

Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologies



En vue l'obtention de diplôme de Master en Biotechnol

Option : Biotechnologies et Valorisation des plantes

Thème

Caractérisation chimique de différents extraits de pommes locales et leur valorisation en phytothérapie

Présenté par :

- BARKAT Djallila
- DJEBIL Khadidja

Devant le jury :

- | | | |
|---------------------------------|------------------|--------------|
| - M ^{me} ALLAL L. | Professeur (UB1) | PRESIDENTE |
| - M ^{me} CHEBATA N. | MAA (UB1) | EXAMINATRICE |
| - M ^{me} BELGUENDOZ R. | MCA (UB) | PROMOTRICE |

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Avant toutes choses, Nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et notre vive connaissance à **Mme Belguendouz Rachida**, maitre de conférence classe A au département des Biotechnologies à l'université Blida 1, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous accordé pour nous permettre de réaliser ce travail.*

*Notre profonde gratitude est à **Dr OUABEDELSSALAM ILYAS** et **Mr DILMI Redha** chargés de stage au niveau CRAPC-BOUISMAIL, ainsi **Mr TEFACHI** chef de service au niveau de laboratoire d'hygiène Blida ; qui nous ont dirigés au cours la réalisation de la partie expérimentale. Nous les remercions pour leurs conseils pertinents et leurs disponibilités.*

*Nous adressons nos sincères remerciements au professeur **Mme ALLAL**, département de Biotechnologies à l'université Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons également nos vifs remerciements à **Mme CHEBATA**, maitre assistant classe A au département de Biotechnologies à l'université Blida 1 pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Nous adressons nos remerciements et notre reconnaissance Aux personnels de différents laboratoires du centre de recherche d'analyses physiques et chimiques CRAPC – BOUISMAIL pour leur aide, en particulier **Mr SAID OTMANI**, **Mr DJEZIRI**, **Melle GHALLIAOUI** et **Mme Touati**.*

Nous adressons nos remerciements et notre reconnaissance à tous les enseignants, étudiants et travailleurs de l'université Blida 1, qui ont contribué de près ou de loin à notre formation pédagogique et scientifique.

*Nous ne saurons oublier tous ceux et celles qui nous ont marqué par leurs soutien et encouragements : en particulier **Mr HATTALI** et **Mr SAADI**, tous les membres de laboratoire (PFE) : en particulier **Mme KETFI** et tous les collègues de notre promotion, on leur exprimant notre respect et notre profonde sympathie.*

Dédicace

C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à :

*Mes très **chers parents**; je vous adresse ici toute mon affection et ma plus profonde estime. Merci de m'avoir menée là où j'en suis aujourd'hui. Les mots me manquent et je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment pour tout l'amour, les sacrifices, la tendresse et la confiance que vous m'avez témoignée. Merci d'avoir pu comprendre et supporter ma distance et pour m'avoir laissée la liberté de suivre mon propre chemin. Cet achèvement je vous le dois.*

*Cette thèse vous est particulièrement dédiée **MAMA***

*A mon âme sœur **Hadjer** et mon adorable frère **Mahfoud**, pour leurs aides, soutiens et encouragements*

*Je n'oserai guère laisser passer inaperçue, la présence émouvantes de la princesse de ma vie **RASHA** et mes chers neveux **IYAD** et **ABDELSSAMAD**, vous êtes le rayon de soleil de notre vie.*

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à une personne extraordinaire, mon cher époux, les quelques phrases que je me permets ici de t'adresser ne suffisent pas pour exprimer tout le respect, la reconnaissance et l'affection que j'éprouve envers toi. Merci pour ton optimisme invincible, ta patience admirable, ton énorme soutien, tes vivaces encouragements. Pour toute ta gentillesse, ton humour, ta disponibilité et ta patience

*A mes **beaux parents**, Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour vous faire part de mon profond attachement et vous assurer de toute mon affection merci pour vos aides et disponibilité*

*A mes très chères **tantes et** mes adorables **cousins et cousines** pour leurs prières et encouragements*

A la mémoire de nos regrettables dont les souvenirs nous accompagnent toujours

*A mon partenaire de travail, très chère binôme **KHADIDJA***

Ainsi, qu'à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail

DJALLILA

DEDICACES

Je dédie le fruit d'études à :

A la mémoire de: mon père

mère, tu m'as tant donné, parfois un mot suffisait pour me donner du courage, de suivre ma voie, merci pour ta présence.

Mes chers frères : Mohamed, Oussama et Anes

hommage : à ma

A mes deux petites filles : imene et rahima
djallila

Mon binôme

Tous ceux qui m'aiment.

Tout les gens qui nous ont aidé.

