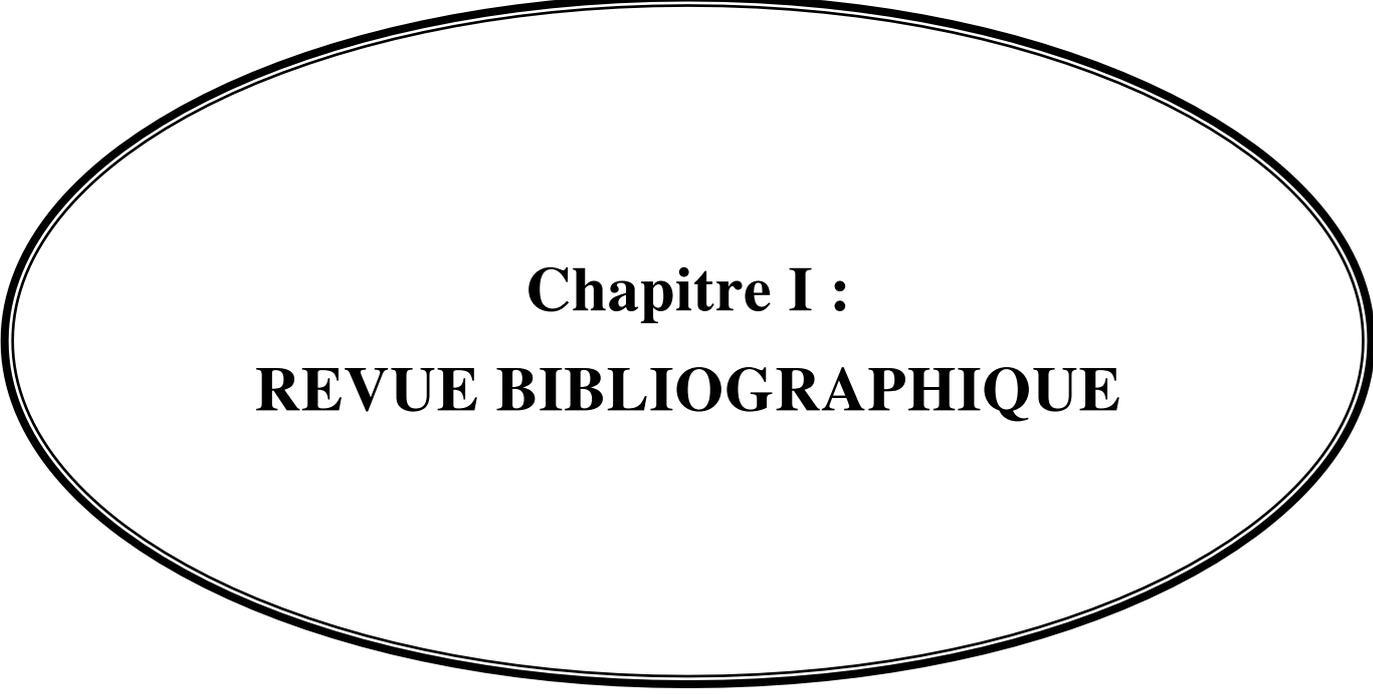
Les inconvénients liés à l'extraction par solvant sont des temps d'extraction souvent longs, la nécessité de grands volumes de solvant et l'utilisation de températures élevées qui tout en favorisant les cinétiques d'extraction peuvent néanmoins conduire à la décomposition des molécules actives (thermosensibles).

Ce document est concrétisé en trois parties: Une revue bibliographique décrivant la pomme, ses différents composés phénoliques et flavoniques ainsi que l'effet de la température sur ces composés.

La deuxième partie présente le matériel et la méthodologie d'étude moyennant les protocoles d'extraction des polyphénols totaux, des différentes fractions flavoniques, leurs dosages, leurs indices d'inhibition (activité antioxydante) ainsi que l'explication des paramètres de l'étude.

La troisième partie consiste à présenter les différents résultats obtenus et leurs interprétations.

Nous terminons enfin par une conclusion et des perspectives à cette contribution.



**Chapitre I :**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### 1. La pomme

#### 1. 1. Origines

Le pommier serait apparu il y a quatre-vingt millions d'années. L'homme du néolithique des plateaux d'Anatolie est ainsi le premier à apprécier son fruit (<http://www.lapomme.org/>).

Au VI<sup>e</sup> siècle av. J.-C., les Romains connaissaient 37 variétés de pommes, ce qui s'avère être considérable pour l'époque. Ils ont contribué à la propagation de la pomme en Angleterre ainsi qu'à travers le reste de l'Europe. Théophraste distinguait six variétés de pommes qu'il évoqua sous le terme flatteur de « beaux fruits » : « les agrestes ou sauvages, les printanières ou précoces, les sérotines ou tardives, les mélimèles ou douces, les épirotiques venues de l'Épire et enfin les urbaines ou cultivées ».

C'est au XIX<sup>e</sup> siècle que la pomme connaît un essor important et se multiplie sous forme de variétés toujours plus savoureuses et mieux adaptées à une large diffusion. Ce sont alors 527 variétés bien différenciées que le grand pépiniériste André Leroy décrit, à l'époque, dans son dictionnaire.

Fruit de nombreux croisements et évolutions, la pomme peut aujourd'hui se vanter d'exister sous des milliers de variétés réparties à travers le monde. Ce sont au total 11 324 variétés qui sont recensées aujourd'hui (<http://pomologie.com/pomme1/datapom/>), en prenant en compte les anciennes variétés comme les plus récentes qui portent encore des numéros dans des laboratoires expérimentaux. En ne considérant que les types domestica qui ont un intérêt pomologique et seulement les variétés qu'il est possible de se procurer auprès d'organismes officiels, ce nombre atteint tout de même 9 541 variétés.

#### 1.2. Étymologie

L'histoire des mots confirme que la pomme fut le premier fruit adopté par l'homme. Dans les langues romaines, germaniques et celtiques, c'est en effet presque toujours un terme désignant le fruit en général qui s'est progressivement imposé pour désigner la pomme.

Ainsi, en français le mot « pomme » provient du latin « *pomum* », c'est-à-dire le terme qui servait à désigner tous les fruits. En latin, la pomme est appelée « *malum* » (qui a donné *mela* en Italien ou *mar* en Roumain).

Le terme « *pomum* » a progressivement remplacé « *malum* » au sens de « pomme » dans le latin médiéval car la pomme demeurait le fruit par excellence. Il a néanmoins conservé un double sens très longtemps, en désignant à la fois la pomme *stricto sensu* et n'importe quel fruit plus ou moins rond ; pomme de grenade (qui en traversant la Manche, deviendra Pomegranate), pomme de terre, pomme de pin.

En dehors de l'Europe romane, la pomme avait un nom indo-européen, *abol*, qui a donné les formes germaniques *appel* en gotique, *appel* en vieux saxon et en Néerlandais, *apple* en Anglais et en Suédois, *apfel* en Allemand, *aeble* en Danois. En Celtique ancien, la pomme se disait *abalo* et le pommier *aballo* qui a donné en Gaulois *auallo* ou *avallo* (pommier), en vieil irlandais *aball* (pommier), en vieux gallois *afal* (pomme) et en breton *aval*(pomme). En Afrique francophone, le mot « pomme » désigne la pomme de terre. La pomme est quant à elle désignée sous le terme de « pomme-fruit » ou « pomme de France ».

### 1.3. Description du fruit

La pomme compte parmi les fruits de climat tempéré les plus répandus. C'est du point de vue botanique un péricarpe (c'est-à-dire un fruit portant une rosette sur le bas, et un pédoncule marqué). C'est un fruit arrondi, de forme quasi sphérique, de 10 à 15 cm de diamètre environ, et de couleur différente selon les variétés (Fig.1) et les conditions de végétation. Sa couleur à maturité s'étend du vert « pomme » au rouge plus ou moins foncé en passant par une grande diversité d'intermédiaires vert pâle, jaune, orangé ou de couleurs plus ou moins panachées (<http://tous-les-fruits.com/fruit-320.html>).



Pomme d'api



Pomme pigeonnet



Pomme bougie

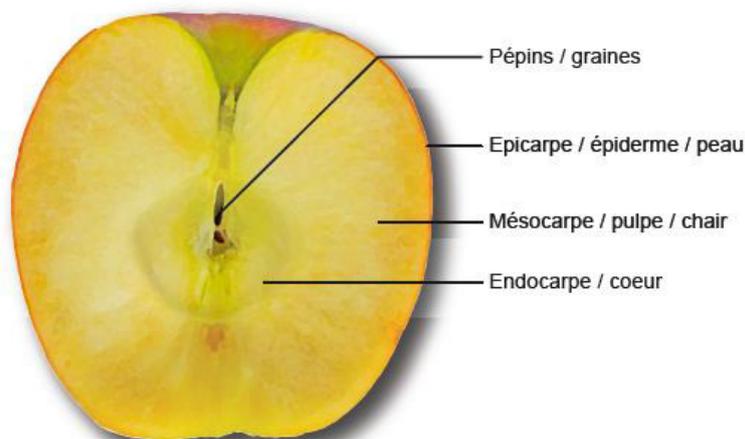
**Figure 1** : Variétés anciennes de pommes aux formes particulières

## 1.4. Culture

Le pommier, *Malus communis* est un arbre fruitier de la famille des Rosacées extrêmement répandu dans toutes les zones tempérées du monde. C'est un arbre à feuillage caduc pouvant atteindre plus d'une dizaine de mètres de hauteur, très résistant au froid, et qui a d'ailleurs besoin d'une période de froid hivernal suffisante pour démarrer et fleurir l'année suivante. Cependant, comme beaucoup d'arbres fruitiers des pays tempérés, c'est un arbre dont la floraison printanière de couleur blanche à blanc-rosé reste sensible aux gels printaniers, même légers (<http://www.croqueurs-de-pommes.asso.fr>).

*Malus communis* débute la phase de production à la fin du printemps. Le processus de reproduction commence par la pollinisation. Le grain de pollen fusionne avec le stigmate et développe un tube pour que le noyau mâle atteigne l'ovaire. A partir de ce moment, on distingue trois étapes qui vont aboutir à la formation du fruit (Baron et *al.*, 2007).

La première phase (phase de mérésis) correspond à la multiplication cellulaire, la diversification tissulaire et à l'accumulation des métabolites secondaires tels les polyphénols et les acides organiques. La deuxième phase (phase d'auxésis) correspond à l'expansion tissulaire caractérisée par l'arrêt progressif de la multiplication cellulaire au profit d'un grandissement cellulaire qui s'accompagne de l'accumulation des substances de réserves (amidon) et de la synthèse des composés pariétaux. La troisième phase correspond à la maturation. Des changements biochimiques (crise climatérique) vont donner au fruit ses caractéristiques organoleptiques (arôme, couleur, texture...). Le fruit devient mûr à 140 - 170 jours après la nouaison. A ce stade le fruit est divisé en trois zones: la peau, la chair et le cœur (Fig.2).

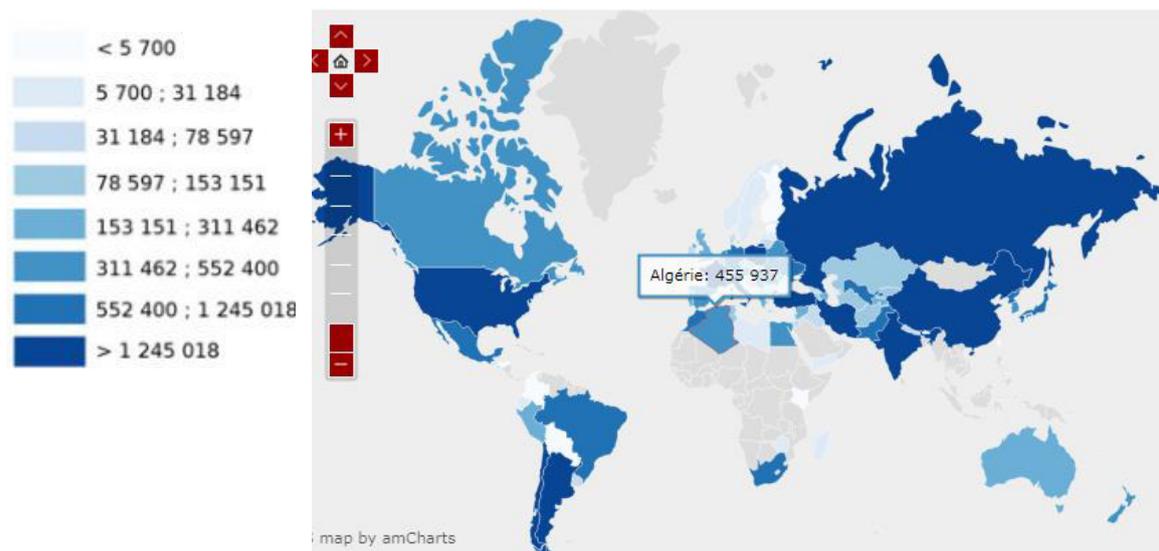


**Figure 2 :** Coupe transversale de pomme

## 1.5. Production et consommation

### 1.5.1. Production mondiale :

La production mondiale de pomme en 2007 a été évaluée à 66 millions de tonnes environ. La Chine et les États-Unis en sont les principaux producteurs (FAO, 2013). L'Union Européenne produit 15 millions de tonnes de pommes par an. La France est au sixième rang mondial avec une production de 2,43 millions de tonnes en 2007 (FAO, 2013) (Fig.3).



**Figure 3:** Production mondiale de la pomme (FAO - 2013)

### 1.5.2. Production en Algérie:

L'Algérie est classée au 27ème rang de la production mondiale de la pomme (Tableau 1).

Le rendement de la production nationale en 2016 (MADRE) a été estimé à 124,1 qx/ha, ce rendement est réparti sur le territoire national mis à part les régions du sud.

Les wilayas qui ont une grande production sont: Batna avec 900.000 qx; Blida avec 447.608 qx ; Médéa avec 268.688 qx et Djelfa avec 222 560 qx.

**Tableau 1:** Classement de l'Algérie dans la production mondiale de la pomme (FAO)

Classement <sup>▲</sup>	Pays	Données <sup>◆</sup>	Date de l'information <sup>◆</sup>
21	 Maroc	583046	2013
22	 Hongrie	552400	2013
23	 Espagne	546400	2013
24	 Egypte	546164	2013
25	 Corée du Sud	493701	2013
26	 Roumanie	493405	2013
27	 Algérie	455937	2013
28	 Nouvelle-Zélande	438952	2013

## 2. Composition chimique

En règle générale, les pommes à maturité se composent d'environ 85,00% d'eau, 12,00 - 14,00% de glucides, 0,30 – 1,00% d'acide organique, 0,30% de protéines, une quantité quasi négligeable de lipides (< 0,10%), des minéraux et des vitamines (Moreiras Tuni et *al.*, 2004).

La variation de composition biochimique est liée principalement à la variété, à la maturité et aux conditions agronomiques et pédo-climatiques.

### 2.1. Hydrates de carbone

En général, les hydrates de carbone sont classés en trois groupes : les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides. Les monosaccharides comprennent les pentoses (l'arabinose et la xylose) et les hexoses (glucose, fructose, rhamnose, fucose, mannose et galactose). Les monosaccharides principaux des pommes sont le glucose et le fructose. Les polysaccharides de la pomme comprennent l'amidon et ceux de la paroi cellulaire.

L'amidon (composé d'amylose et d'amylopectine, deux polymères de glucose) s'accumule pendant l'auxèse puis régresse.

Il est présent en très faible quantité ou totalement absent dans la pomme à maturité. Les polysaccharides pariétaux regroupent la cellulose, des hémicelluloses et des pectines.

Les fibres sont solubles ou non solubles dans l'eau. Le rôle des fibres dans la santé humaine est principalement de protéger contre la maladie, par exemple, les maladies du tractus gastro-intestinal, des maladies liées à la circulation et des maladies métaboliques (Saura-Calixto, 1987).

## **2.2. Acides organiques**

L'acide malique est l'acide organique le plus abondant (0,3-1,0 %) dans la pomme. Il est suivi par l'acide citrique (1000 fois moins abondant). La quantité d'acides organiques présente peut varier considérablement en raison de la variété, de la maturité, et des conditions environnementales durant la croissance et de stockage (Ackermann et *al.*, 1992).

## **2.3. Vitamines**

Dans la pomme, l'acide L-ascorbique (vitamine C) est essentiellement localisée au niveau de la peau et ne se trouve pas en abondance (4,6 mg/100 g de pomme). Il existe d'autres vitamines dont la nature et la teneur sont résumées dans le tableau 1.2. La vitamine C joue le rôle d'antioxydant. Un antioxydant est un composé qui, par réaction avec les radicaux libres générés par le métabolisme oxydatif en limite les effets néfastes. (Mohammad F. Turk, 2010).

## **2.4. Oligoéléments**

Les oligoéléments comme le fer (Fe), le cuivre (Cu) sont essentiels pour le fonctionnement de certaines enzymes. Par exemple, le cuivre est essentiel pour le fonctionnement de la polyphénol oxydase (PPO) qui est responsable de l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène. Le calcium (Ca) est un régulateur intracellulaire et un cofacteur (substance dont la présence est nécessaire en plus d'une enzyme pour qu'une certaine réaction se déroule) pour certaines enzymes. Le phosphore est un élément essentiel pour la cellule car il intervient dans la synthèse de l'ATP, de l'ADN et de l'ARN. Le magnésium (Mg) est connu pour intervenir dans au moins 300 réactions enzymatiques. Le potassium (K) est l'ion le plus abondant de la cellule.

Sa forte concentration intracellulaire est régulée par la membrane cellulaire par le biais de la pompe sodium-potassium. Le sodium est l'ion prédominant dans le milieu extracellulaire. (Mohammad F. Turk, 2010).

### **3. Les Polyphénols de la pomme**

Le terme « polyphénols » est devenu pour un grand nombre de personnes un mot sensationnel auquel sont associés de nombreux pouvoirs thérapeutiques. En effet, ce terme est utilisé à tort et à travers dans le langage courant mais aussi dans le monde scientifique.

Cependant, le terme « polyphénols » devrait normalement être réservé aux molécules comportant plusieurs fonctions phénols, ce qui exclut les composés mono-phénoliques pourtant très abondants chez les végétaux. On préférera donc utiliser le terme « composés phénoliques » qui regroupe toute molécule comportant au moins une fonction phénol.

On connaît actuellement plusieurs milliers de composés phénoliques d'origine végétale. Ils ont des structures très diverses mais présentent toujours au moins un cycle benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

De ce fait, on estime le nombre de composés phénoliques à plus d'un million car en plus de présenter plusieurs familles en fonction du noyau, on les retrouve toujours sous forme de glycosides dont la nature et le nombre de sucres peuvent varier.