KHADIDJA

Résumé :

Malus domestica est le pommier commun qui produit la pomme classé de point de vue consommation après l'orange en Algérie. L'importance socioéconomique de ce fruit mérite l'évaluation de son impact sur la santé par l'étude et la valorisation de ses propriétés thérapeutiques. Les résultats ont révélé que les parties du fruit pomme (écorce et pulpe) sont riches en eau avec plus de 82%. La composition phytochimique montre la présence de noyaux aromatique, groupement phénolique, groupement hydroxyle ainsi qu'une fonction cétone qui appartiennent aux composés phénoliques. Les analyses par HPLC ont confirmé la richesse en acides phénolique : Acide cinnamique, Acide gallique, Acide ascorbique, Acides P caumarique, Acide salicylique et l'acide vanillique ; en deux types de flavonoïdes: les flavonols et les flavonones : Quercitine, myricitine, catéchine, épicatechine, kaempfrol, rutine, naringinine et le résorcinol qui est un diphénol. *Les composés les plus abondants sont les flavonols et les acides cinnamiques.* Les résultats de l'activité biologique des extraits d'écorce et de pulpe des fruits de deux variétés *Golden delicious* et *Royal gala* révèlent une légère activité par rapport a la Vit C, de plus, l'extrait d'écorce de pomme a un pouvoir réducteur plus important que celui de la pulpe. Ainsi, la fraction d'acétate d'éthyle présente l'activité réductrice la plus élevée par rapport à la fraction butanolique et aqueuse. Pour l'activité antimicrobienne, tous nos extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées : *E.Coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, ainsi *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Ce qui confirme que es extraits présentent des propriétés antimicrobiennes dont les plus sensible sont *Salmonella spp*, et *Staphylococcus aureus* et la souche fongique *Candida albicans*. Ces résultats montrent l'importance de ces extraits comme compléments alimentaires pour une prévention contre certaines maladies.

Mots clés : *Malus domestica*, écorce et pulpe, phytochimie (Hplc, FTIR), Activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract :

Malus domestica is the common apple tree. Apples are classified after the oranges in Algeria. The socio-economic importance of this fruit deserves the evaluation of its impact on health by studying and valorisation of its therapeutic properties. The results revealed that the apple (bark and pulp)are rich in water more than 82%. The phytochemical composition shows the presence of aromatic nuclei, phenolic group, and hydroxyl group as well as a cetone functions which belong to the phenolic compounds. HPLC analyzes confirmed the high content of phenolic acids: cinnamic acid, gallic acid, ascorbic acid, caumaric acid, salicylic acid and vanillic acid; there are also two types of flavonoid: flavonols and flavonones: Quercitin, myricitin, catechin, epicatechin, kaempfrol, rutin, naringinine and resorcinol which is a diphenol molecule. The most abundant compounds are flavonols and cinnamic acids. The results of the biological activity of the bark and pulp extracts of two varieties *Golden Delicious* and *Royal Gala* reveal that apple reducing power are less than Vit C in general but the bark extract has a greater reducing power than pulp. Also, the ethyl acetate fraction has the highest reductive activity compared to the butanolic and aqueous fraction. For the antimicrobial activity, all our extracts reacted positively on at least one of the microbial strains tested: *E.Coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Candida albicans*, *Aspergillus niger* which confirms that the extracts have antimicrobial properties, the most sensitive of which are *Salmonella spp*, and *Staphylococcus aureus* and the fungal strain *Candida albicans*. These results show the importance of these extracts as dietary supplements for prevention against certain diseases.

Key words: *Malus domestica*, bark and pulp, phytochemistry (Hplc, FTIR), antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص:

Malus domestica هي فاكهة التفاح والتي تصنف الثانية بعد البرتقال من حيث الاستهلاك في الجزائر. إن الأهمية الاجتماعية والاقتصادية لهذه الفاكهة تستدعي تقييم تأثيرها على الصحة و ذلك من خلال دراسة وتطوير خصائصها العلاجية. حيث أظهرت النتائج أن مستخلص لحاء ولب فاكهة (التفاح) غني بالماء بنسبة تفوق 82%. ويظهر التركيب الكيميائي النباتي وجود نواة العطرية، مجموعة الفينول، مجموعة الهيدروكسيل وظيفية سيتون وهذا ما يصف مركبات الفينول. إن تحليل HPLC أكد أن فاكهة التفاح غنية بالأحماض الفينولية: حمض سيناميك، حمض الغال وحمض الاسكوربيك والأحماض Pcaumarique ، حمض الصفصاف ونوعين من مركبات الفلافونويد: مركبات الفلافونول مثل كرسيتين، ميريسيتين، كاتشين، بيبكاتشين، كامفيرول و روتين، أيضا مركبات الفلافونون مثل نارنجينين بالإضافة الى الريسورسنول والذي يعتبر ثنائي الفينول. أكثر المركبات وفرة هي الفلافونول وأحماض سيناميك. كشفت نتائج النشاط البيولوجي لمستخلصات لحاء ولب نوعين من التفاح Golden delicious et Royal gala على أن النشاط المضادة للأكسدة للتفاح ضعيف جدا مقارنة بالفيتامين س. إلا أن نشاط الأكسدة للحاء أكثر من اللب. كذلك ، فإن مستخلص الاستات له النشاط أعلى مقارنة بمتخلص البوتاني والمائي. أما النشاط مضاد الميكروبات، فكان رد فعل كل العينات من مختلف مستخلصاتنا إيجابا على واحد على الأقل من سلالات ميكروبية المستعملة : إشريكية قولونية ، سلمونيلا، مكورة عنقودية ذهبية و العصوية الشمعية بالإضافة للمبيضة بيضاء رشاشية سوداء وهذا ما يؤكد أن مستخلصات التفاح لها خصائص مضادة للميكروبات. هذه النتائج تظهر أهمية هذه المستخلصات كمكملات غذائية للوقاية من بعض الأمراض .