Les composés phénoliques sont ainsi regroupés en plusieurs classes distinctes selon la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation, méthylation, etc.) et enfin selon les liaisons possibles de ce squelette de base à des molécules diverses et variées (glucides, lipides, protéines, etc.) (Macheix et *al.*, 2005); (Sakakibara et *al.*, 2003).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux. Bien que de nombreuses hypothèses aient été formulées, leur rôle physiologique reste assez obscur. Ils sont impliqués dans les mécanismes luttant contre le stress oxydatif, les radiations ultraviolettes, les infections par des microorganismes, etc. (De Rijke et *al.*, 2006).

Dans les cellules, ils sont localisés dans des vacuoles intracellulaires ou les parois cellulaires mais jamais dans le cytoplasme. Cette répartition a des conséquences sur leur analyse et leur extraction (Antolovich et *al.*, 2000).

Depuis une vingtaine d'années, l'identification et la quantification des composés phénoliques de la pomme se sont intensifiées suite à l'intérêt croissant que suscitent ces molécules. Par conséquent, la littérature fournit de très nombreuses données, mais leur comparaison reste difficile car les techniques de quantification varient énormément.

De plus, les paramètres agronomiques (variété, maturité, conditions de culture, etc.) ainsi que le matériel d'étude (fruit frais, pelures, cortex, pépins, jus commercial ou fait maison, trouble ou filtré) contribuent à la diversité des mesures.

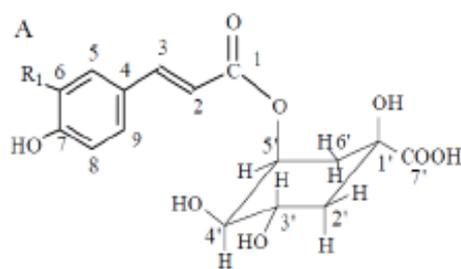
Les polyphénols de la pomme sont classés en deux grandes catégories : les acides phénols et les flavonoïdes.

### 3.1. Classification des polyphénols de la pomme

#### 3.1.1 Acides phénoliques

Appelés aussi acides hydroxycinnamiques ces derniers ne sont pas présents dans leur état «acide libre» dans les pommes, mais sous une forme estérifiée, le plus souvent par de l'acide quinique (Fig.4). L'acide caféoylquinique est l'acide hydroxycinnamique (5-CQA) le plus abondant dans la pomme.

En moindre concentration, la pomme contient également des quantités significatives d'acide 5'-para-coumaroylquinique (p-CQ). (Macheix et *al.*, 2005);



---

Acide hydroxycinnamique  
Acide 5'-*p*-coumaroylquinique  
Acide caféoylquinique

**Figure 4:** Les acides hydroxycinnamiques

### **3.1.2. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires appartenant à la famille des polyphénols largement répandue dans le règne végétal.

Elle compte à elle seule plusieurs milliers de molécules réparties en plus de 10 classes. En 2000, plus de 6400 structures étaient identifiées (Harborne JB *et al.*, 2000) (Lawson AM 2006). Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits (Ghestem et *al.*,2001).

On les trouve d'une manière très générale dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (Marfak, 2003 ; Hadi, 2004).

#### **3.1.2.1 Découverte des flavonoïdes**

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés et isolés à partir des milliers des espèces végétales (Forkmann et *al.*, 2001 ;Yanez et *al.*,2007).

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes, date de la découverte de la vitamine C à la suite des travaux de Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937) (Marfak, 2003), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron riche en vitamine C et des flavonoïdes (Marfak, 2003 ; Hadi, 2004).

Alors que l'acide ascorbique seul est inefficace, les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonique (Hadi, 2004). Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique p (p étant la première lettre du mot perméabilité) (Marfak, 2003 ; Hadi, 2004).

#### **3.1.2.2 Biosynthèse des flavonoïdes**

En général, tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune.

Leur structure 1,3-diphénylpropane à 15 carbones résulte de la condensation de 3 unités C2 (3 malonyl-CoA), qui forment le noyau A, et d'un acide cinnamique activé, qui forme le noyau B et la chaîne propanique.

Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase, enzyme clé de la formation des flavonoïdes qui conduit au précurseur « chalcone » (Lawson AM 2006).

Selon (Lister et al;1998), les enzymes participant à la synthèse des flavonoïdes sont classées en trois catégories:

- A. les enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs telles que la phénylalanine ammonialyase (PAL);
- B. les enzymes impliquées dans la synthèse des différentes classes de flavonoïdes telles que la chalcone isomérase (CHI);
- C. les enzymes responsables des modifications des flavonoïdes telles que la glycosyltransférase(UFGT).

La PAL catalyse la réaction de déamination de la L-phénylalanine formant l'acide transcinnamique et l'ammoniac. Cet acide trans-cinnamique est ensuite modifié en acide p-coumaroyl- CoA, précurseur des flavonoïdes.

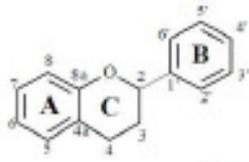
L'étape centrale de la synthèse des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec une molécule d'acide p-coumaroyl-CoA qui résulte en une chalcone intermédiaire à 15 carbones appelée naringenin-chalcone (retrouvée notamment dans les tomates (Arabbi et *al.*,2004). Cette réaction est catalysée par la chalcone synthétase (CHS).

Une transformation par l'action stéréospécifique de la chalcone isomérase (CHI) produit la (2S)-flavanone (naringenin).

Cette réaction est commune à toutes les voies de synthèse des flavonoïdes. Enfin, la glucosyltransférase catalyse la réaction de glycosylation sur le cycle B.

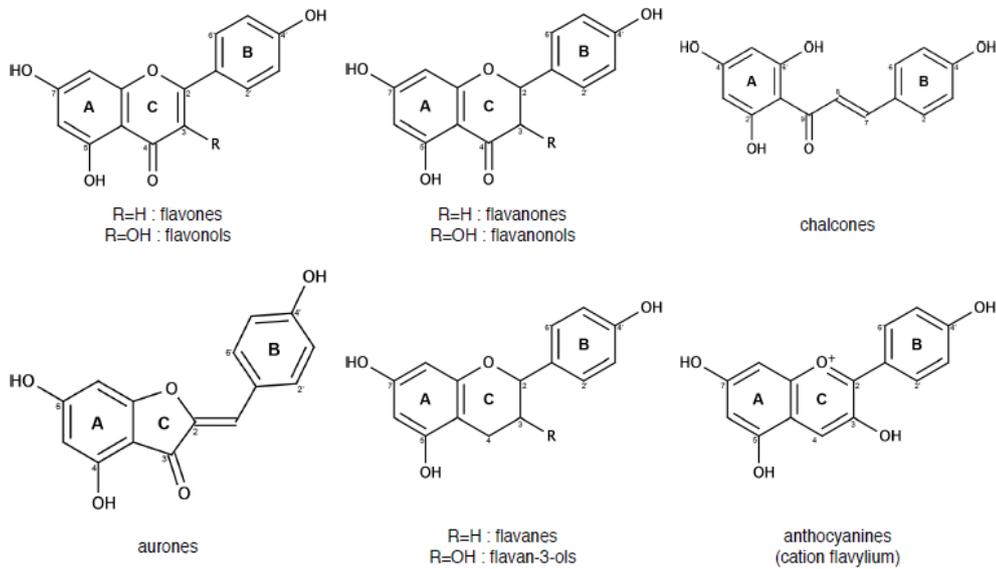
### **3.1.2.3. Structure chimique et classification**

Le terme flavonoïde regroupe une large gamme de composés naturels polyphénoliques présentant un squelette carboné commun en C6-C3-C6 (squelette diphenylpropane). Les deux cycles aromatiques définissent les noyaux A et B. L'hétérocycle central, quand il est présent, est nommé C (Fig.5).



**Figure 5:** Squelette carboné des flavonoïdes

On distingue différents noyaux qui permettent de les classer (Fig.6) : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, chalcones, etc. (Lawson 2006, Stéphane 2005;Hertog et al., 1992).



**Figure 6:** Différentes structures de noyaux de flavonoïdes

Trois familles de flavonoïdes, basées sur leur niveau d'oxydation différent du cycle C, sont représentées dans la pomme: les flavan-3-ols comprenant les formes monomères (catéchines) et les formes polymères (proanthocyanidines ou tanins condensés), les dihydrochalcones et les flavonol.

### ➤ Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols constituent la seule classe de flavonoïdes présente dans les végétaux sous leur forme aglycone. Le squelette de l'unité de base est représenté par le noyau flavane. C'est une famille très vaste (11 sous-classes). On distingue les formes monomères de flavan-3-ols et polymères ou pro anthocyanidines.

Les flavan-3-ols monomères (Fig.7) constituent la seconde grande classe de polyphénols dans les pommes de table après les acides hydroxycinnamiques.

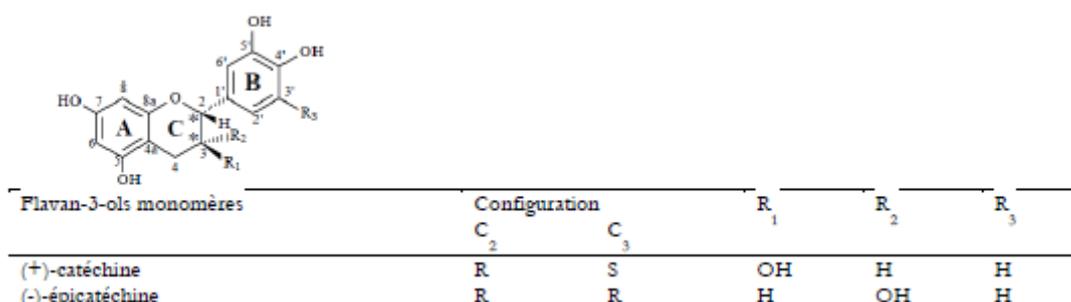
Ils sont représentés uniquement par la (+)-catéchine (CAT) et la (-)-épicatéchine (EC), cette dernière étant toujours largement prédominante dans les pommes (Escarpa et *al.*, 1998 ; Guyot et *al.*, 1998 ; Podsedek et *al.*, 2000).

Les flavan-3-ols polymères ou pro anthocyanidines sont classées en plusieurs sous-classes. Ces produits de condensation sont aussi parfois appelés tanins condensés.

Dans la pomme, la seule sous-classe des procyanidines est constituée d'unités (+)-catéchine et/ou (-)-épicatéchine (Fulcrand *et al.*, 1998 ; Guyot et *al.*, 1998 ; Sanoner et *al.*, 1998). Le nombre d'unités catéchines constituant les proanthocyanidines est appelé degré de polymérisation (DP). Un mélange de proanthocyanidines contenant une distribution de molécules avec des DP différents est caractérisé par son degré moyen de polymérisation (DPn).

D'après la littérature, la pomme contient principalement des procyanidines oligomères. Des dimères et des trimères ont ainsi été isolés de la pomme par chromatographie (Escarpa et *al.*, 1998 ; Foo et *al.*, 1999 ; Podsedek *et al.*, 2000).

L'analyse des produits de dépolymérisation par hydrolyse acide des procyanidines de la pomme (Guyot et *al.*, 1998) montre l'existence de DPn qui varie.



**Figure 7:** Les catéchines

### ➤ Dihydrochalcones

Les dihydrochalcones constituent une classe de flavonoïdes spécifique des pommes. L'aglycone des dihydrochalcones est la phlorétine que l'on retrouve uniquement sous formehétérosidique dans la pomme (Fig.8): La phloridzine (PLZ ; glucoside de phlorétine)

et le xyloglucoside de phlorétine (XPLT) sont les glycosides les plus largement décrits dans la littérature (Amiot *et al.*, 1992 ; Lu *et al.*, 1997 ; Guyot *et al.*, 1998 ; Podsedek *et al.*, 2000). Cette famille est particulièrement concentrée dans les pépins. Elles peuvent ainsi y représenter plus de 3 g/kg, soit 66 % des composés phénoliques présents (Guyot *et al.*, 1998).



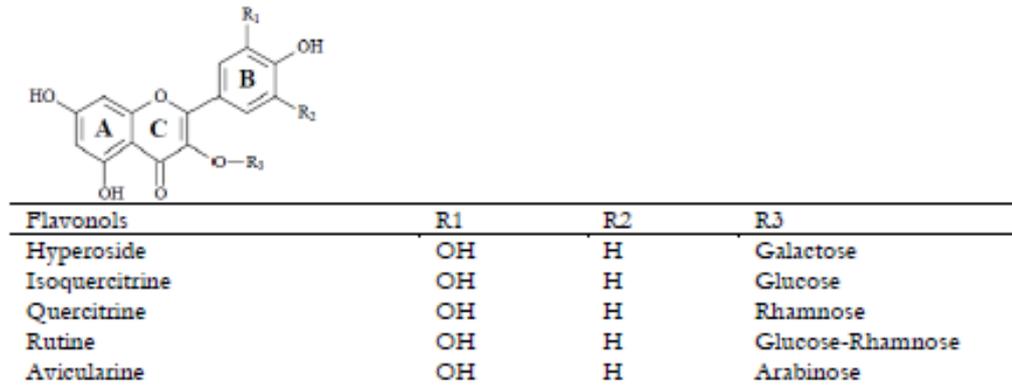
**Figure 8:** Les dihydrochalcones

### ➤ Flavonols

Les flavonols sont des flavonoïdes qui possèdent une double liaison entre les carbones 2 et 3, une fonction hydroxyle en position 3 et une fonction cétone en position 4 (Fig. 9). Ils se différencient des flavones qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle. Il ne faut pas non plus les confondre avec les flavanonols qui présentent une liaison saturée entre les carbones 2 et 3 de ce même cycle C.

Les flavonols sont très répandus dans les fruits de nombreuses espèces végétales (Macheix *et al.*, 1990). Ils sont en partie responsables de la couleur jaune de l'épiderme de certaines variétés de pommes (Teuber *et al.*, 1978).

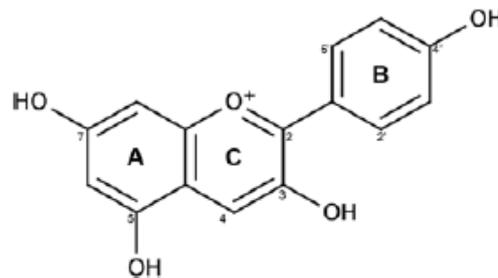
Ils existent essentiellement sous forme glycosylés (Fig. 9). Dans la pomme, ce sont les dérivés 3-O-glycosylés du quercétol prenant les noms indiqués entre parenthèse lorsqu'ils sont associés aux sucres suivants: galactose (HYP; hyperoside), glucose (iQCI ; isoquercitrine), rhamnose (QCI ; quercitrine), xylose (REY ; reynoutrine), arabinose (AVI ; avicularine) et rutinose (RUT ; rutine) (Teuber *et al.*, 1978 ; Oleszek *et al.*, 1988).



**Figure 9:** Les flavonols

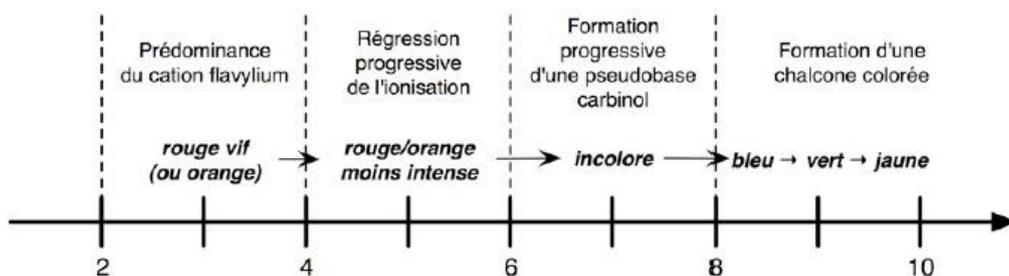
### ➤ Les Anthocyanes

Les anthocyanines, ou anthocyanes, sont des flavonoïdes dont le cycle C est entièrement conjugué et possède une fonction hydroxyle en position 3 (Fig.10).



**Figure 10:** Noyau des anthocyanines

Le noyau des anthocyanines est responsable de la coloration de la majorité des fruits dans lesquels seuls des glycosides sont présents et sont appelés anthocyanidines. On en trouve de couleur orange, rouge, violet et même bleu. La couleur d'une même molécule peut varier selon le pH qui en modifie la conformation (Fig.11) (Sadilova 2007) (Macheix 2005).



**Figure 11 :** Variation de la couleur des anthocyanines avec le pH (Macheix et *al.*, 2005)

## **3.2. Propriétés biologiques des polyphénols**

### **3.2.1. Propriétés antioxydantes**

Les propriétés antioxydantes associées à une plante sont généralement liées à la présence de composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Le principe de l'activité antioxydante est basé sur la disponibilité des électrons à neutraliser les radicaux libres. La plupart des fruits ont une capacité antioxydante (Wang 1996) et notamment une capacité à inhiber les radicaux libres (Omata et *al.*, 2010, Ojeil et *al.*,2010).

Les pommes ont la deuxième plus forte activité antioxydante derrière les canneberges (cranberries). Cette activité est due aux composés phénoliques qui sont de puissants antioxydants. Cet effet est souvent considéré comme la cause majeure de leurs bénéfices.