كلمات المفتاح : *Malus domestica* ، اللحاء واللب، والتركيب الكيميائي النباتي ، (FTIR ، HPLC) والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط المضادة للميكروبات.

Liste des abréviations

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Ech : Echantillon

Extrait EP : extrait d'écorce de pomme

Extrait PP : extrait de pulpe de pomme

HPLC : Chromatographie liquide a haute performance

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

IRFT : Infrarouge à Transformée de Fourier

Mg E/g Ps: Milligramme d'équivalent par gramme du poids sec de la plante.

SM : Solution mère

TE % : Teneur en eau exprimé en pourcentage

Var : Variété.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Microorganismes utilisés dans l'activité antimicrobienne.....	11
Tableau 2 : Rendement en extraits	23
Tableau 3 : Résultat de chromatogramme d'extrait d'écorce de pomme Var <i>Golden delicious</i> à 254nm.....	27
Tableau 4 : Résultat de chromatogramme d'extrait de pulpe de pomme Var <i>Golden delicious</i> à 254nm.....	28
Tableau 5: Résultat de chromatogramme d'extrait d'écorce de pomme Var <i>Royal gala</i> à 254nm.....	29
Tableau 6 : Résultat de chromatogramme d'extrait de pulpe de pomme Var <i>Royal gala</i> à 254nm.....	30
Tableau 7 : Valeurs des IC50 des différents extraits et témoin déterminées par le test au DPPH.....	34
Tableau 8 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne pour les extraits d'écorce de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Golden delicious</i>	35
Tableau 9: Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits de pulpe de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Golden delicious</i>	38
Tableau 10: : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits d'écorce de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Royal Gala</i>	41
Tableau 11 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits de pulpe de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Royal Gala</i>	42

Liste des figures

Figure 1 : Coupe longitudinale dans un fruit de <i>Malus domestica</i>	4
Figure 2 : Structure d'hydroxycinnamiques rencontrés dans la pomme.....	6
Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes.....	7
Figure 4 : Structure des dihydrochalcones de la pomme	7
Figure 5 : Extraction par soxhlet	13
Figure 6 : a- Affrontement et agitation b- Décantation de 2 phases c- Evaporation a sec a 40°C.....	14
Figure 7 : Conservation des extraits finaux	15
Figure 8 : Protocole d'extraction des composés phénoliques.....	16
Figure 9 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	18
Figure 10 a : Teneur en eau du fruit de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Golden delicious</i>	
b : Teneur en eau du fruit de <i>Malus domestica</i> Var. <i>Royal gala</i>	22
Figure 11 : Analyse de la variance (test GLM) sur la variation des rendements selon la variété, la partie du fruit et le solvant utilisé.....	23
Figure 12 : a- Spectre IRFT des fractions d'écorce de <i>Golden delicious</i>	25
b- spectre IRFT des fractions d'écorce de <i>Royal gala</i>	
Figure 13 : a- Spectre IRFT des fractions de pulpe de <i>Golden delicious</i>	25
b- spectre IRFT des fractions de pulpe de <i>Royal gala</i>	
Figure 14 : Identification des polyphénols de l'extrait d'acétate d'éthyle d'écorce de pomme Var <i>Golden delicious</i>	26
Figure 15 : Activité antioxydante de Vit C	32
Figure 16 : Activité antioxydante des extraits Var <i>Golden delicious</i>	33
Figure 17 : Activité antioxydante des extraits Var <i>Royal gala</i>	33
Figure 18 : Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP Var. <i>Golden delicious</i>	36
Figure 19 : Activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP Var <i>Golden delicious</i>	36
Figure 20 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique d'EP Var <i>Golden delicious</i>	37
Figure 21 : Activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'EP Var <i>Golden delicious</i>	37
Figure 22 : Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de PP Var <i>Golden</i>	

delicious.....	38
Figure 23 : Activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle de PP Var Golden delicious.....	39
Figure 24 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique de PP Var Golden delicious.....	39
Figure 25 : Activité antifongique de l'extrait butanolique de PP Var Golden delicious.....	40
Figure 26 : Activité antibactérienne de l'extrait aqueux de PP Var Golden delicious....	40
Figure 27 : Activité antifongique de l'extrait aqueux de PP Var Golden delicious.....	40
Figure 28 : Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP Var Royal gala.....	41
Figure 29 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique d'EP Var Royal gala.....	42
Figure 30 : Activité antibactérienne de l'extrait acétate de PP Var Royal gala.....	43
Figure 31 : Activité antifongique de l'extrait acétate de PP Var Royal gala.....	43
Figure 32 : Activité antibactérienne des GRAM -de l'extrait butanolique de PP Var Royal gala.....	44
Figure 33 : Activité antifongique de l'extrait butanolique de PP Var Royal gala.....	44
Figure 34 : Variation de l'activité antimicrobienne selon la partie du fruit, le solvant utilisé et la sensibilité des souches microbiennes.....	45
Figure 35 : Identification des polyphénols de l'extrait d'acétate d'éthyle PP Golden delicious.....	Annexe 3
Figure 36 : Identification des polyphénols de l'extrait Aqueux PP Golden delicious.....	Annexe 3
Figure 37 : Identification des polyphénols de l'extrait butanolique PP Golden delicious	Annexe 3
Figure 38 : Identification des polyphénols de l'extrait etherique PP Golden delicious...	Annexe 3
Figure 39 : Identification des polyphénols de l'extrait aqueux EP Golden delicious...	Annexe 3
Figure 40 : Identification des polyphénols de l'extrait butanolique EP Golden delicious	Annexe 3
Figure 41 : Identification des polyphénols de l'extrait etherique EP Golden delicious...	Annexe 3
Figure 42 : Identification des polyphénols de l'extrait acétate EP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 43 : Identification des polyphénols de l'extrait aqueux EP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 44 : Identification des polyphénols de l'extrait butanolique EP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 45 : Identification des polyphénols de l'extrait etherique EP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 46 : Identification des polyphénols de l'extrait acétate PP Royal gala.....	Annexe 3

Figure 47 : Identification des polyphénols de l'extrait aqueux PP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 48 : Identification des polyphénols de l'extrait butanolique PP Royal gala.....	Annexe 3
Figure 49 : Identification des polyphénols de l'extrait etherique PP Royal gala.....	Annexe 3

Table de matière

INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE I : Données bibliographiques	
I.1. Systématique.....	3
I.2. Description botanique	4
I.3. Caractéristiques générale.....	5
I.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des pommes.....	5
 II. Les composés phénoliques de la pomme.....	
II. 1. Les acides hydroxycinnamiques	6
II.2.Les flavonoïdes.....	6
II.3. Propriétés des composés phénoliques.....	9
a) Propriétés anti oxydante	9
b) Propriétés antibactériennes.....	9
c) Autres propriétés biologiques des composés phénoliques.....	9
II.4. Emplois thérapeutiques des composés phénoliques de pommes.....	10

Partie II : Travail expérimental

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	11
1.1. Matériel biologique.....	11
1.1.1. Matériel végétal.....	11
1.1.2. Les micro-organismes.....	11
 2. Méthodes	
2.1. Etude phytochimique.....	12

2.1.1. Préparation des poudres.....	12
2.1.2. Détermination de la teneur en eau.....	12
2.1.3. Extraction des composés phénoliques.....	12
2.1.4. La lyophilisation	15
2.1.5. Calcul du rendement des extraits	17
2.1.6. La spectrophotométrie à Infrarouge.....	17
2.1.7. Analyse par chromatographie liquide à haute performance.....	17
2.2. Evaluation des activités biologiques.....	18
2.2.1. Essai d'évaluation de l'activité antioxydante.....	18
2.2.2. Essai d'évaluation de l'activité antimicrobienne	19
3. Analyses statistiques	21

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude phytochimique	22
I.1. Teneur en eau des pommes.....	22
I.2. Rendement en extraits	23
I.3. Résultat spectroscopie infrarouge FTIR	24
I.4. Analyse chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	26
II. Activités biologiques des différents extraits de pommes.....	32
II.1. Activité antioxydante	32
II.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques.....	34
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	48
RÉFÉRENCES.....	50
ANNEXE	

Introduction

INTRODUCTION

Les fruits sont intégrés dans l'alimentation humaine quotidienne depuis toujours. Ils ont des couleurs, des goûts et des arômes très attirants et constituant un des éléments essentiels du régime alimentaire à l'état frais ou sous forme de produits transformés. Les fruits constituent une source inépuisable de nutriments tels que les métabolites secondaires et primaires qui sont très importants pour la santé du consommateur.

Ces dernières années, nous avons assisté à un grand regain d'intérêt des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes. L'étude de ces dernières dates de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent-Györgyi en 1938 (**Szent-Györgyi, 1938**).

Des études épidémiologiques ont démontrés qu'une consommation régulière des flavonoïdes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et d'apparition de certains cancers (**Birtet al, 1999**). Les multiples effets bénéfiques des flavonoïdes et leurs propriétés pharmacologiques ont été mis en évidence depuis quelques années, on note des activités antivirales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-tumorales, et autres, L'ingestion de quantités de flavonoïdes aurait un lien avec une diminution de ces maladies coronaires (**Cook, 1996**).

Les aliments les plus communément étudiés pour leur richesse en flavonoïdes et en acides phénoliques sont la pomme, l'orange, le raisin ainsi que le vin rouge, l'oignon et le thé (**Cambon, 1989**).

Les pommes, sont considérés comme des aliments bénéfiques pour la santé, de part leur richesse en fibres et leur faible teneur en lipides. Un bénéfice additionnel de la pomme est sa teneur en polyphénols et en vitamines qui lui confèrent son étiquette riche en "antioxydants" et "aliment santé". Environ 70 % des pommes sont consommées en fruit de table et 30 % sont transformées en produits dérivés principalement de type jus et compote (<http://www.lapomme.org>).