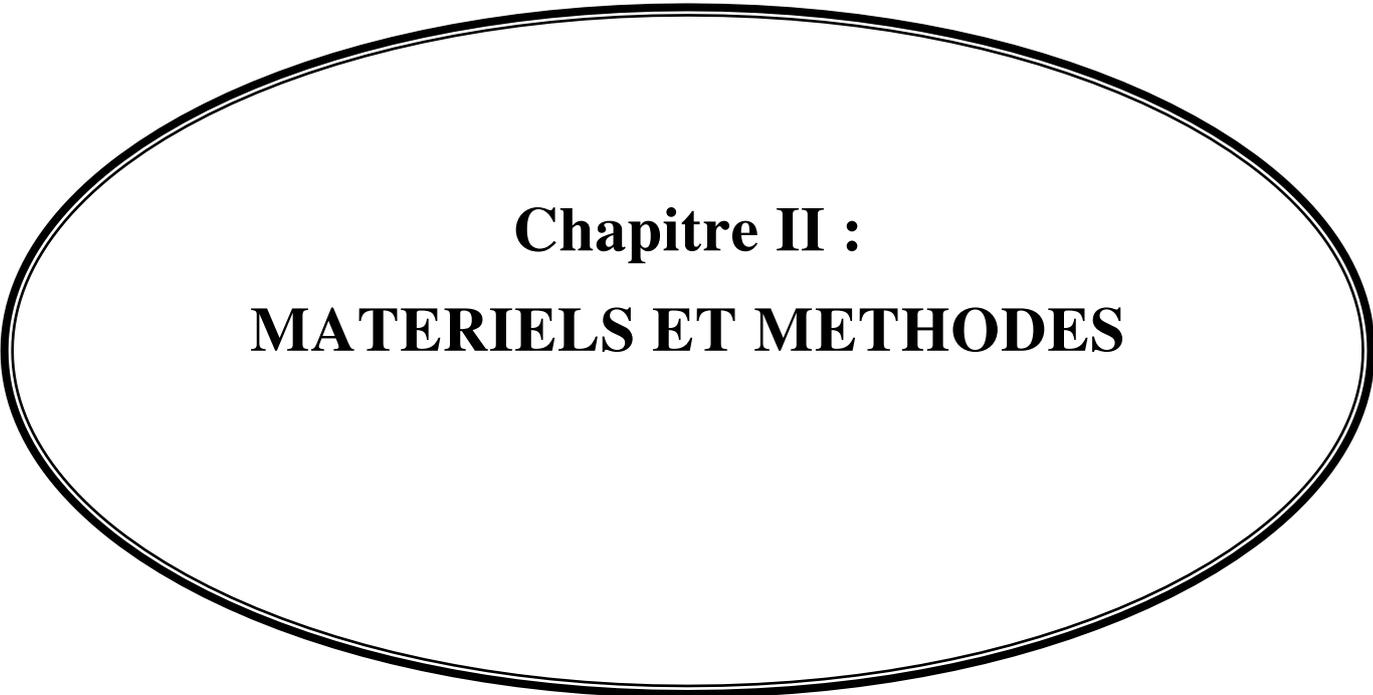
En effet, les maladies cardiovasculaires et le cancer sont tous deux considérés comme étant le résultat d'un stress oxydatif (Boyer et *al.*, 2004). Les polyphénols possèdent d'autres propriétés biologiques :

- Propriétés antibactériennes
- Propriétés antifongique
- Propriétés anti-inflammatoires

### **3.3. Effet de la température de stockage sur les polyphénols et l'activité antioxydante**

Il est bien connu que le stockage des fruits et des légumes à basse température à 4°C, après la récolte jusqu'à la consommation est un moyen efficace pour préserver la qualité et la valeur nutritionnelle, y compris pour des stockages prolongés de 4 à 12 mois (Golding et *al.*,2001, MacLean et *al.*, 2006, Van der Sluis et *al.*, 2001), car les activités anti-oxydantes ainsi que le taux en polyphénols augmentent pendant le premier mois de stockage puis déclinent par la suite. Ceci a été déterminé par (Sacchetti et *al.*, 2008) en comparant sept variétés de pommes fraîches ou en purée.

D'autre part, les polyphénols sont stables lors de la congélation. Il n'y a pas de pertes en polyphénols totaux ni à la congélation ni durant le stockage de jus de framboise (De Ancosetal.,2000). Un stockage à -15 °C n'affecte pas non plus la capacité anti-oxydante de fruits tels que les pommes, les fraises, les poires et les figes sur 90 jours (Jeusti Bof et *al.*,2012).



**Chapitre II :**  
**MATERIELS ET METHODES**

**1. Matériels:**

**1.1. Matériel végétal:**

Le matériel végétal choisi est la pomme *Golden Delicious*, un cultivar de pommier domestique. Cette pomme de table, de couleur jaune-vert clair (Fig.12) en provenance de l'ITAF (Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne). Ces dernières ont été conservées à deux températures différentes, un lot a été conservé à -20°C et l'autre à 4°C et ces 2 lots ont été partagés en deux ; une partie a subi une lyophilisation et l'autre non.



**Figure 12:** Pomme *Golden Delicious*

**1.2. Matériel non biologique:**

• **Les produits chimiques:**

Produits	Firme
• Ethanol	• Sigma -aldriche
• Methanol	• Sigma -aldriche
• Acetatediethyl	• Biochem
• Ether de pétrole	• Biochem
• N butanole	• Biochem
• Diethylether	• Biochem

- **Appareils de laboratoire:**

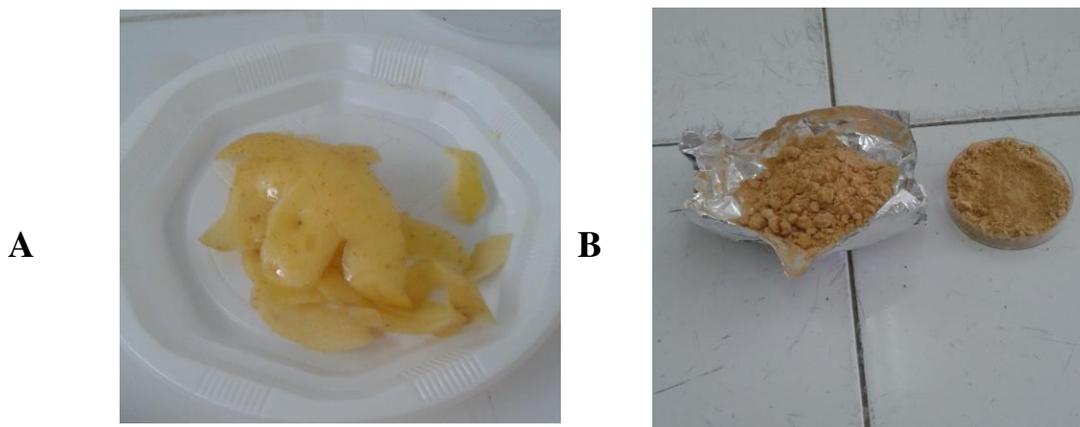
Matériels	Marque
<ul style="list-style-type: none"><li>• Lyophilisateur</li><li>• Rota vapeur</li><li>• Spectrophotomètre</li><li>• Moulin à café</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Christ Alpha 1-2</li><li>• BuchiR-210</li><li>• ChimadzuUV-1601</li><li>• Moulinex</li></ul>

## 2. Méthodes:

### 2.1. Préparation des échantillons

La récolte de pomme *Golden Delicious* a été faite au début de l'hiver au sein de l'ITAF. A leur arrivée les pommes avaient un poids initial de 04 Kg avec une moyenne de  $173 \pm 20\text{g}$  chacune; ces dernières ont été lavées puis divisées en 2 lots : l'un stocké en chambre froide à  $4^{\circ}\text{C}$ , afin d'éviter que les pommes ne flétrissent en se déshydratant et l'autre lot stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 4 mois.

Ensuite chaque lot de pomme a été épluché à l'aide d'un économe. Les écorces de chaque lot ont été divisées en deux : une partie a été lyophilisée et l'autre non. Les écorces lyophilisées sont broyées dans un moulin à café (Moulinex, France) pour obtenir une poudre (Fig. 13).

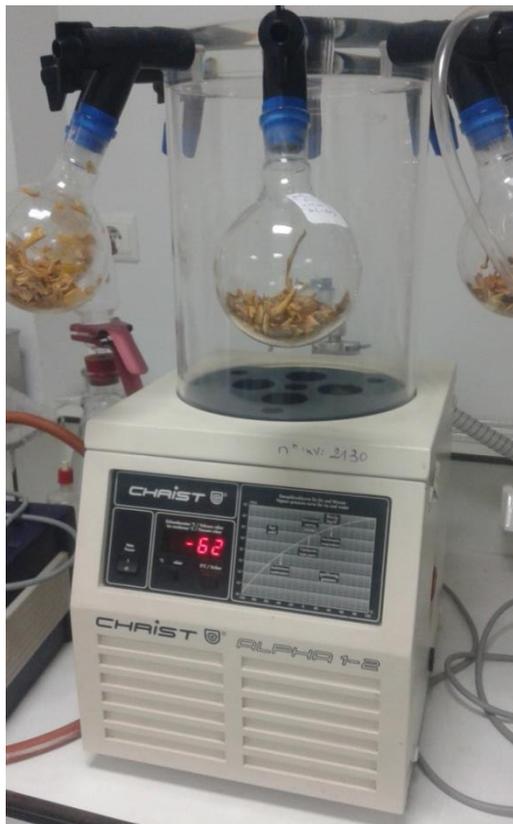


**Figure 13** : A: Pelure de pomme non lyophilisée conservée à  $4$  et  $-20^{\circ}$

B: Pelure lyophilisée conservée à  $4$  et  $-20^{\circ}$

## 2.2. Principe de la lyophilisation

La lyophilisation consiste à extraire l'eau contenue dans les substances organiques ou minérales par interaction des techniques du vide et du froid. Le produit, préalablement congelé à basse température, est placé dans une enceinte sous vide (Fig.14). L'abaissement de la pression au deçà du point d'équilibre (point triple) sur la courbe de tension de vapeur de l'eau entraîne une sublimation de la glace, c'est-à-dire que l'eau à l'état de glace s'élimine sous forme de vapeur sans passer par l'état liquide (Franks 1998).



**Figure 14 :** Appareil de lyophilisation Alfa 1-2

## 2.3. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir des écorces de pommes non lyophilisées et des écorces lyophilisées (poudre) ; dans les deux cas les pommes ont été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et à  $4^{\circ}\text{C}$  par deux méthodes différentes :

- Extraction par macération dans le méthanol aqueux,
- Extraction avec de l'eau chaude (Décoction). Cette méthode d'extraction est préconisée en médecine traditionnelle.

### **2.3.1. Extraction des polyphénols totaux par décoction**

#### **Principe**

La décoction (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale dans l'eau bouillante pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes).

La méthode d'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par KON KON et *al.* (2006) avec quelques modifications. Le mode opératoire suivi a été comme suite :

#### **Mode opératoire**

A 10g du matériel végétal de chaque lot sont ajoutés 200 ml d'eau distillée. L'ensemble est par la suite agité manuellement et chauffé au bain marie à 100°C, pendant 30 min. le mélange est refroidi à température ambiante puis filtré sur du papier Watmann<sup>o</sup>1. L'opération a été répétée trois fois. Les trois filtrats obtenus sont placés dans un seul récipient.

### **2.3.2. Extraction des polyphénols totaux par macération dans l'éthanol aqueux**

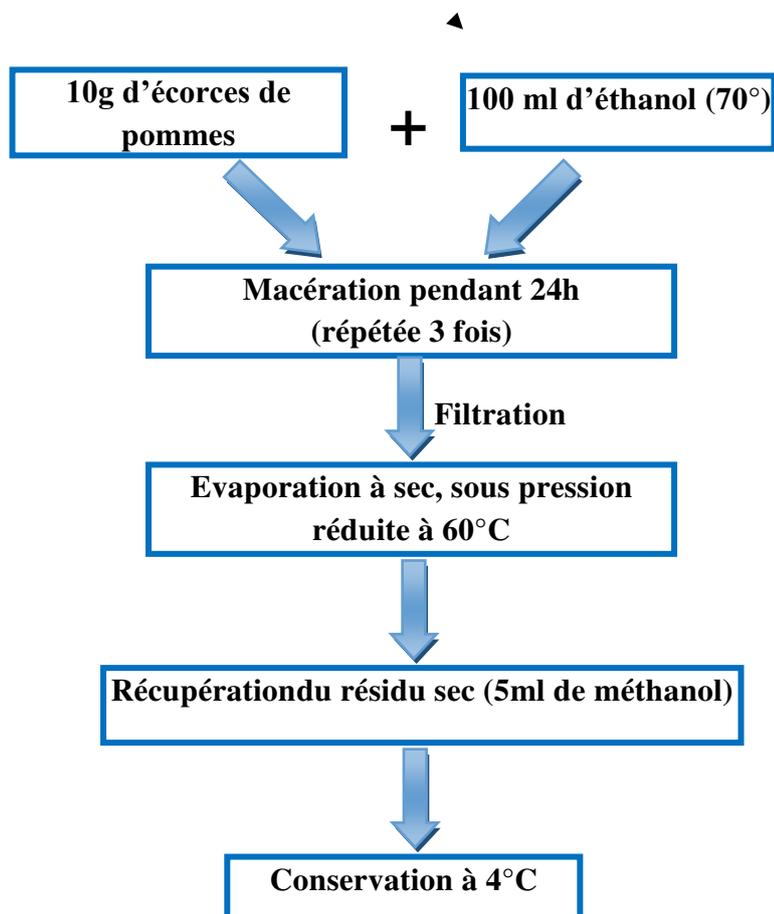
#### **Principe**

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale dans l'éthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes).

#### **Mode opératoire**

Le protocole de la macération a été effectué selon le protocole décrit par Hamia et *al.* (2014), avec quelques modifications (Fig.15).

- Dans un bécher de 500 ml, 100 ml d'éthanol aqueux (70:30), préalablement chauffé jusqu'à ébullition sont ajoutés 10 g de MV chaque lot; le tout est agité de temps en temps jusqu'à refroidissement ;
- Laisser macérer pendant 24 h, ensuite filtrer sur papier Wathman (n<sup>o</sup>:1) ;
- Répéter la procédure trois fois, Les 3 macérats hydro-alcoolique sont placés dans un seul récipient.
- Evaporer le filtrat sous pression réduite à 60°C, puis récupérer l'extrait dans 5ml de méthanol et conservé à 4°C.



**Figure 15 :** Protocole d'extraction des polyphénols totaux (Hamia et al. ,2014)

A la fin de chaque extraction on obtient 4 solutions différentes (Tableau2)

**Tableau 2:** Les différentes solutions obtenues après chaque extraction

Solution éthalonique 1	Pelures de pommes conservées à 4° C et non lyophilisées
Solution éthalonique 2	Pelures de pommes conservées à 4° C lyophilisées
Solution éthalonique 3	Pelures de pommes conservées à -20° C et non lyophilisées
Solution éthalonique 4	Pelures de pommes conservées à -20° C lyophilisées

### **2.3. Mise en évidence des différents composés phénoliques**

#### **2.4.1. Mise en évidence des polyphénols totaux**

Cette réaction a été réalisée pour la détection de ces molécules dans les différentes solutions éthanoliques obtenues. A 1ml de solution, ajouter 1 à 2 gouttes de perchlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) (BÉKRO et *al*, 2007).

La présence des composés phénoliques dans les extraits est indiquée par l'apparition de la couleur verte noirâtre.

#### **2.4.2. Mise en évidence des flavonoïdes (Réaction à la cyanidine)**

Cette réaction a été effectuée selon le protocole décrit par BÉKRO et *al*(2007)en y apportant quelques modifications :

Dans un tube à essai, plongé dans de l'eau froide, mettre 2ml de chaque phase éthanolique obtenue, en plus de l'alcool chlorhydrique (4 ml éthanol + 1ml HCl concentré). Ajouter 2 ou 3 morceaux de magnésium.

La présence des différents types des flavonoïdes dans les extraits est indiquée par l'apparition d'une couleur Rose-orange ou violacée.

#### **2.4.3 - Mise en évidence des tanins**

La mise en évidence des tanins peut être obtenue selon deux réactions :

- **Réaction de Stiasny**

Mettre 2ml la solution éthanolique et lui ajouter le réactif de Stiasny (1Vd'HCL+2Vde Formol à 35%).

- **Réaction de Bate Smith**

Cette réaction consiste à faire introduire dans un tube à essais 1ml de la solution éthanolique, puis ajouter 3 à 4 ml du de butanol chlorhydrique, porter au bain marie à  $90^\circ\text{C}$  pendant 5-10 minutes. La présence de tanins dans les extraits est indiquée par l'apparition d'une couleur Rouge et formation de flocons.

#### **2.4.4. Mise en évidence des Anthocyanes**

La caractérisation des anthocyanes repose sur le changement de couleur de l'extrait à caractériser en fonction du pH.

- Préparer une gamme de pH dans 6 tubes contenant chacun 1ml de solution pH (0, 2, 5, 7, 12 et 14)
- Ajouter dans chaque tube 1ml de la solution éthanolique.

La présence des Anthocyanes dans les extraits est indiquée par l'apparition d'une gamme de couleur rouge, rose, violet, bleu, vert, jaune en fonction de la gamme pH de la précédente.

#### **2.5. Extraction des flavonoïdes (extraction liquide/liquide) (Fig. 16)**

##### **2.5.1. Affrontement par l'éther de pétrole:**

Avant l'extraction des différents flavonoïdes, les différentes solutions éthanoliques obtenues ont été débarrassées des cires, des lipides et de la chlorophylle par trois lavages successifs avec l'éther de pétrole (Kebièche et *al*, 2011).

D'après Rihane et Benlahreche (2013), le protocole est comme suit avec quelques modifications:

- Prendre 200 ml de chaque solution éthanolique, ajouter 66.60 ml d'éther de pétrole, bien agiter puis transférer le tout dans une ampoule à décanter et laisser reposer le mélange, aux moins 20 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases: une épiphase organique ou éther de pétrole (phase supérieure) et une hypophase aqueuse (phase inférieure);
- Récupérer la phase organique dans un récipient en verre ;
- Répéter la procédure trois fois ;
- La phase éther de pétrole est éliminée.

##### **2.5.2. Extraction des différentes fractions flavoniques**

Chaque solution aqueuse hypophase ainsi obtenue a été placée dans une ampoule à décanter. Ensuite, elle a été soumise à un processus de séparation liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante éther diéthylique, acétate d'éthyle et n-butanol.

Selon la méthode décrite par (Trekiet *al.*, 2009). Cette étape est caractérisée par la spécificité et la polarité du solvant organique.