En Algérie la culture du pommier est en progression durant cette dernière décennie. A partir de l'année 2011, la superficie des vergers à évolue de 70% qui correspond à une augmentation annuelle de 13% avec une production de 35% et par conséquent sa consommation (**FAO, 2010**)

INTRODUCTION

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'étude des composés poly-phénoliques des pommes *Malus domestica* de deux variétés à large consommation en Algérie (Var. *Golden delicious* et Var. *Royal Gala*).

La consommation régulière de pommes (2 à 3 par jour) pourrait en effet diminuer de 5 à 15 % le taux de cholestérol (**Aprifel, 2008**). Ce bénéfice est accordé à sa richesse en fibres, 2,5 % en moyenne, mais aussi à ses micronutriments (magnésium, vitamines C et E). Les polyphénols de ce fruit lui assurent par ailleurs un fort potentiel antioxydant (**Eberhardt et al., 2000**). La prévention des maladies chroniques est associée à une consommation de pommes (**Rupasinghe 2012**) en particulier des maladies cardiovasculaires en relation avec les principaux composés actifs de la pomme, les fibres et les polyphénols (**Serra 2012**).

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse des pommes de table en composés phénoliques et à déterminer leurs propriétés biologiques.

Pour cela et selon les moyens présents dans le laboratoire, nous avons commencé par la détermination de la teneur en eau de poudre de fruits, extraire le maximum de polyphénols et les fractionnés, réaliser une caractérisation des groupements fonctionnels présents dans les différents extraits à l'aide d'une spectroscopie FTIR et les identifier avec la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). La deuxième partie consiste en un suivi de l'étude de quelques activités biologiques, tel que:

- l'activité antioxydante vis-à-vis du radical libre DPPH.
- l'estimation, *in-vitro*, de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* et fongiques *Candida albicans* et *Aspergillus niger* qui sont la source de plusieurs infections graves chez l'homme.

Chapitre I :

Donnés bibliographiques

Le pommier *Malus domestica* est l'espèce fruitière la plus cultivée dans le monde en zone tempérée (**Chouinard et al., 2000**). Des études paléontologiques ont révélé la présence du genre *Malus* à l'ère tertiaire (**Chalice et Westwood, 1973**).

I.1. Systématique :

Selon (**Lafaonet al., 1996**); le pommier est classé comme suite:

Règne : Plante

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Maloideae

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Genre : *Malus*

Espèce: *Malus domestica* (Var. *Golden delicious et Royal Gala*)

Ayant une origine inconnue, les pommes de consommation ont été décrites pour la première fois en 1803 par Borkhausen comme un hybride complexe dérivé de *Malus sylvestris* Mill, de *Malus pumila* et de *Malus praecox* Borkh. Elles sont cultivées sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (**Laufenberg et al 2003**)

Pendant longtemps, les botanistes ont considéré que le pommier constituait le sous genre *Malus* au sein du genre *Pyrus*. L'appellation du pommier était alors *Pyrus malus*. Le pommier est actuellement classé dans le genre *Malus* qui selon **Chevreau et Morisot, (1985)** été distinct du genre *Pyrus*. D'après (**Redher, 1956**). Le genre *Malus* comprend 25 à 30 espèces

et plusieurs sous- espèces. De nombreux travaux sont effectués pour introduire par hybridation chez le pommier cultivé des résistances aux maladies. Ceci a conduit **Korban et Skirvin, (1984)** à dénommer le pommier cultivé; *Malus domestica*. 8 à 78 espèces de pommes (dérivées naturellement ou artificiellement) sont connues ; aujourd'hui et sont groupées selon différents critères tels que les caractéristiques morphologiques, les similarités de flavonoïdes, les inflorescences, les feuilles etc.

I.2. Description botanique :

Le pommier est un arbre à feuilles caduques, les fleurs hermaphrodites et se développent presque en même temps que les feuilles, groupée en corymbes de 5 à 7 pièces.

Trois structure se distinguent dans le fruit au niveau tissulaire l'épiderme (peau), le mésocarpe ou parenchyme (chair) et l'endocarpe (zone corticale contenant les pépins, aussi appelé le trognon). Le mésocarpe occupe la majeure partie du fruit (c'est le tissu le plus consommé), Les cellules de ces différents tissus sont constituées de plastes, de pigments assimilateurs (chlorophylle, caroténoïdes) et d'une vacuole, qui occupe 80 à 90 % du volume cellulaire. Les vacuoles concentrent la majorité des composés phénoliques du fruit. (Figure 1).