#### **2.5.2.1. Affrontement par l'éther diéthylique**

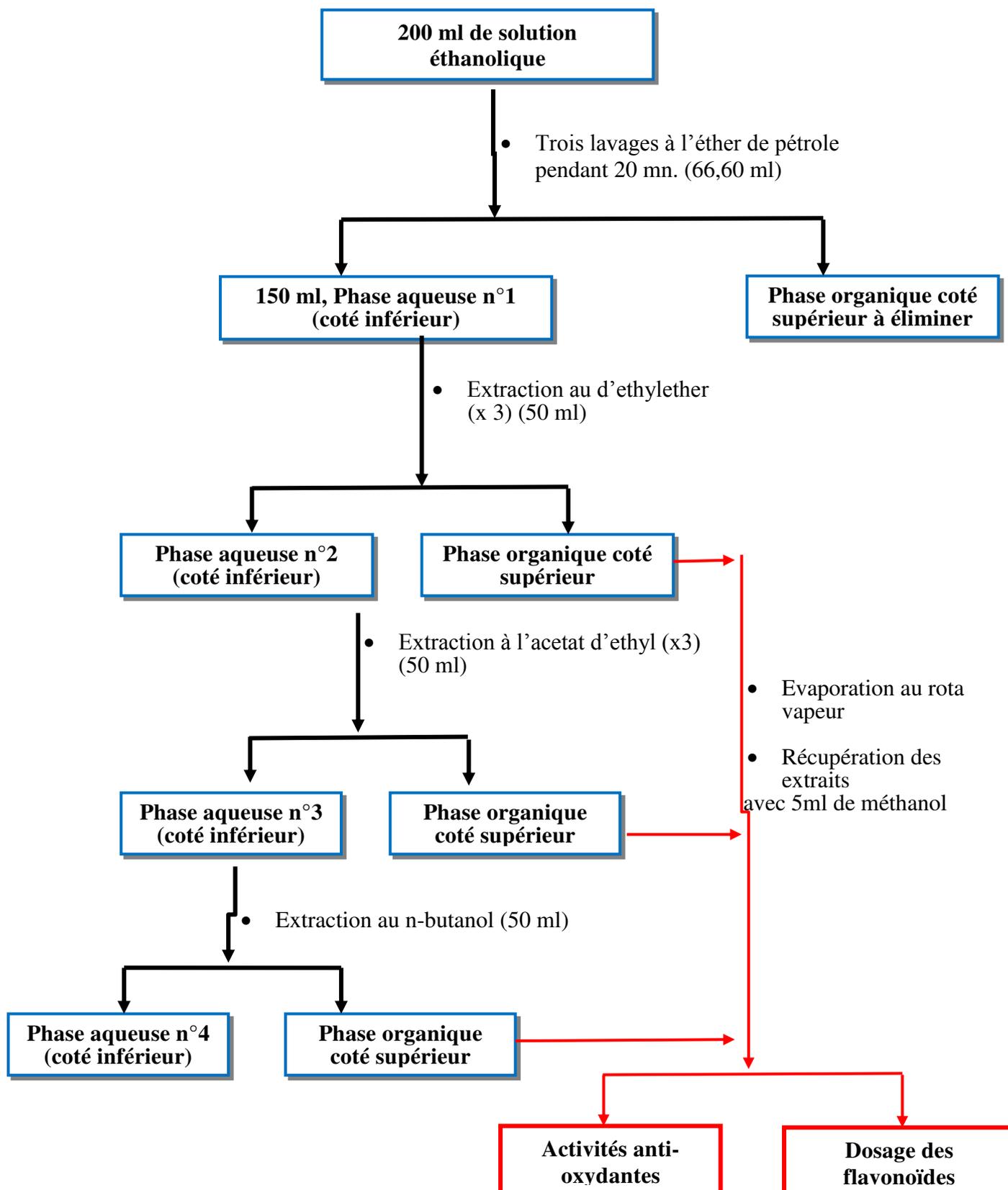
Cette phase a été réalisée avec l'éther diéthylique qui permet à extraire les aglycones (composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes). Dans ce cas, le mode opératoire de cette phase est comme suit (Rihane et Benlahreche, 2013):

- Ajouter 150 ml de la phase aqueuse à 50 ml d'éther diéthylique ;
- Bien agiter et laisser reposer le mélange au moins 20 minutes jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique ou éther diéthylique (coté supérieur) et une phase aqueuse (coté inférieur) ;
- Répéter la procédure trois fois
- Évaporer la phase organique obtenue ( $T^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$ )
- Recueillir l'extrait par 5 ml de méthanol puis les conserver au frais dans des flacons recouverts de papier aluminium

#### **2.5.2.2. Affrontement par l'acétate d'éthyle**

Cette phase a été réalisée par l'acétate d'éthyle. Elle a été effectuée selon le même protocole précédent et cette phase permet d'extraire les monoglycosides et partiellement les diglycosides.

- Dans ce cas la phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir de la phase étherdiéthylique.
- La phase organique obtenue a été évaporée au rotavapeur ( $T^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$ ).
- Recueillir l'extrait par 5 ml de méthanol puis les conserver au frais dans des flacons recouverts de papier aluminium.



**Figure 16 :** Extraction des flavonoïdes (extraction liquide/liquide) (Original)

### 2.5.2.3. Affrontement par le n-butanol

Cette phase permet d'extraire le reste de di-glycoside et le tri-glycoside. Cette manipulation a été effectuée selon le même protocole précédent.

La phase aqueuse utilisée est celle qui a été obtenue à partir de la phase d'acétate d'éthyle et la phase organique a été évaporée également au rotavapeur ( $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$ ) ; ensuite l'extrait a été récupéré dans 5 ml de méthanol et conservé au frais dans des flacons recouverts de papier aluminium.

Donc les différents extraits secs de chaque phase (éthérée, acétate d'éthyle et butanolique) ont été conservés dans 5 ml de méthanol au frais ( $4^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'à utilisation.

### 2.6. Calcul des rendements des différentes fractions

Le rendement (**R**) des différentes fractions phénoliques est déterminé selon la formule suivante.

$$\mathbf{R\ (\%) = (P1 - P2)/P3 \times 100}$$

**P1** : poids du ballon après évaporation ;

**P2** : poids du ballon vide ;

**P3** : poids de la matière végétale de départ.

### 2.7. Dosage des phénols totaux

#### Principe

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) ; lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (Singleton et *al.*, 1965).

## Mode opératoire

0,1 ml de l'extrait est mélangée avec 0,2 ml du réactif de Folin–Ciocalteu et 3ml d'eau distillée, agiter pendant 6 minutes au vortex, ajouter au mélange 0,6 ml de carbonate de sodium à 20% (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>).

L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc constitué de méthanol et de réactif de Folin–Ciocalteu à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm. Une gamme d'étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique dont la concentration initiale est de 4 mg en 10 ml de l'eau distillée comme contrôle positif à différente concentration.

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale et a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{(Polyphénol)} = (\text{CP.FD})/\text{ME.VE.}$$

**CP:** Concentration des polyphénols (mg/ml) détermine à partir de courbe étalon

**FD:** Facteur de dilution

**ME:** Masse de l'extrait

**VE:** Volume initial de la solution d'extrait

## 2.8. Dosage des flavonoïdes

### Principe

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>), ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (Bahorun et *al.*, 1996).

### Mode opératoire

- 1ml de l'extrait a été mélangé avec 1ml d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> à 2% (v/v). L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex puis incubé pendant 30 minutes et l'absorbance a été mesurée à 430 nm contre un blanc constitué de méthanol et de réactif AlCl<sub>3</sub>.
- Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme contrôle positif à différentes concentrations (0.0125 à 0.2mg/ml).

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent de catéchine par g de matière végétale.

## **2.9. Mesure de l'activité antioxydante**

### **Principe**

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH aux différents extraits obtenus à partir de chaque extraction que se soit pour les polyphénols totaux ou pour les différentes fractions de flavonoïdes (Diéthyléther, Acétate d'éthyle, et n butanol) (Brand et *al.*, 1995).

### **Mode opératoire**

0,1µl de chaque solution éthanolique des extraits à différentes concentrations (car chaque extrait a subi une série de dilution) sont ajoutés à 2 ml de la solution éthanolique du DPPH (4 mg/ml).

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 2 ml de la solution éthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 515nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété deux fois.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) selon l'équation suivante :

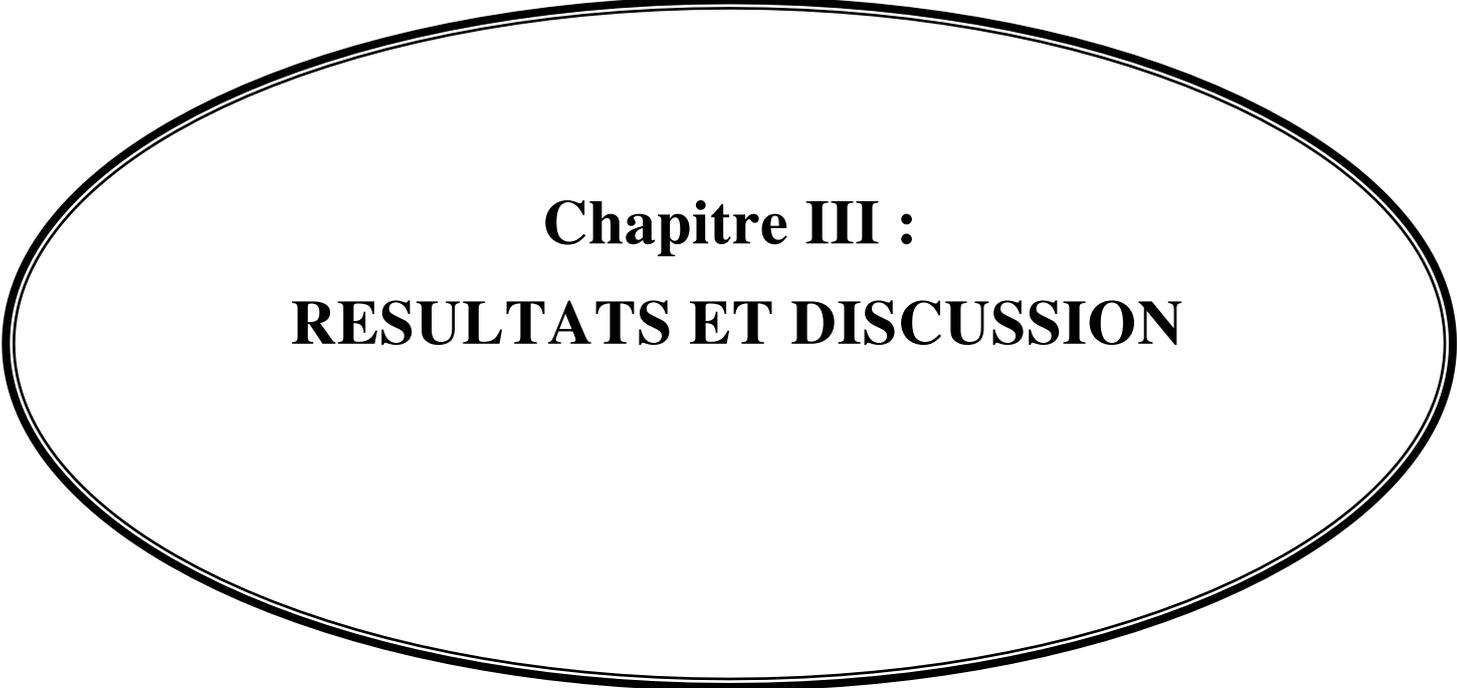
$$I\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration d'extrait nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH; c'est la concentration efficace à 50% (Ec50) aussi appelée Ic50 (concentration inhibitrice de 50%), elle est exprimée en mg/ml. Une faible valeur d'IC50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

## **2.10. Analyse des données**

Nous avons réalisé une analyse de variance lorsque le problème était de savoir si la moyenne d'une variable quantitative (Pourcentage de l'inhibition de l'oxydation) variait significativement selon les conditions de traitement. Dans les cas où plusieurs facteurs sont en jeu (deux températures différentes : 4°C et -20°C et la lyophilisation) nous avons utilisé le modèle linéaire global (GLM) de l'analyse de la variance indiqué dans la suite des programmes dans le logiciel systat vers.12, pour connaître explicitement l'effet d'un facteur indépendamment. L'analyse des interactions entre les facteurs a été prise en compte pour évaluer les effets combinés sur l'inhibition de l'oxydation. La concentration des solutions des extraits a été considérée comme covariable.



**Chapitre III :**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## Résultats

### 1. Effet de la lyophilisation sur le poids des pelures de pomme

Dans notre étude certains échantillons de pomme "*Golden Delicious*" ont subi une lyophilisation des pelures conservées à 4°C et des pelures conservées à -20°C pendant une durée respective de quatre mois; la lyophilisation est une technique qui permet l'élimination de l'eau contenue dans les échantillons préalablement congelés par sublimation. Ensuite les échantillons ont été broyés. Les résultats obtenus après lyophilisation des pelures de pomme montrent que leurs poids a diminué de 1/4 de leurs poids initial (Tableau 3) et ceci s'explique par la perte d'eau grâce à la technique de la lyophilisation étant donné que les pelures de fruit sont riches en eau.

**Tableau 3:** Poids des échantillons avant et après la lyophilisation

Pomme <i>Golden Delicious</i>	Poids avant lyophilisation	Poids après lyophilisation
Conservée à 4°C	236,91 g	56,7 g
Conservée à -20°C	110,1 g	32,21 g

### 2. Préparation des extraits polyphénoliques de pommes "*Golden Delicious*"

#### 2.1. Par décoction

La décoction (extraction solide-liquide) est une méthode d'extraction préconisée en médecine traditionnelle. Elle consiste à faire introduire la matière végétale dans de l'eau bouillante; à la fin de la décoction on a obtenu quatre extraits aqueux (Tableau 4):

**Tableau 4:** Solution aqueuse obtenue par décoction

10 g de pelure de pomme	Solution aqueuse
Pelures conservées à 4 °C non lyophilisées	Solution aqueuse n° 1
Pelures conservées à 4 °C lyophilisées	Solution aqueuse n° 2
Pelures conservées à -20 °C non lyophilisées	Solution aqueuse n° 3
Pelures conservées à -20°C lyophilisées	Solution aqueuse n° 4

## 2.2. Par macération

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale dans l'éthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes); à la fin de la macération on a obtenu quatre extraits éthanoliques (Tableau5):

**Tableau 5:** Solution éthanolique obtenue par décoction

10 g de pelures de pomme	Solution éthanolique
Pelures conservées à 4 °C non lyophilise	Solution éthanoliquen° 1
Pelures conservées à 4 °C lyophilise	Solution éthanoliquen° 2
Pelures conservées à -20 °C non lyophilise	Solution éthanoliquen° 3
Pelures conservées à -20°C lyophilise	Solution éthanoliquen° 4

## 3. Tests phyto-chimiques:

### 3.1. Test phyto-chimique sur les macérats éthanoliques:

Le test phyto-chimique est un test préliminaire qualitatif qui permet la mise en évidence des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans notre matière végétale. Dans ce travail, l'existence des composés phénoliques et flavonoïdes a été réalisée sur les solutions aqueuses et éthanoliques obtenues par décoction et macération en utilisant différents réactifs et réactions:

- Réaction au FeCl 3 pour la mise en évidence des polyphénols;
- Réaction à la cyanidine pour la mise en évidence des flavonoïdes;
- Réaction de Stiasny et de Bath Smith pour la mise en évidence des tanins;
- Mise en évidence des anthocyanes repose sur le changement de couleur de l'extrait en fonction du pH

Les résultats de ces tests sont représentés dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 6:** Mise en évidence des composés phénoliques présents dans les solutions éthanoliques de pomme "*Golden Delicious*"

Solution	Composé	Quantité relative	Couleur
<b>Solution éthanolique n° 1</b>	Polyphénols	+++	Brin verdâtre
	Flavonoïdes	+++	Orange
	Tanin	++	Rouge
	Anthocyanes	-	Négatif
<b>Solution éthanolique n° 2</b>	Polyphénols	+++	Vert noirâtre
	Flavonoïdes	++++	orange
	Tanin	+++	Rouge orange et flocon
	anthocyanes	-	Négatif
<b>Solution éthanolique n° 3</b>	Polyphénols	+++	Brin verdâtre
	Flavonoïdes	+++	Orange
	Tanin	++	rouge
	Anthocyanes	-	Négatif
<b>Solution éthanolique n° 4</b>	Polyphénols	++++	Vert noirâtre
	Flavonoïdes	++++	Orange
	Tanin	++++	Rouge orange et flocon
	Anthocyanes	-	Négatif

++++ : Présence en forte quantité

+++ : Présence en moyenne quantité

+ : Présence en faible quantité

-: Négatif

Les résultats de cette manipulation indiquent clairement la présence des composés phénoliques en abondance dans les solutions éthanoliques obtenues à partir de matière végétale lyophilisée, caractérisée par une réponse positive au test de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) et la présence des flavonoïdes mis en évidence par le test à la cyanidine ainsi que la présence de tanin par la réaction de *Bath Smith* et ces derniers sont plus abondants dans les solution éthanolique obtenus par la matière végétale conservée à -20°C et lyophilisée.

Les composés phénoliques se sont confirmés par l'apparition d'une coloration vert-noirâtre et les flavonoïdes par une coloration orange et pour les tanins par une coloration rouge-oranger plus la formation de flocons. Ces derniers étaient présents dans la solution éthanolique obtenue à partir de pelures de pommes conservées à -20°C et lyophilisées.

On remarque que les résultats concernant les anthocyanes sont négatifs pour toutes les solutions éthanoliques, car selon la littérature les anthocyanes étaient présents dans les pommes de couleurs rouge (Fuji, Red Delicious,...).

### **3.2. Test phyto-chimique sur les solutions aqueuses**

Concernant les extraits aqueux obtenus par décoction le test phytochimique a donné des résultats négatifs. Cela est peut-être du au fait que la décoction fait appel à l'utilisation d'eau bouillante (+100°C) et que les polyphénols sont des métabolites secondaires trop sensibles à la chaleur et il y a activation des enzymes qui les dégradent.

## **4. Détermination du rendement des solutions polyphénolique et flavonique**

Le rendement (**R**) des différentes fractions phénoliques est déterminé selon la formule suivante:

$$\mathbf{R(\%) = (P1 - P2)P3 \times 100}$$

**P1** : Poids du ballon après évaporation ;

**P2** : Poids du ballon vide ;

**P3** : Poids de la matière végétale de départ

### **4.1. Rendement en polyphénols totaux**

Les quatre solutions éthanoliques obtenues par macération ont subi une évaporation au rota-vapeur (Fig. 17). Le rendement de l'extrait sec est calculé à partir de la formule précédente (Tableau 7).

**Tableau 7:** Rendement en polyphénols totaux des différents extraits éthanoliques

<b>Solution éthanolique</b>	<b>Aspect</b>	<b>Couleur</b>	<b>Rendement</b>
Solution n°1 (10g de pelures conservées à 4°C non lyophilisées)	Hygroscopique	Marron	24,9%
Solution n°2 (10g de pelures conservées à 4°C lyophilisées)	Hygroscopique	Marron	23,7%
Solution n°3 (10g de pelures conservées à -20°C non lyophilisées)	Hygroscopique	Marron	21,3%
Solution n°4 (10g de pelures conservées à -20 °C lyophilisées)	Hygroscopique	Marron	37%



**Figure 17 :** Aspect de l'extrait phénolique après évaporation sous vide

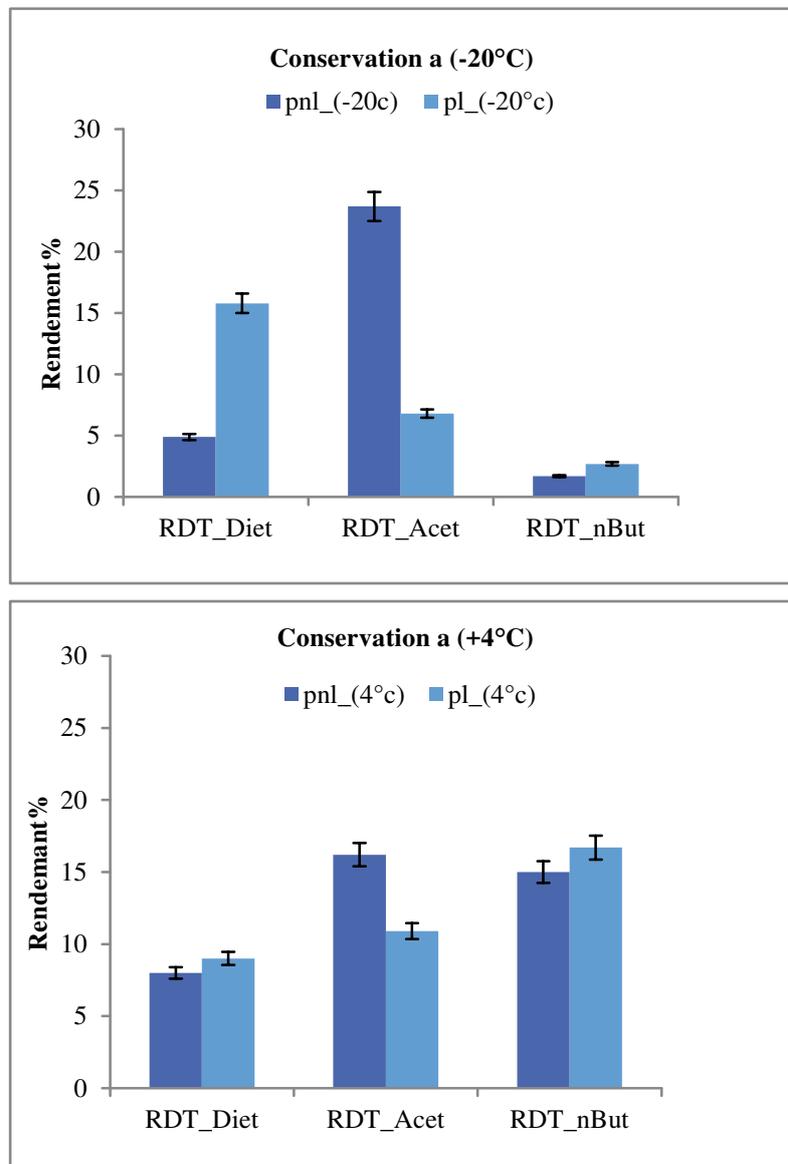
On remarque que la lyophilisation des pommes conservées à 4°C n'a pas d'impact sur le taux de polyphénols totaux (23,7%) car ce résultat est presque identique au résultat obtenu pour les pelures de pomme conservées à 4°C et non lyophilisées (24,9%) contrairement à celles conservées à -20°C ou la lyophilisation a donné un meilleur résultat (37%) que celles conservées à -20°C et non lyophilisées (21,3%). Et lorsqu'on compare les résultats des pelures de pommes non lyophilisées et conservées aux deux températures 4°C et -20°C on remarque la conservation à 4°C a donné un meilleur rendement que celles conservées à -20°C et le contraire a été obtenu pour les pelures lyophilisées et conservées aux deux températures différentes (4 °C et -20°C) .

## 4.2. Rendement des différentes fractions flavoniques

Les quatre solutions éthanoliques obtenues par macération ont été soumises à une extraction générale avec des solvants à polarité croissante (Diethyl Ether → Acétate dethyl → n butanol). Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts:

- L'extrait Diéthyléther
- L'extrait Acétate dethyl
- L'extrait n butanolique

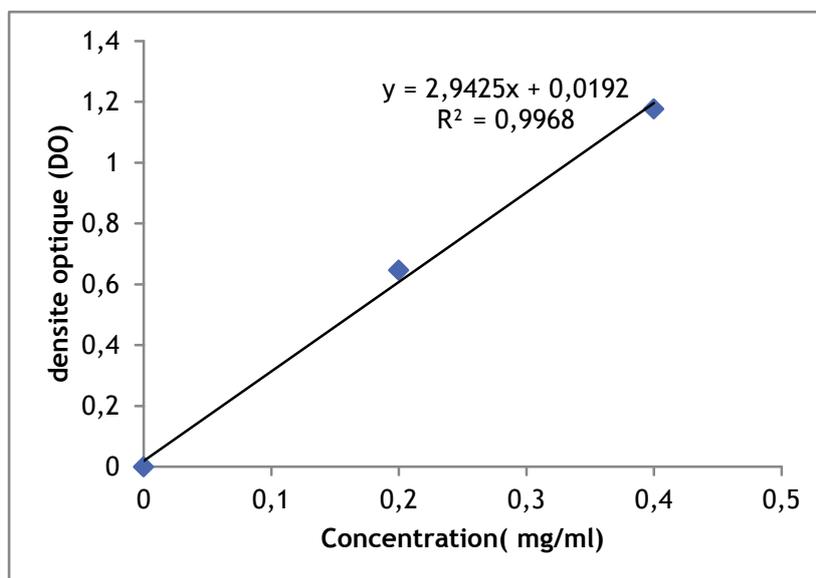
Les trois extraits bruts obtenus ont subi une évaporation au rota-vapeur et leur rendement a été calculé selon l'équation décrite précédemment et représenté graphiquement (Fig. 18).



**Figure 18:** Variation des rendements flavoniques des pelures de pomme en relation avec la température de conservation et la lyophilisation

## 5. Dosage des polyphénols

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ( $y = 2,942x + 0,019$ ) (Fig. 19).



**Figure 19:** Représentation linéaire de l'acide gallique

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g Mv). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les pelures de pommes conservées à 4°C et à -20°C lyophilisées et non lyophilisées (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Concentration des polyphénols totaux de pelures de pomme

Extraits polyphénoliques	Teneur en Polyphénols totaux	mg Eq acide gallique/g de Mv
Pomme conservées à 4°C pelures non lyophilisées	0,385	0,077
Pomme conservées à 4°C pelures lyophilisées	0,628	0,132
Pomme conservées à -20°C pelures non lyophilisées	0,479	0,112
Pomme conservées à -20°C pelures lyophilisées	0,643	0,088

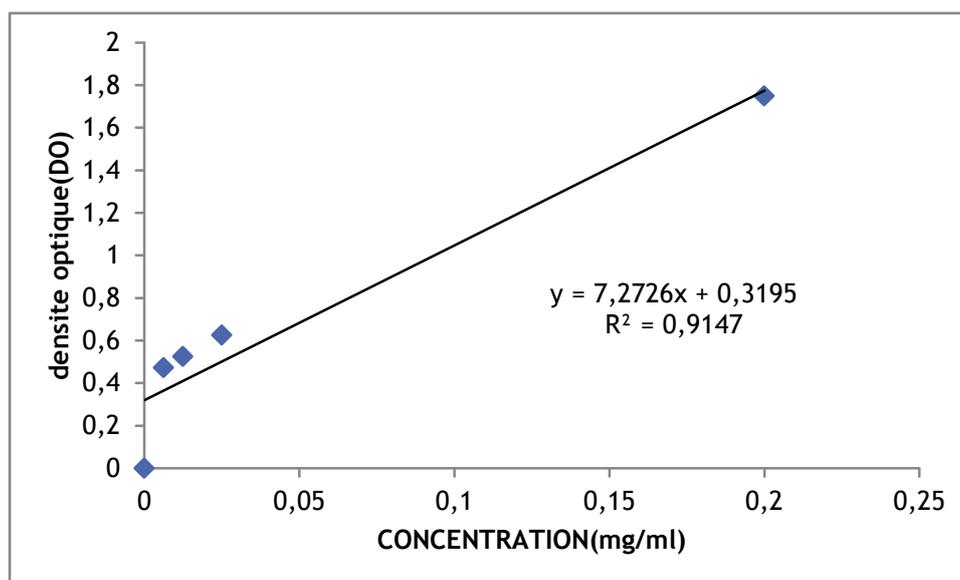
D'après les résultats, on peut constater que la teneur qui est de 0,112 mgEAG/g Mv en polyphénols totaux des pelures conservées à -20°C est supérieure à celle des pelures conservées à 4°C qui est de 0,077 mgEAG/g Mv.

Par contre la lyophilisation des pelures a donné des résultats inverses car on constate que les pelures conservées à 4°C 0,132 mgEAG/gMv et lyophilisées ont donné une concentration en polyphénols supérieure à celles conservées à -20°C 0,088mgEAG/g MV.

Et lorsque on compare les résultats des pelures de pomme *Golden* conservées à la même température 4°C on remarque que la teneur en polyphénols des pelures lyophilisées est légèrement supérieure.

## 6. Dosage des différentes fractions flavonoïques

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium, les concentrations des différentes fractions flavonoïques sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine ( $y = a x + b$ ) (Fig. 20).



**Figure 20:** Courbe étalon quercétine

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine par un gramme de l'extrait (mg EQ quercétine/g Mv). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenues dans les pelures de pommes conservées à 4°C et à - 20°C lyophilisées et non lyophilisées (Tableau 9).

**Tableau 9** : Concentration des fractions flavonoïques de pelures de pomme

<b>Matière végétale</b>	<b>Extraits flavonoïques</b>		<b>mg EQquercetine/g Mv</b>
Pomme conservées à 4°C pelure non lyophilisées	Ext-Diet	3,52	2,18
	Ext -Acet	6,15	1,89
	Ext-nbut	1,33	0,43
Pomme conservées à 4°C pelure lyophilisées	Ext-Diet	22,82	12,68
	Ext -Acet	34,50	15,82
	Ext-nbut	17,86	5,34
Pomme conservées à -20°C pelure non lyophilisées	Ext-Diet	39,03	39,82
	Ext -Acet	12,49	2,63
	Ext-nbut	9,90	29,11
Pomme conservées à -20°C pelure lyophilisées	Ext-Diet	51,90	44,74
	Ext -Acet	43,07	31,66
	Ext-nbut	6,69	12,38

- Ext-Diet: ExtraitDiethilether
- Ext -Acet: Extrait Acetatdiethyl
- Ext-nbut :Extrait n butanol

Si on compare l'effet de la température sur la concentration des différentes fractions flavonoïques on remarque que les pelures de pommes conservées à -20°C ont donné des concentrations beaucoup plus élevées que les pelures de pommes conservées à 4°C.

Comparativement, les concentrations des pelures de pommes conservées à -20°C et lyophilisées sont nettement supérieures aux concentrations données par les pelures de pommes conservées à 4°C et lyophilisées.

D'après les résultats obtenus on remarque que les fractions obtenues à partir des pelures de pomme conservées à -20°C et lyophilisées ont donné les plus grandes concentrations.

On a les extraits Diéthyléther qui ont donné une concertation de 44,74 mg EQ/g de MV suivis par les extraits Acétatedethyl qui ont une teneur de 31,66 mg EQ /g de MV. Ensuite, arrive l'extrait n butanolique avec une concentration de 12,38 mg EQ /g de MV.

Cependant, l'extrait n butanolique des pelures conservées à -20° C et non lyophilisées est supérieur à ce dernier avec une teneur de 29,11 mg EQ /g de MV.

## 7. Activité antioxydante:

L'activité anti-oxydante des extraits de polyphénols totaux et des différentes fractions flavoniques de pomme "Golden Delicious" et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. (Fig. 22). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic L et al., 2007).

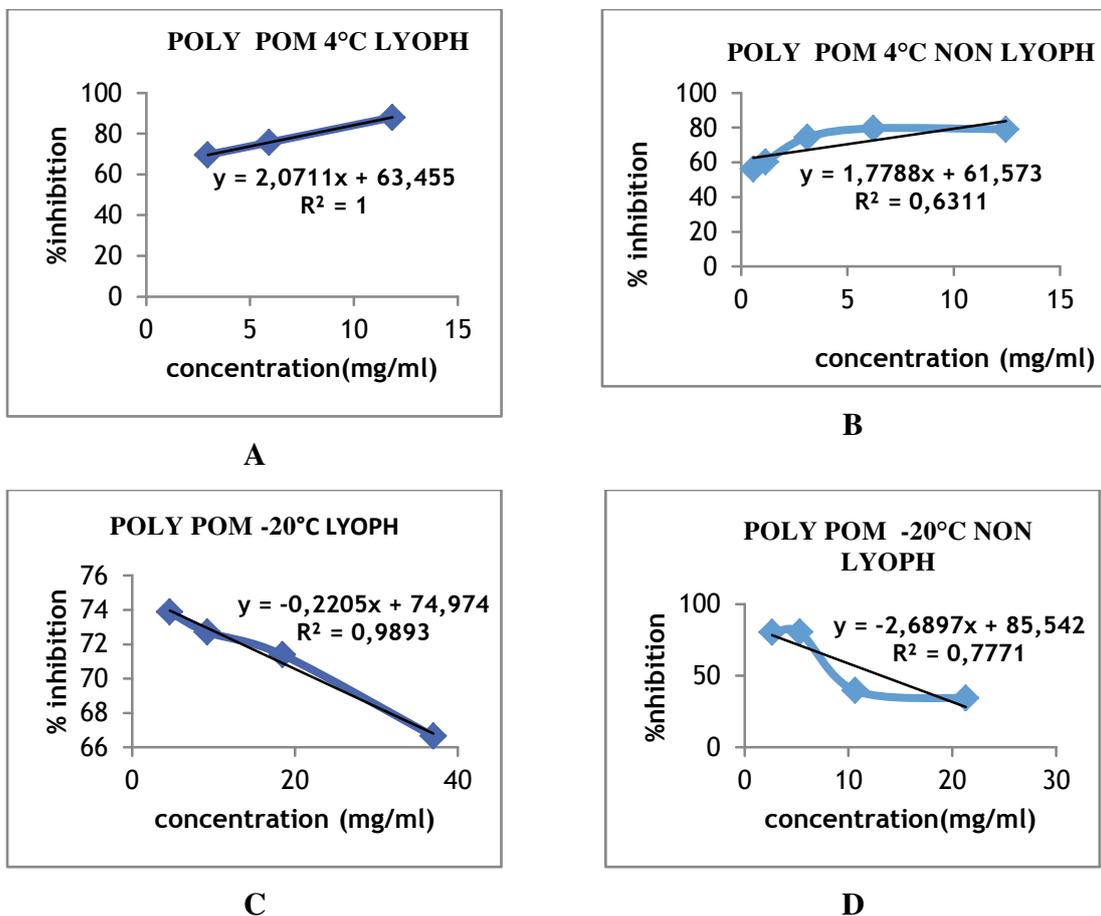
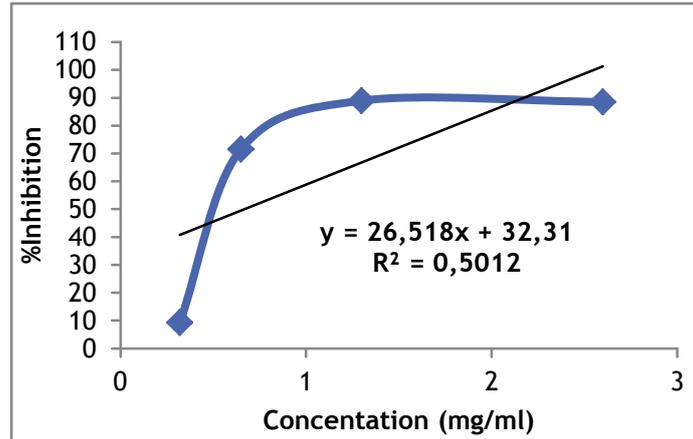


Figure 21 : Représentation graphique de l'activité antioxydante des polyphénols totaux



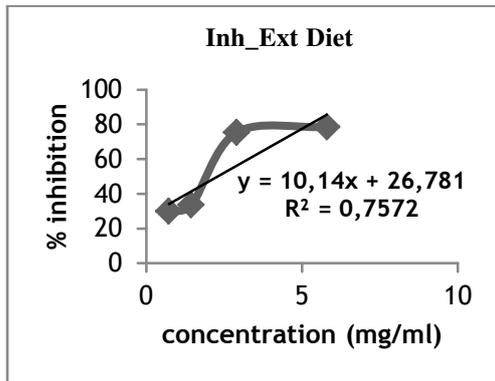
**Figure 22 :** Représentation graphique activité antioxydante de l'acide ascorbique

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits polyphénoliques montrent que le pourcentage d'inhibition des extraits de pelures de pommes conservées à -20°C non lyophilisées et lyophilisées est supérieur à 70% à une concentration de l'ordre de 2,662mg/ml et 4.625mg/ml respectivement (Fig. 21 A et C).

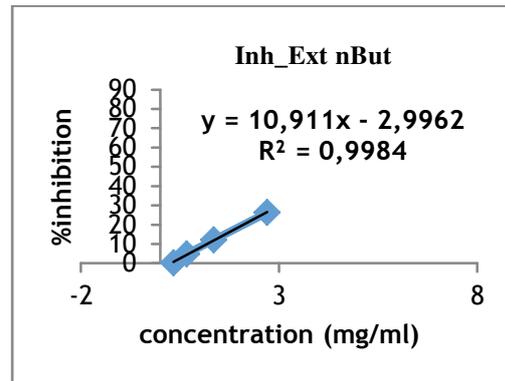
En ce qui concerne les pelures de pommes conservées à 4°C non lyophilisées et lyophilisées le pourcentage d'inhibition est supérieur à 69% à une concentration de l'ordre de 3,112mg/ml et 2,962mg/ml. (Fig. 21 B et D). Selon les résultats enregistrés, les extraits sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, et leur IC50% n'a pas pu être atteint lors de notre étude du fait qu'il aurait peut-être fallu diluer encore plus les extraits polyphénoliques. De ce fait leur IC50% était plus élevé que celui d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,666 mg/ml (Tableau 10).