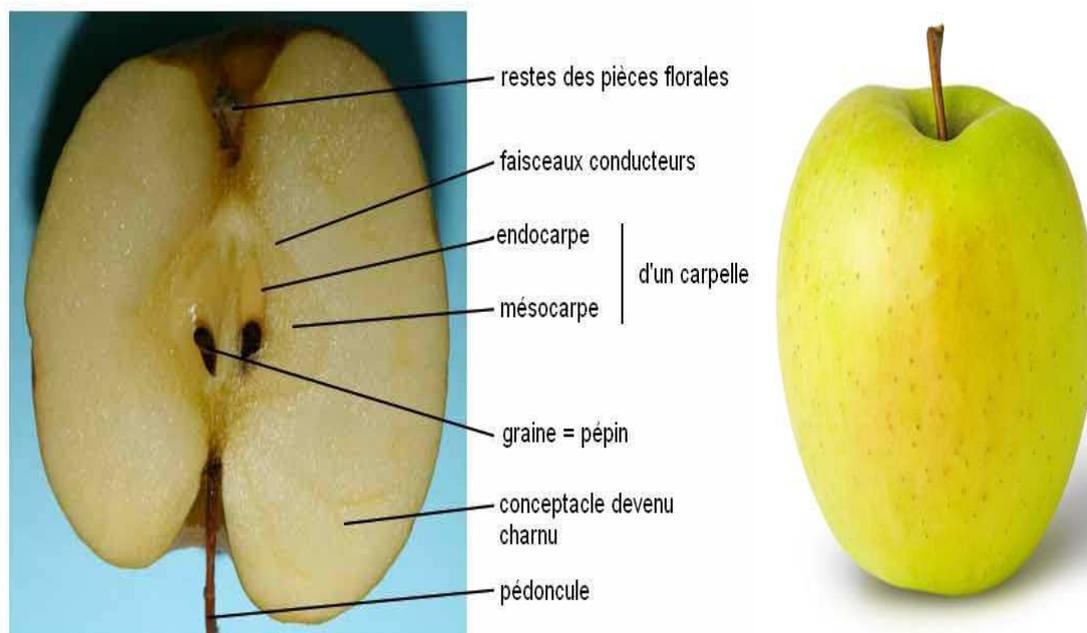


Figure 1: Coupe longitudinale dans un fruit de *Malus domestica*. (Korban et Skirvin, 1994).

I.3. Caractéristiques générales :

Le fruit est une baie, c'est-à-dire un fruit charnu sans noyau dur. De saveur parfumée et équilibrée (sucrée et un peu acidulée). Fruit de calibre moyen, de couleur jaune tacheté de brun, à la chair ferme, fine, juteuse et très parfumée. Le fruit est relativement gros (200 à 280 g) et a une forme régulière, tronconique à arrondie (**Anonyme, 1989**). Les expertises ont démontrées qu'elle a une haute densité nutritionnelle (riche en minéraux, oligoéléments, polyphénols et fibres); elle contient 85% d'eau et participe ainsi à l'hydratation et à l'épanchement de la soif, avec un faible apport calorique 52calories (**Gerhauser,2008**), Les polyphénols sont particulièrement abondants dans certains fruits comme la pomme, leurs teneurs peuvent atteindre 500 mg / 100 g (**Augustin Scalbert, 2003**).

La phénologie du pommier renferme une Epoque de floraison en mois d'Avril, une époque de maturité de fruit: au mois de septembre et une époque pour l'échelonnement de la récolte : de la fin du mois de septembre au début du mois d'octobre (2 à 3 semaines).

I.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des pommes :

La consommation de pomme participe au bon fonctionnement intestinale, régule la flore intestinale et procure une forte sensation de satiété (**Leontowicz et al., 2007 ; Mattes et al., 2009**). Les pommes ont une action antibactériennes (**Licht et al., 2010 ; Shinohara et al., 2010**), et régulent la glycémie postprandiale lorsque elles sont consommées avec la peau lors d'un repas (**Hemminkiet al., 2010**).

La pomme aide à la régulation du poids (**Yao et al., 2001 ; de Oliveira et al., 2003 ; de Oliveira et al., 2008**)et la diminution du risque cardiovasculaire (**Joshipura et al., 2001 ; Hertoget al.,1993 ; Knekt et al., 1996**) ; avec une action bénéfique sur des marqueurs du risque cardiovasculaire chez l'animal ou chez l'homme (**Manach et al., 2005**) et diminue le taux de cholestérol (**Hansen et al., 2009**). De nombreuses études réalisées, avec des molécules anti-oxydantes de la pomme, des extraits de pulpe, de peau ou de pomme entière, in vitro sur des lignées cellulaires tumorales ou in vivo chez l'animal, ont montré une action

significative sur différents facteurs de la cancérogenèse ou du développement tumoral (**Yang et al., 2009 ; Boyer et al., 2004**)

Ces propriétés pharmacologiques et thérapeutiques sont dues à certain principes actifs situés dans la pomme tel que:

Les polyphénols qui forment un groupe de composés très divers se différenciant par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des fonctions hydroxyles ainsi que par la présence de substituants non phénoliques de nature diverse (**Macheix et al. 2003**).

II. Les composés phénoliques de la pomme :

Dans la pomme, ils se divisent en deux grands groupes : les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes.