**Tableau 10 :** IC50% des différents extraits polyphénoliques

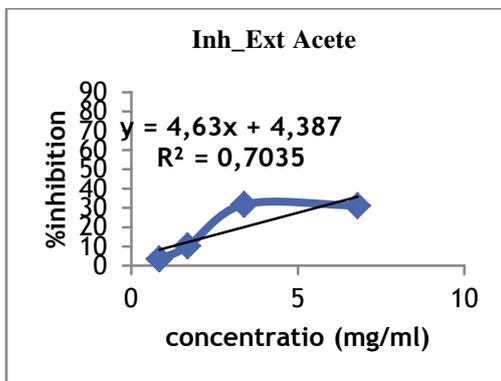
Extrait polyphénolique	IC50%
Pelures pommes conservées à 4°C non lyophilisées	_6.49
Pelures pommes conservées à 4°C lyophilisées	-6.50
Pelures pommes conservées à -20°C non lyophilisées	-1.11
Pelures pommes conservées à -20°C lyophilisées	13.2
Acide ascorbique	0,66



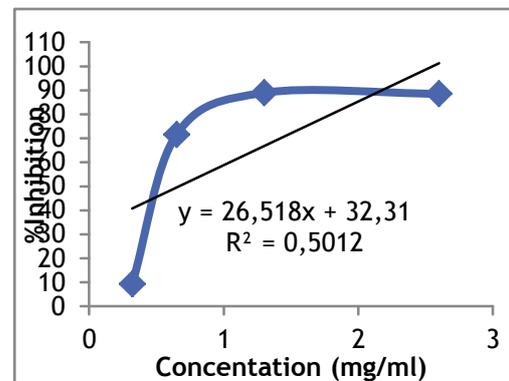
1



2



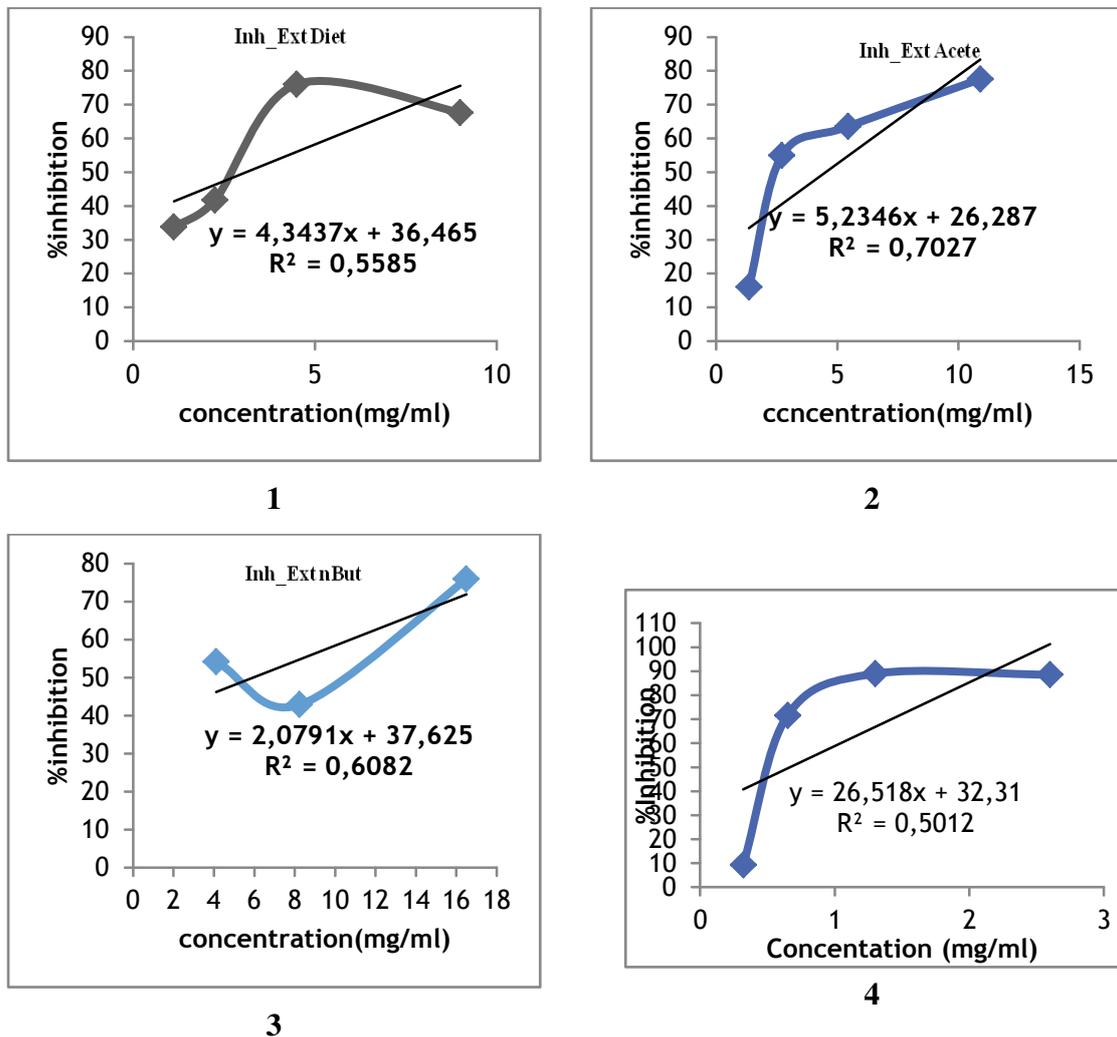
3



4

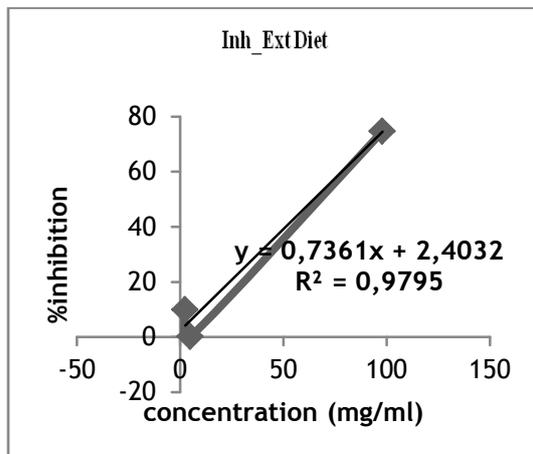
**Figure 23 :** Représentation graphique de l'activité antioxydante des différentes fractions flavonoïques de pelures de pomme conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  lyophilisées

- 1 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Diéthyléther
- 2 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Acétatedethyl
- 3 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par n buthanol
- 4 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

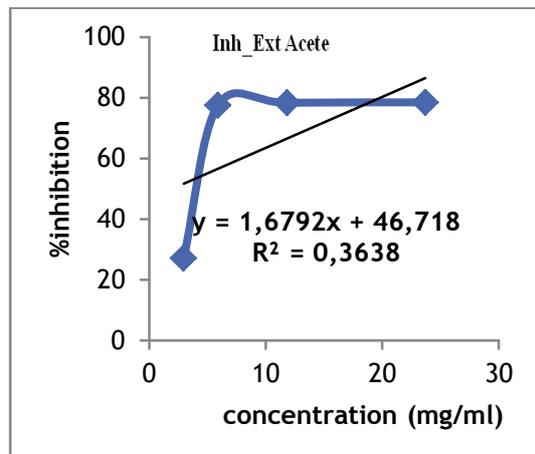


**Figure 24 :** Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavonoïques de pelures de pomme conservées à 4°C lyophilisées

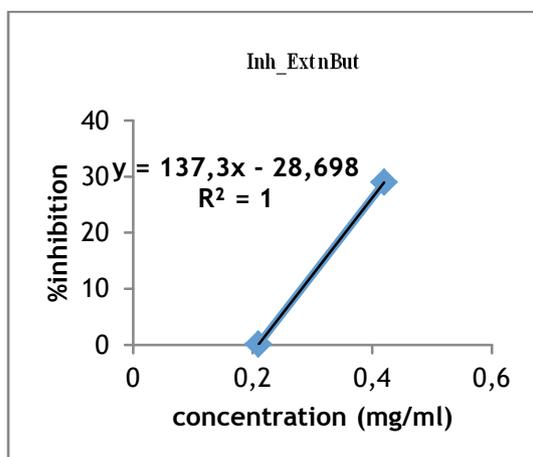
- 1 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Diéthyléther
- 2 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Acétatedethyl
- 3 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par n buthanol
- 4 :** Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique



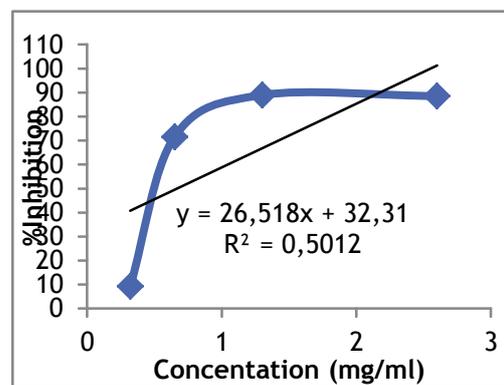
1



2



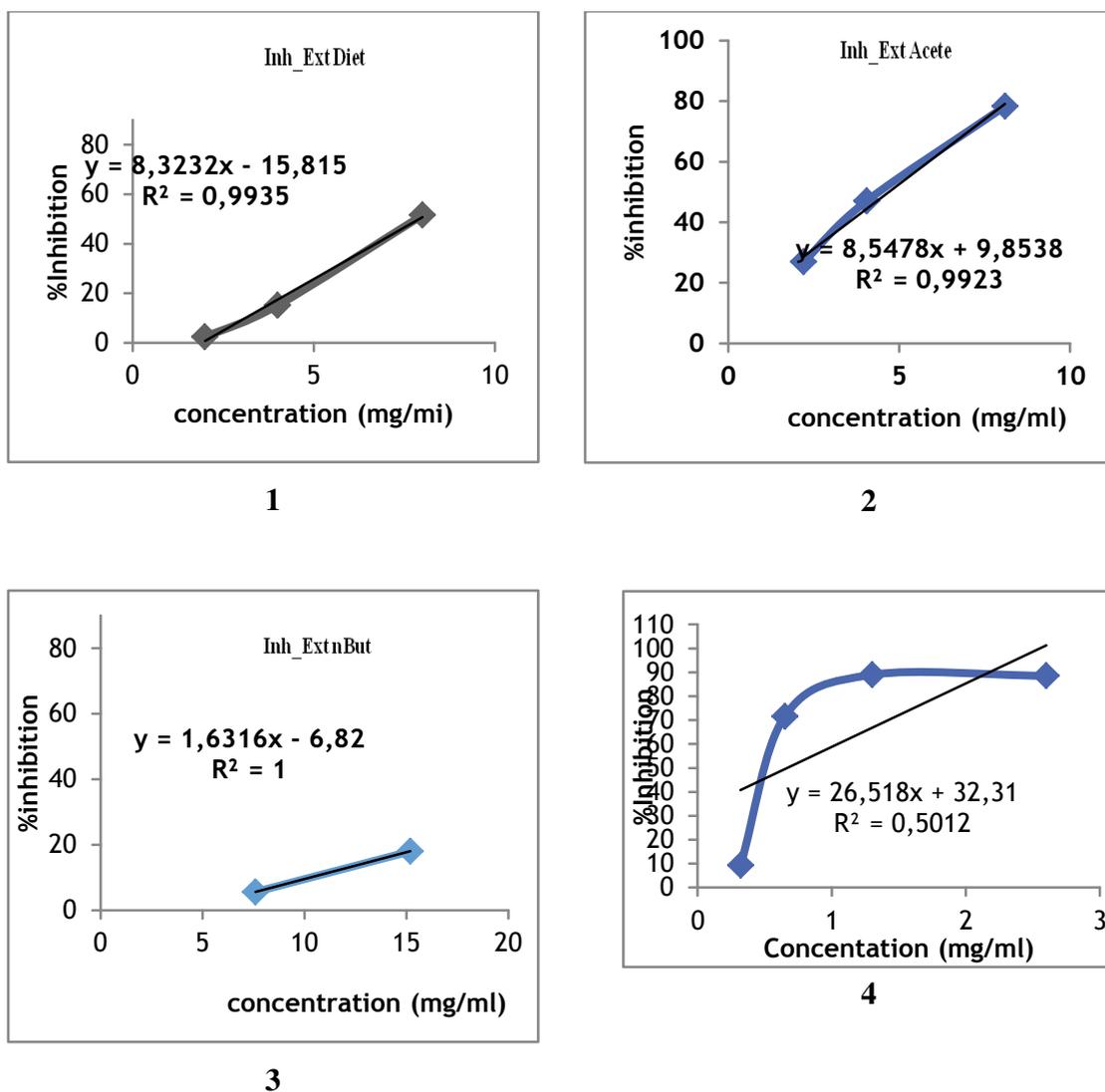
3



4

**Figure 25** : Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavonoïques de pelures de pomme conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  non lyophilisées

- 1 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Diéthyléther
- 2 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Acétatedethyl
- 3 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par n buthanol
- 4 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique



**Figure 26 :** Représentation graphique de l'activité anti-oxydante des différentes fractions flavonoïques de pelures de pomme conservées à 4°C non lyophilisées

- 1 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Diéthyléther
- 2 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par Acétatedethyl
- 3 : Pourcentage d'inhibition d'extrait obtenu par n buthanol
- 4 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

D'après les représentations graphiques des différents extraits flavoniques (Ext\_Dieth, Ext\_Acetat, Ext\_n but) des pelures de pommes conservées à -20°C et à 4°C lyophilisées (Fig. 23 et 24) ainsi que pour les pommes conservées à -20°C et à 4°C non lyophilisées (Fig. 25 et 26) on a pu calculer leur IC50% (Tableau 11) ; ces derniers eux aussi sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC50 ont donné des valeurs relativement plus élevées que celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,666 mg/ml. Y compris pour l'extrait n butanolique des pelures de pommes conservées à -20°C et non lyophilisées qui a donné une valeur de 0,57mg/ml inférieur à celle de l'acide ascorbique.

**Tableau 11:** IC50% des différentes fractions flavonoïques

	Pommes 4°C non lyophilisées	Pommes 4°C lyophilisées	Pommes -20°C non lyophilisées	Pommes -20°C lyophilisées
Ext_Dieth	7.90	3.11	-7.57	2.28
Ext_Acetat	4.69	4.53	1.95	9.85
Ext_n but	34.83	5.95	0.57	4.85
Acide ascorbique	0,66			

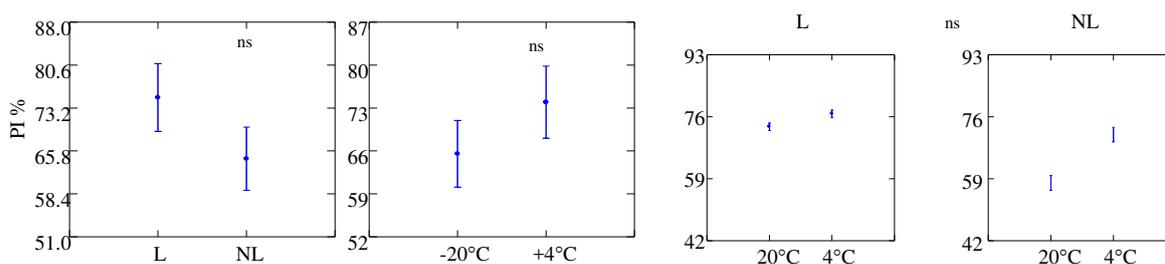
- Ext-Diet : Extrait Diethylether,
- Ext -Acet: Extrait Acetatdethyl,
- Ext-nbut: Extrait n butanol

### **8. Analyse globale comparée des effets seuls et combinés des polyphénols totaux et des fractions**

Les résultats obtenus ont été compilés (Tableau 12) et sont soumis à une analyse de variance (ANOVA, Systat, vers.12). Les pourcentages d'inhibition sous l'effet des différentes conditions expérimentales (températures de conservation et lyophilisation) sont représentés dans les figures indiquées ci-après.

**Tableau 12:** Résultats polyphénoliques et flavoniques pour analyses de variance

		RdtPoly ph en mgEq Acide gallique/ gMv	Activité antioxydan te mg/ml	Rdtflav. en mgEq Acide gallique/gMv			Activité antioxydante mg/ml		
				Frac 1	Frac 2	Frac 3	Frac1	Frac2	Frac3
Frais 4°C	Lyophilisé	0,132	-6,49	12,6 8	15,8 2	5,32	3,11	4,53	5,95
	Non lyophilisé	00,77	-6,50	2,18	1,89	0,43	7,90	4,69	34,83
Congelé -22°C	Lyophilisé	00,88	-1,11	44,7 4	31,6 6	12,3 8	2,28	9,85	4,85
	Non lyophilisé	0,112	13,2	39,8 2	2,63	29,1 1	-7,57	1,95	0,57



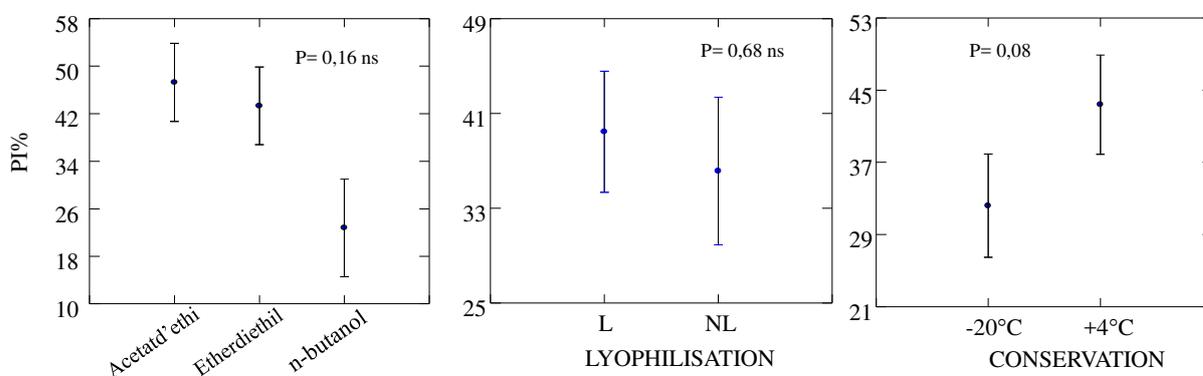
**Figure 27 :** Effets des facteurs physiques seuls sur l'inhibition de l'oxydation par les polyphénols totaux obtenus à partir des pelures de pomme

Dans tous les cas, d'après nos observations, l'effet des composés phénoliques extraits à partir des écorces non lyophilisées mais conservées à une température de 4°C induit une meilleure inhibition de l'oxydation en comparaison avec ceux des écorces conservées à -20°C et non lyophilisées.

En effet, pour des rendements en polyphénols obtenus avec les écorces conservées à 4°C lyophilisées ou non lyophilisées, nous avons constaté une activité antioxydante supérieure à respectivement 70% et 76%. Alors que pour les pelures de pomme conservées à -20°C lyophilisées ou non lyophilisées, les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de respectivement 75% et 59%.

Dans les conditions expérimentales réalisées, on peut néanmoins remarquer que les différences des inhibitions ne sont pas significatives (Fig. 27) que ce soit avec l'effet des facteurs lyophilisation et conservation seuls ou en interactions. On peut aussi émettre l'hypothèse que la lyophilisation n'a pas eu un effet sur les pelures de pommes conservées à 4°C et à -20°C.