II.1. Les acides hydroxycinnamiques Ceux rencontrés dans la pomme sont principalement l'acide caféique et l'acide para-coumarique (figure 2). Ils sont constitués d'un noyau phénolique substitué par une chaîne propénoïque (structure en C3-C6). Tous deux sont estérifiés le plus souvent par de l'acide quinique pour former l'acide 5'-caféoylquinique ou acide chlorogénique, et l'acide para-coumaroylquinique (**Guyot et al., 1998; Sanoner et al., 1999; Awad et De Jager, 2000**).

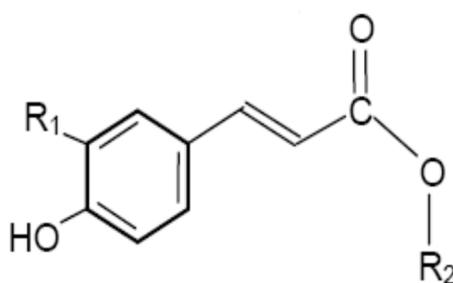


Figure 2 : Structure d'hydroxycinnamique rencontrés dans la pomme

II.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles aromatiques (nommés A et B sur la figure 3), reliés par une chaîne de trois atomes de carbone habituellement dans un hétérocycle oxygéné (nommé C sur la figure 3).

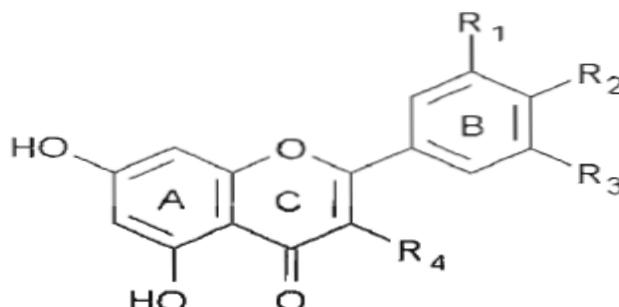


Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes (Boyer et Liu, 2004)

Ils sont classés en fonction du degré d'oxygénation du cycle C et des différents substituants des cycles aromatiques A et B. Les principaux types de flavonoïdes de la pomme sont : les dihydrochalcones, les flavonols, les flavanols (catéchine et épicatechine), ainsi que les anthocyanes. Les dihydrochalcones, sont des hétérosides dérivés des chalcones (figure 4). Elles sont représentées par la phloridzine et le xyloglucoside de phlorétine (Alonso-Salces et al., 2004). Elles sont minoritaires mais spécifiques des pommes (Sanoner, 2001).

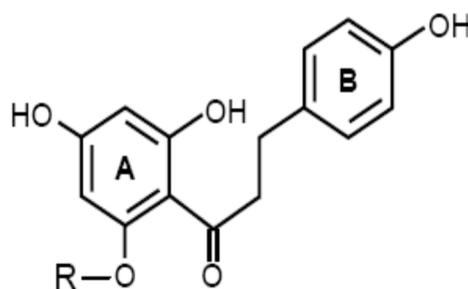


Figure 4 : Structure des dihydrochalcones de la pomme

Les flavonols : ce sont principalement des formes 3-O-glycosylées du quercétol : hyperoside (quercétol-3-O-galactose), isoquercitrine (quercétol-3-O-glucose), reynoutrine (quercétol-3-O-xylose), avicularine (quercétol-3-Arabinose), quercitrine (quercétol-3-Orhamnose), rutine (quercétol-3-rutinose) (Price et al., 1999). Dans la pomme, ils sont en partie responsables de la couleur jaune de l'épiderme de certaines variétés (Sanoner, 2001).

Les flavan-3-ols, de la pomme sont représentés par les catéchines (monomères de flavan-3-ol) et les proanthocyanidines (polymères de flavan-3-ol) :

- **les catéchines** sont représentées par la (-) épicatechine, toujours largement prédominante, et la (+)-catéchine (**Guyot *et al.*, 1998 ; Sanoner *et al.*, 1999**)

Les polymères de flavan-3-ol sont constituées, dans la pomme de 95% de (-) épicatechine, la (+) catéchine est présente en unité terminale (**Guyot *et al.*, 1997**). On les appelle alors les **procyanidines**. Selon les variétés, les polymères se distinguent entre eux par le rapport épicatechine/catéchine. Ils constituent la classe de polyphénols la plus représentée dans la pomme (44 à 90% des polyphénols totaux) aussi bien pour la pomme à cidre (**Guyot *et al.*, 1997**) que pour la pomme à couteau (**Guyot *et al.*, 2002a**).

Les **anthocyanes** sont présents dans les variétés de pomme dont la peau est pigmentée en rouge. Ce sont des hétérosides du cyanidol. Ils sont responsables des pigmentations rouges (**Awad *et al.*, 2000**).

II.3. Propriétés des composés phénoliques :

a) Propriétés anti oxydante :

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

Les radicaux libres : sont des entités chimiques possédant un électron non apparié « célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron célibataire a naissance suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour entraîner la rupture des liaisons entre les électrons. (**Boutabet, 2007 ; Lahoual, 2004 ; Hadi, 2004 ; Servais, 2002**). Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires, les acides nucléiques, et ainsi provoquant la mort cellulaire. (**Marfak, 2003 ; Boutabet, 2007**).

b) Propriétés antibactériennes :

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents, a entraînée la sélection de souches multi-résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés

phénoliques, qui sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les poly-phénols, notamment les flavonoïdes et les tannins, sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou à d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999)

c) Autres propriétés biologiques des composés phénoliques :

1) Propriétés anti inflammatoires :

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires par l'inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego et al, 2007) d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim et al., 2004).