Les résultats de l'analyse de la variance concernant les effets des fractions flavoniques obtenus à partir des trois solvants (Acétate d'éthyle, Ether diéthylique et N-Butanol) sont représentés dans (Fig. 28).



**Figure 28 :** Effets des facteurs physiques seuls sur l'inhibition de l'oxydation par les extraits flavoniques obtenus à partir des pelures de pomme.

Les composés flavoniques obtenus à partir des pelures lyophilisées montrent un meilleur effet d'inhibition relativement par rapport à ceux des écorces non lyophilisées, ( $p= 0,68$ ), mais il n'y a pas de différence significative. Egalement, les mêmes composés flavoniques issus de pelures de pomme conservées à 4°C d'écorces ont un pourcentage d'inhibition supérieur à celui des pelures de pommes conservées à -20°C ( $p=0,08$ ) (Fig. 28)

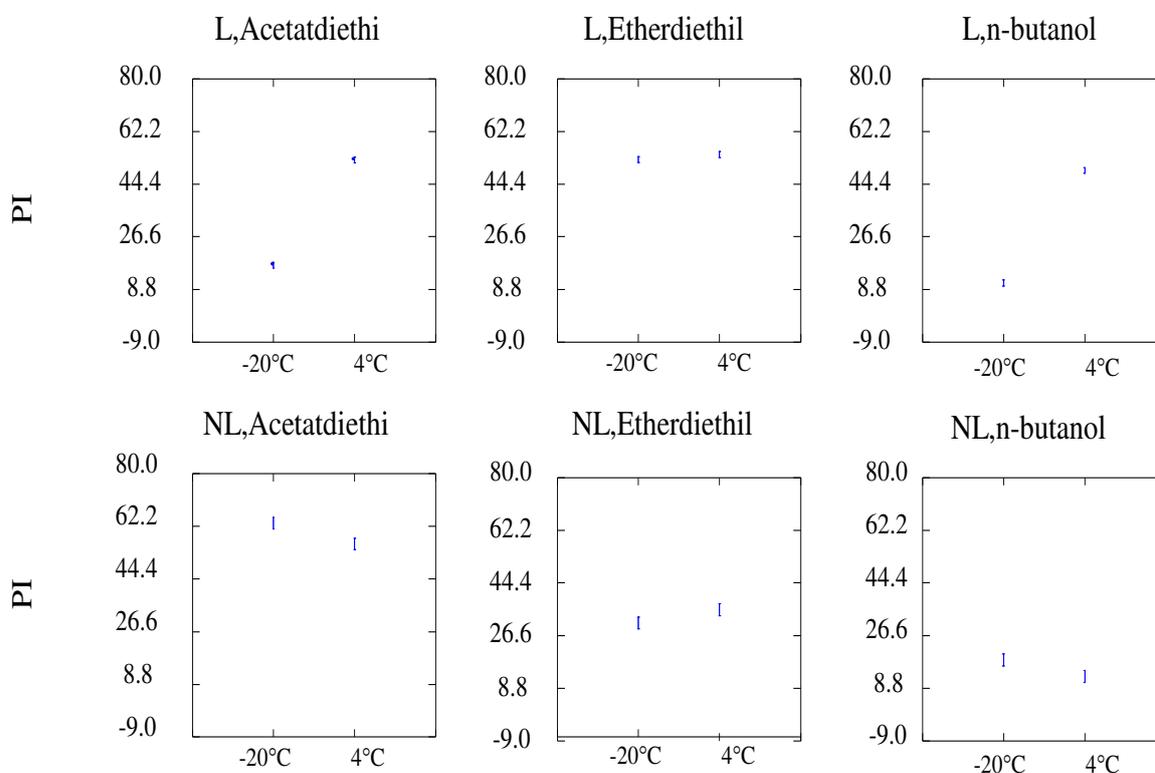
Cependant, les pourcentages d'inhibition obtenus avec les composés flavoniques extraits avec l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle apparaissent nettement plus élevés avec un effet différent de celui constaté avec les fractions issues du N-Butanol ( $p= 0,16\%$ ) différence marginale (Fig.28).

Nous avons jugé pertinent d'indiquer les effets des interactions entre les conditions de traitement dans tous les cas. L'ANOVA traduit des différences des taux d'inhibition dans la majorité des cas (Fig.29)

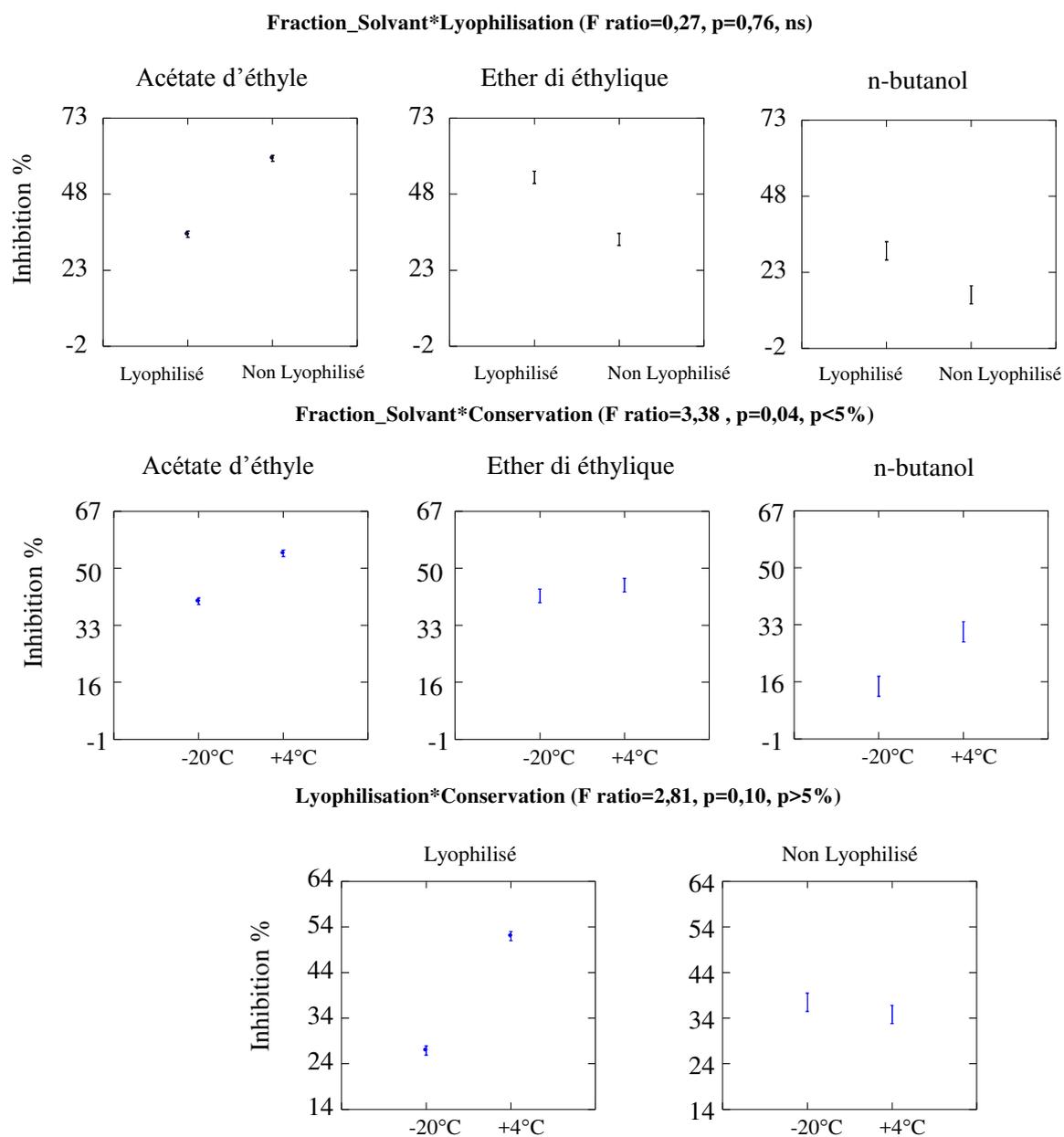
On peut constater une inhibition de l'oxydation significativement différente dans l'interaction fraction solvant x conservation x lyophilisation (F ratio=0.96, p= 0,132), le taux d'inhibition le plus élevé a été obtenu pour les trois fractions avec les pelures de pommes conservées à 4°C et lyophilisées et pour les pelures non lyophilisées le meilleur taux d'inhibition a été obtenu par celles conservées à -20°C dans la fraction acétate d'ethyl (Fig.29).

L'interaction lyophilisation x fraction flavonoïques n'est pas significative en comparaison avec l'interaction conservation x fraction flavonoïque (Fig.30). Les effets des interactions conservation x lyophilisations et conservation x fractions solvant sont significativement différents (Fig. 29).

De la synthèse des résultats de ces analyses, on peut résumer que les meilleurs pourcentages d'inhibition sont obtenus chez les fractions flavonoïques avec les solvants acétate d'éthyle et éther di éthylique, issus de pelures de pommes lyophilisée ou non.



Frac\_solv \* conservation \* lyophilisation, F ratio = 0,96, P= 0,132 ns



**Figure 29** : Effets des facteurs physiques combinés sur l'inhibition de l'oxydation par les extraits flavoniques obtenus à partir des pelures de pomme

## Discussion

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits polyphénoliques obtenus par macération à l'éthanol et par décoction à l'eau bouillante et des extraits flavoniques obtenus par extraction par l'intermédiaire de solvants à polarité croissante contenus dans les pelures de pomme "*Golden Delicious*" conservées à deux températures différentes (4°C et -20°C) et soit lyophilisées ou non, ainsi que la détermination du taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes sous l'influence des paramètres température et lyophilisation.

Les tests phyto-chimiques effectués sur les différentes solutions éthanoliques préparées, par macération de pelures de pommes conservées à 4°C lyophilisées et non lyophilisées et de pelures de pommes conservées à -20°C lyophilisées et non lyophilisées, ont révélé la présence de polyphénols totaux par l'apparition d'une couleur vert noirâtre.

La présence aussi de flavonoïdes où la solution a pris la couleur orange ainsi que la présence de tanin qui ont été révélés par l'apparition de la couleur rouge ainsi que la formation de flocon qui est apparu dans les solutions éthanolique de pelures de pomme conservées à -20°C et lyophilisées.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Bouquet et Fouret (1975) où ils ont observé les mêmes couleurs pour chaque type de polyphénols sur leurs extraits de plantes. Ainsi nous supposons que la détermination de présence ou d'absence des différentes classes de polyphénols se fait par les mêmes réactifs pour différents types de plantes.

Cependant, nous observons l'absence des anthocyanes dans les différentes solutions éthanoliques car selon la littérature et les travaux menés par plusieurs chercheurs (Ignat 2011) ont conclu que les anthocyanes étaient présents dans les pommes de couleur rouge (Red Delicious, Fuji).

Le teste phyto-chimique réalisé sur les solutions aqueuses a donné des résultats négatifs car d'après (Renard et *al.*) ceci s'exprime par la destruction des membranes plasmiques (vers 50°C), puis des structures pariétales (à haute température), donc à la dégradation de la structure phénolique des polyphénols et ceci sous l'effet des enzymes libérées ou de réactions chimiques.

Les résultats concernant les rendements en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été calculés après évaporation sous vide des différentes solutions éthanoliques ont montré que pour les pelures de pommes conservées à 4°C lyophilisées et non lyophilisées le rendement était inférieur à celui obtenu à partir de pelures de pommes conservées à -20°C et lyophilisées.

Cependant, le rendement en polyphénols des pelures de pomme conservées à -20°C a donné le plus faible rendement. Quant aux différents extraits flavonoïques le meilleur rendement a été observé dans les fractions Diéthyléther et acétate de méthyle pour les pelures de pommes conservées à -20°C lyophilisées ou non.

Les mêmes résultats ont été observés dans les travaux de Van der Sluis et *al.*, (2001) qui ont démontré que la conservation de plus de 120 jours a diminué le taux en polyphénols totaux ainsi que (de Ancos et *al.*, 2000) observent peu de diminution des teneurs en polyphénols totaux de nombreux fruits pendant la congélation.

Selon Guyot (2002) dans les pommes de table, 50 % des polyphénols sont concentrés dans les parties épidermiques et sous-épidermiques, avec des teneurs de 3 à 6 fois celle de la chair. Ainsi, dans la chair les polyphénols totaux représentent entre 0,33 et 0,93 mg/g du poids frais (Tsao 2003). Nos résultats ont donné des teneurs plus faibles et ceci semblerait peut-être dû aux facteurs environnementaux qui influencent également le contenu en polyphénols des fruits, qu'il s'agisse de l'effet de facteurs isolés (température, rayonnement) ou de combinaisons complexes de facteurs (effet des variations climatiques, effet de la région de production).

Par exemple, des légumes exposés à la lumière solaire contiennent davantage de flavonoïdes que des légumes cultivés sous ombrage (Watzl., 2001) et dépend aussi du matériel étudié (fruit frais, pelures, cortex, pépins, jus...)

Les travaux de Georgé et *al.* (2011) sur la tomate ne montrent pas d'influence de la lyophilisation sur les polyphénols totaux alors qu'elle impacte d'autres nutriments de la tomate. D'autre part, l'étude de trois procédés de séchage de pommes Granny Smith permet de conclure que la lyophilisation est la meilleure technique pour conserver les polyphénols (92 % sont préservés) (Henriquez 2013b).

Les résultats obtenus concernant l'activité antioxydante des polyphénoliques et flavoniques ont donné des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70%, cependant leur IC50% était supérieur à celui de l'Acide ascorbique sauf pour la fraction flavonique qui est obtenue par le n butanol qui a donné un IC50% inférieur à celui de l'Acide ascorbique.

Il est bien connu que le stockage des fruits et des légumes à basse température à 4°C, après la récolte jusqu'à la consommation est un moyen efficace pour préserver la qualité et la valeur nutritionnelle, y compris pour des stockages prolongés de 4 à 12 mois (Golding 2001, MacLean 2006, Van der Sluis 2001), car les activités antioxydantes ainsi que le taux en polyphénols augmentent pendant le premier mois de stockage puis déclinent par la suite. Ceci a été déterminé par (Sacchetti *et al.* 2008) en comparant sept variétés de pommes fraîches ou en purée.

D'autre part, les polyphénols sont stables lors de la congélation. Il n'y a pas de pertes en polyphénols totaux ni à la congélation ni durant le stockage de jus de framboise (De Ancos 2000). Un stockage à -15°C n'affecte pas non plus la capacité antioxydante de fruits tels que les pommes, les fraises, les poires et les figues sur 90 jours (Jeusti Bof 2012).

Des études ont été réalisées sur la conservation de la fraise à -5°C et -18°C durant un mois, ces expériences ont montré que la conservation à -18°C est plus avantageuse que celle à -5°C, pour les polyphénols, les vitamines hydrosolubles (vitamine C) et les anthocyanes.

Alors qu'elle est plus favorable à -5°C pour les vitamines liposolubles (vitamine E, bêta-carotène), ils sont notés que la dégradation de ces substances est en fonction de l'état physiologique du produit, de l'écart entre la récolte et le conditionnement, leurs résultats ont montré une relation exponentielle existant entre la durée de conservation et la température de stockage, pour les polyphénols et les anthocyanes Hanna., 2003.

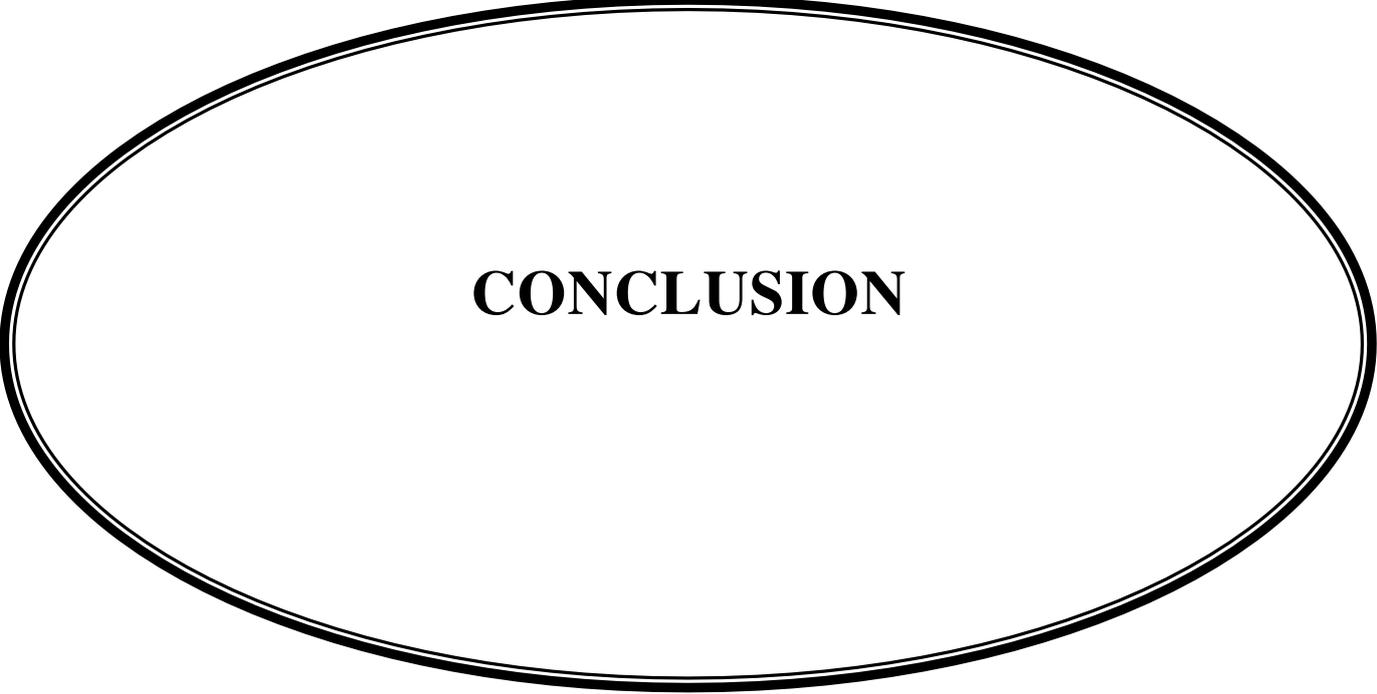
Selon deux études britanniques (Burch., 2013 et Bonwick&Birch,2014) les chercheurs ont utilisé des produits (fruits et légumes) achetés dans des supermarchés britanniques. Ils ont conservé les produits frais dans un réfrigérateur à 4°C pendant 3 jours, et les produits surgelés au congélateur à -20°C après blanchiment. Ceci reproduisait la situation d'un consommateur qui ferait ses courses deux fois par semaine. Après conservation, les chercheurs ont analysé les concentrations en vitamine C, polyphénols, anthocyanines, lutéine et bêta-carotène.

Les concentrations mesurées dans les produits surgelés ressemblaient à celles des produits frais avant conservation au réfrigérateur. Mais les concentrations en vitamines et antioxydants avaient diminué pendant la conservation, pour atteindre des niveaux souvent inférieurs aux produits surgelés.

D'après tous ces résultats et les recherches faites par Wolfe et *al.* (2003) montrent qu'il est indispensable d'appliquer une méthode d'inactivation de la PPO et de la POD sur les échantillons de pommes avant ou après la lyophilisation étant donné que l'évolution des polyphénols ne dépend pas de leur affinité avec le milieu car les composés phénoliques se solubilisent aussi bien dans l'eau que dans l'éthanol. En revanche, la présence d'eau semble être un des facteurs responsables de la reprise en activité des enzymes.

D'autre part les concentrations en composés polyphénoliques ainsi que leurs activités antioxydantes dépendent des solvants utilisés pour leur extraction, du temps d'extraction ainsi que de la quantité de substance contenue dans la matière végétale (Quan et *al.*, 2013).

Plusieurs travaux ont démontré que l'extraction au méthanol était la première suivie par l'extraction à l'éthanol ensuite l'extraction à l'eau chaude. Cependant, dans notre étude l'utilisation du méthanol a été évitée vu que ce dernier est très toxique et que nous voulions déterminer les activités antioxydantes pour une éventuelle valorisation dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique.



**CONCLUSION**

Le travail de ce mémoire a été réalisé au niveau du laboratoire de biotechnologie et valorisation des plantes aromatiques et médicinales faisant partie du Département d'agronomie de l'Université SAAD DAHLEB de Blida.

Le travail entrepris a porté sur d'éventuelles variations de rendement et d'activité antioxydante des composés phénoliques et flavoniques contenus dans les pelures de pomme *Golden Delicious* conservées à deux températures différentes (4°C et -20°C) lyophilisées et non lyophilisées.

Tout d'abord notre recherche a débuté par la lyophilisation d'une partie des pelures de pomme conservées à 4°C et -20°C et l'autre partie des pelures a juste été coupée en petits morceaux, ensuite ces dernières (pelures lyophilisées et non lyophilisées et conservées aux deux températures différentes chacune) ont subi une décoction à l'eau bouillante et une macération à l'éthanol aqueux, afin d'extraire les polyphénols totaux à la fin de chaque solution éthanolique obtenue et fractionnée à l'aide de différents solvants à polarité croissante, afin d'extraire les flavonoïdes.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement en polyphénols était nettement supérieur dans les pelures de pommes lyophilisées et conservées à -20°C que celle lyophilisées et conservées à 4°C. Cependant, la lyophilisation n'a pas eu d'influence sur les pelures de pommes conservées à 4°C, car leur rendement en polyphénols était presque identique à celui des pelures conservées à 4°C et non lyophilisées.

Concernant les différentes fractions flavoniques le rendement était supérieur dans les fractions extraites à partir du solvant Acétate d'éthyle pour les pelures de pomme conservées à 4°C et -20°C et non lyophilisées, alors que l'extraction n-butanolique a donné un meilleur rendement pour les pelures conservées à 4°C et lyophilisées, l'éther d'éthyle a donné des rendements supérieurs dans les fractions obtenues à partir de pelures de pommes lyophilisées et conservées à 4°C et à -20°C.

Pour l'activité antioxydante le pourcentage d'inhibition à 50% dans les extraits polyphénoliques n'a pas pu être atteint et cela est dû au fait que leur pourcentage dépasse 80% à des concentrations de 2 à 4mg/ml et leur I50% était beaucoup plus supérieur que I50% de l'acide Ascorbique.

Il fallait donc diluer encore plus les extraits pour atteindre 50% d'inhibition.

Or pour les fractions flavoniques le pourcentage d'inhibition à 50% a pu être atteint surtout dans la fraction n butanolique des pelures de pommes conservées à -20°C et non lyophilisées.

Donc on peut dire que la lyophilisation et la conservation à -20°C sont deux paramètres à adopter pour une bonne conservation des coproduits de fruit et que ces deux paramètres permettent de garder la composition/concentration de base en composés polyphénoliques et que l'extraction des fractions flavoniques au n butanol a donné un meilleur rendement et une bonne activité antioxydante pour les pelures de pommes conservées à -20°C et non lyophilisée.

A la lumière de ces résultats cette étude préliminaire nécessite d'autres recherches qui s'intéressent à :

- La valorisation des coproduits de la pomme dans des produits agroalimentaires et à la formulation de produits parapharmaceutiques
- L'étude in vivo de l'effet des coproduits de la pomme sur le stress oxydant en mesurant l'activité des enzymes antioxydante (Catalase, Superoxyde dismutase)
- Détermination d'autres activités comme : activité antimicrobienne, anticancéreuse, antidiabétique et anti-inflammatoire.

## Références bibliographiques

---

**Ackermann, J., Fischer, M. et Amado, R. (1992).** Changes in sugars, acids and amino acids during ripening and storage of apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1131-1134.

**Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. et Nicolas, J. (1992).** Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57, 958-962.

**Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. (2000).** *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits.* *Analyst.*; 125 (5): p989-1009

**Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM. (2004)** *Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population.* *J. Agric. Food Chem.*; 52 (5): p1124-1131

**Baron, A., Le Quéré, J.-M. et Drilleau, J.-F. (2007).** Des fruits aux jus de fruits et produits fermentés. T. C. R. Jeantet, P. Schuck, G. Brulé (Ed.), *Science des aliments, biochimie, microbiologie, procédés, produits: Technologie des produits alimentaires* (215-250). Editions Tec & Doc Lavoisier.

**Bonwick G., Birch CS. (2014).** *Antioxydants in Fresh and Frozen Fruit and Vegetables: Impact Study of Varying Storage Conditions.* University of Chester.

**Bouquet A., Fouret A. (1975)** Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du Congo-Brazzaville. *FITOTERAPIA.* 46(4)

**Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; *Plant Science*, 161, 839-851.

**Boyer, J. and R. H. Liu (2004).** *Apple phytochemicals and their health benefits.* *Nutrition Journal*; 3 (12): p1-45

**Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C., (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, 25-30

**Burch R. (2003).** Nutritional content of fresh vs frozen foods. Leatherhead Food Research,

**De Ancos, B., Gonzalez, E., and Cano, M. P. (2000).**Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(8), 3542-3548.

**De Ancos B., Gonzalez E.M., Cano M.P. (2000).** Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4565–4570.

**De Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. (2006)** *Analytical separation and detection methods for flavonoids.* Journal of Chromatography A.; 1112: p31-63

**Escarpa, A. et Gonzalez, M. C. (1998).**High-performance liquid chromatography with diode array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography*, 823, 331-337.

**Foo, L. Y. et Lu, Y. R. (1999).**Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry*, 64, 511-518.

**Forkmann J et Martens S. (2001).** Metabolic engineering and application of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:155-160.

**Franks F. (1998).** Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45: 221–229.

**Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V. et Moutounet, M. (1998).** A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins.

*Phytochemistry*, 47, 1401-1407.

**Georgé S., Tourniaire F., Gautier H., Goupy P., Rock E., Caris-Veyrat C. (2011).** Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilization of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry* 124: 1603–1611.

**Ghestem A., Segun E., Paris M., Orecchioni A-M. (2001).** Le préparateur en pharmacie :

Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 273

**Golding J.B., McGlasson W.B., Wyllie S.G., Leach D.N. (2001).** Fate of apple peel phenolics during cool storage. *J. Agric. Food Chem.* 49:2283-2289.

**Guyot S., Le Bourvellec C., Marnet N., Drilleau J.F. (2002).** Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Food Science and Technology* 35: 289-291

**Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P. et Drilleau, J. F. (1998).** Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1698-1705

**Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155

**Hanna L. (2003).** Effet de la congélation sur les antioxydants naturels quelques légumes et fruits. / sous la direction du Dr A. Bassal – Extrait de : Annales de recherche scientifique – N°4 (2003), pp. 121-132

**Henríquez C., Almonacid S., Lutz M., Simpson R., Valdenegro M. (2013b).** Comparison of three drying processes to obtain an apple peel food ingredient. *Journal of Food* 11: 127-135.

**Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999).** "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." *Journal of the Institute of Brewing* 105(3): 191-195.

**Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. (1992)** Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*; 40 (9): p1591-1598

**Jeusti Bof C.M., Fontana R.C., Piemolini-Barreto L.T., Sandri I.G. (2012).** Effect of Freezing and Processing Technologies on the Antioxidant Capacity of Fruit Pulp and Jelly. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55: 107-114.

**Kar, A. (2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. Ed 2: New Age International

Publishers, 1-30.

**Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., et Lee C.Y. (2003)** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51 (22), 6509-6515.

**Lawson AM. (2006)** *Etude Phytochimique d'une Fabacée tropicale*. Sciences de la Vie et de la Santé, Sciences Pharmaceutiques – Phytochimie/Biologie, Université de Limoges;

**Lister CE, Lancaster JE, Walker JRL (1996).** *Developmental changes in enzyme of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars*. *J. Sci. Food. Agric.*; 71 (3): p313-320

**Lu, Y. et Foo, L. Y. (1997).** *Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace*. *Food Chemistry*, 59, 187-194.

**Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005)** *Les Composés Polyphénoliques des végétaux*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes

**Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Billot, J. (1990).** Fruit phenolics (pages: 392). Boca Raton Etats-Unis: CRC.

**MacLean D.D., Murr D.P., Deell J.R., Horvath C.R. (2006).** Postharvest variation in apple (*malus x domestica* Borkh) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *J. Agric. Food Chem.* 54:870-878. a fermented black carrot beverage. *J. Agric. Food Chem* 52: 3807-13.

**Marfak A., (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p

**Mohammad F. Turk, Alain Baron and Eugene Vorobiev.** Effect of pulsed electric fields treatment and mash size on extraction and composition of apple juices. 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 9611-9616.

**Moreiras Tuni, O., Carbajal, Á., Cabrera Forneiro, L. et Cuadrado Vives, C. (2004).** Tablas de composición de alimentos (pages: 144). Madrid Espagne: Piramide Ediciones.

- Ojeil A., El Darra N., El Hajj Y., Bou Mouncef P., Rizk T.J. et Maroun R.G. (2010).** Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau Ksara. *Lebanese Science Journal* 11.
- Oleszek, W., Lee, C. Y., Jaworski, A. et Price, K. R. (1988).** Identification of some phenolic compounds in apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 430-432.
- Omata Y., Yoshida Y., Niki E. (2010).** Assessment of the antioxidant capacity of natural fruit extracts by inhibition of probe decay and plasma lipid peroxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 531-535.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F. (2008).** Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Diinocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 106, 1264 -1270.
- Podsedek, A., Markowski, J., Wilska-Jeszka, J. et Anders, B. (2000).** Compositional Characterization of some apple varieties. *European Food Research and Technology*, 210, 268-272.
- Powers, SK., Smuder, AJ., Kavariz , AN., Hudson, M.B. (2010).** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20, 2-14.
- Quan V Vuong., Hirun S., Paul D. Roach., Michael C. Bowyer., Phoebe A. Phillips and Christopher J. Scarlett. (2013)** Effect of extraction conditions on total phenolic compound and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts, *journal of herbal medicine*. 3: 104–111.
- Renard C.M.G.C (2005).** Effects of conventional boiling on the polyphenols and cell walls of pears. *J Sci Food Agric* 85: 310–318.
- Sacchetti G., Cocci E., Pinnavaia G.G., Mastrocola D., Rosa M.D. (2008).** Influence of processing and storage on the antioxidant activity of apple derivatives. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 797–804.

**Sadilova E, Carle R, Stintzing FC. (2007)***Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity.* Mol Nutr Food Res.; 51 (12) : p1461-1471

**Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, and Kanazawa K. (2003)***Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas.* J. Agric. Food Chem.; 51 (3): p571-581

**Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., et Saura-calixto F.(1998).**A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal Science Technology International. 8, 121-137.

**Sanoner, P. (2001).**Les polyphénols de la pomme à cidre : Diversité variétale et oxydation.

Doctorat. Université de Caen. Caen France

**Sanoner, P., Guyot, S. et Drilleau, J. F. (1998).***Characterisation of the phenolic compound classes in four cider apples cultivars by thiolysis and HPLC.* XIXth International Conference on Polyphenols, Group Polyphenol Phytochemical Society of Europe. Lille(France).

**Saura-Calixto, F. (1987).** Dietary fibre complex in a sample rich in condensed tannins and uronic acids. Food Chemistry, 23, 95-103.

**Singleton V.L. et Rossi J.A. (1965)**Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. 16, 144-153.

**Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007).**"Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in

Processing Apple Varieties." AgricSciChina 6 (5): 607-612.

**Stéphane B. (2005)***Stratégie d'étude de produits de l'oxydation de polyphénols par LC/MS : application au jus de pomme.* Biologie, Université de Rennes I;

**Teuber, H., Wunscher, G. et Herrmann, K. (1978).**Flavonol glycosides of apples (*Malus silvestris*mill).10. Phenolics of fruits. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, 166,80-84.

**Tsao R., Yang R., Young C, Zhu H. (2003).**Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51: 6347–6353.

**Van der Sluis A.A., Dekker M., De Jager A., Jongen W.M.F. (2001).**Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3606-3613.

**Wang H., Cao G., Prior R. (1996).**Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem*701-705.

**Wolfe K.L., Liu R.H. (2003).** Apple peels as a value-added food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1676–1683.

**Yanez J-A ., Anderus P-K ., Davies N-M. (2007).**Methods of analysis and separation of chiralflavonoïds *.Journal of Chromatography*, B848:159-181

### **Références électroniques:**

- Croqueurs de pommes : <http://www.croqueurs-de-pommes.asso.fr>
- FAOSTATS (FAO United Nations): <http://faostat.fao.org/>
- Les crêts fruits et pomologie, Etat des Ressources génétiques du pommier : <http://pomologie.com/pomme1/datapom/types.htm>
- Section Nationale Pomme : <http://www.lapomme.org/>
- Tous les fruits, Pomme : <http://tous-les-fruits.com/fruit-320.html>

## Résumé

La pomme fait partie des fruits les plus consommés, car ils sont considérés comme des aliments bénéfiques pour la santé, de par leur richesse en fibres et leur faible teneur en lipides. Un bénéfice additionnel de la pomme est sa richesse en polyphénols et en vitamines et aussi en "antioxydants". L'objectif de ce travail est de s'assurer que la transformation des épidermes de la pomme *Golden Delicious* conservées à 4°C et à -20°C en poudre lyophilisée et non lyophilisée n'engendre pas de perte en antioxydants et cela en tenant compte des différentes techniques d'extraction que ce soit par décoction à l'eau bouillante ou par macération dans l'éthanol aqueux ou autres solvants utilisés pour l'extraction des polyphénols totaux ainsi que les différentes fractions flavoniques. Les coproduits de pommes étant initialement riches en polyphénols/antioxydants, il est pertinent d'essayer de tirer profit de ces propriétés pour une éventuelle valorisation en produit à usage alimentaire et pharmaceutique. Les résultats obtenus ont montré que la lyophilisation n'a pas eu d'influence sur les pelures de pomme conservées à 4°C et que l'extrait n butanolique a donné un meilleur rendement pour les pelures conservées à 4°C et lyophilisées. Par contre les pelures de pommes conservées à -20°C et non lyophilisées ont montré une meilleure activité antioxydante.

Mots clés : Pomme, polyphénols, antioxydant, lyophilisation, conservation.

## Abstract

The apple is one of the most consumed fruits because it is considered as a healthful food as it has a high fiber but a low lipid content. An additional benefit of the apple is its content of polyphenols and vitamins that give it a label as rich of "antioxidants" and "healthy food".

The aim is to ensure that the processing of the "*Golden Delicious*" apple epidermis stored at 4° C and -20° C into a lyophilized powder does not lead to a loss of antioxidants and this also taking into account the different solvents used for the extraction of total polyphenols as well as the various flavonic fractions. As the apple byproducts are initially rich in polyphenols / antioxidants, it is relevant to try to take advantage of these properties for a possible valorization in product for food and pharmaceutical use.

The results obtained showed that lyophilization had no influence on the apple peels stored at 4 ° C and that the n-butanol extract gave a better yield for peels preserved at 4 ° C and lyophilized. On the other hand apple peels preserved at -20 ° C and not lyophilized gave a better antioxidant activity.

Key words: Apple, polyphenols, antioxidant, lyophilization, conservation.

## ملخص

تنتمي التفاحة إلى تلك الفواكه الأكثر استهلاكاً كونها تعتبر كأغذية مفيدة للصحة حيث أنها غنية بالألياف وتحتوي على نسبة منخفضة من الدهون. كما أن للتفاحة ميزة أخرى وهي احتوائها على مادة البوليفينول والفيتامينات والتي تعطيها صبغة الغناء بالمواد "المضادة للأكسدة" و "غذاء صحي".

ويكمن الهدف في التأكد من أن تحول بشرة تفاحة "*Golden Declicious*" التي تم حفظها في درجات 4 ° و 20 ° تحت الصفر في شكل مسحوق مجفف بالتجميد لا يتسبب في فقدان مضادات الأكسدة وذلك بالأخذ في الاعتبار كذلك مواد الذوبان المختلفة والمستعملة لاستخراج البوليفينولات الكاملة وكذا الأجزاء الفلافونية المختلفة.

وبما أن المنتجات المشتركة للتفاح تعتبر مبدئياً غنية بالبوليفينولات ومضادات الأكسدة، فإنه من المناسب محاولة الاستفادة من هذه الخصائص بهدف تثمينها المحتمل كمنتوج للاستعمال الغذائي والصيدلاني.

لقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن عملية التجفيف بالتجميد لم تؤثر على قشور التفاح المحفوظة على 4 °C درجات فوق الصفر وأن مستخلص "n butanol" أعطى مردوداً أفضل بالنسبة للقشور المحفوظة على 4 °C درجات فوق الصفر والمجففة بالتجميد.

وعلى العكس من ذلك فإن قشور التفاح المحفوظة على 20 °C - والتي لم تجفف بالتجميد، فقد أظهرت نشاط مضاد للأكسدة أفضل.

كلمات مفتاحية: تفاحة، بوليفينول، مضاد الأكسدة، تجفيف بالتجميد، حفظ.