2) Propriétés anticancéreuses :

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. (Decloitre, 1993, Hertog, 1996).

Toute fois Caltagirone et al.,(2000) in (Depeint et al., 2002) signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

3) Propriétés antivirales :

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (Bylka et al., 2004). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (Tapas et al., 2008)

4) Propriétés antiallergiques :

L'effet antiallergique est attribué à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. L'activation de l'enzyme augmente le potentiel d'action de la quercétine qui sera supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Marfak, 2003**)

II.4. Emplois thérapeutiques des composés phénoliques de pommes :

En ce qui concerne la pomme, de nombreux effets bénéfiques ont été montrés (**Roupas 2010, Serra 2012**). Les flavonoïdes de la pomme inhibent les cellules HT-29 (**Veeriah 2006**) et ont un effet sur le métabolisme du cholestérol (**Thilakarathna 2012**). La consommation de pommes *Marie Ménéard* riches en polyphénols permet de réduire l'inflammation du colon de rats transgéniques (**Castagnini 2009**). Plus précisément, les polyphénols de pelures de pommes ont un effet antioxydant et anti-inflammatoire sur les cellules Caco-2 (**Denis 2013**), effets qui pourraient être associés à la présence de flavonoïdes qui inhibent la peroxydation lipidique dans ces cellules (**Peng 2003**). Les épidermes de pommes fraîches ont une capacité d'inhibition des cancers (**Ding 2004, Gerhauser 2008, Boateng 2012**). Des coproduits de pommes riches en polyphénols présentent eux aussi un effet antiprolifératif (**Tow 2011, Fernandes 2013**). Outre les polyphénols, d'autres molécules peuvent participer aux activités biologiques testées : les triterpénoïdes présents dans des épidermes de pommes (**Szakiel 2012, Serra 2010b**), les polysaccharides qui agissent sur les cellules cancéreuses du colon (**Li 2013, Liu 2010**) ou la vitamine C, le potassium et les fibres de la pomme qui ont une action hypocholestérolémiant (**Demigné 2003**). Une molécule particulière a une capacité anticancéreuse démontrée ces dernières années, c'est l'épicagallocatéchine gallate qui réduit la viabilité tumorale et induit l'apoptose de cellules HT-29 (**Sanchez-Tena 2013, Kalaiselvi 2013, De Amicis 2013**).

L'étude de la biodisponibilité des polyphénols dans le corps humain complète les recherches. Par exemple, **Manach et al. (2005)** rapportent l'ordre des différents polyphénols absorbés par le corps humain. D'autres auteurs expliquent comment les polyphénols sont absorbés par le corps humain, les mécanismes de transformation d'aglycones en méthyle, ainsi que leur assimilation dans l'intestin jusqu'au métabolisme systémique (**Scalbert 2000, Ziberna 2012, Dauchet 2008, Kahle 2011, Vieira 2012**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

Notre étude s'est étalée sur une période de 5 mois, allant d'Avril jusqu'à Aout 2018. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les différents laboratoires de Centre de Recherche d'Analyse Physique et Chimique CRAPC BOUISMAIL (TIPASA) ainsi laboratoire d'hygiène (BLIDA).

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

Les fruits utilisés sont l'écorce et la pulpe des deux variétés de pommes (*Golden Delicious* et *Royal Gala*). La quantité prise est de 03 Kg pour chaque variété sélectionnée issue de la région de BENCHIKAOU W. Media.

1.1.2. Les micro-organismes

Pour mettre en évidence les caractéristiques antimicrobiennes des composés phénoliques des pommes, nous avons utilisé un support microbien composé de 04 souches bactériennes et 02 souches fongiques référenciées présenté dans le tableau suivant :

Tableau 1: Microorganismes utilisés dans l'activité antimicrobienne.

Les souches			Référence
Bactéries	Gram -	<i>Escherichia coli</i>	Laboratoire d'hygiène de Blida
		<i>Salmonella spp</i>	
	Gram+	<i>Bacillus cereus</i>	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Champignons	<i>Candida albicans</i>		
	<i>Aspergillus niger</i>		

2. Méthodes

2.1. Etude phytochimique

2.1.1. Préparation des poudres:

L'étape de séchage a pour but d'abaisser la teneur en eau des fruits. Ces derniers sont bien lavés avec l'eau du robinet et essuyés par un tissu. Nous avons séparé par la suite l'écorce de la pulpe de chaque variété de pomme et enlever les grains avec un couteau désinfecté. Les parties sont coupées en fines lamelles sur du papier aluminium stérile et mises dans l'étuve à une température de 60 ± 5 C° et laisser séchés jusqu'à la stabilisation du poids et peser.

Les fruits séchés sont réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique de marque (Philips – facilio). La poudre résultante est tamisée pour l'obtention d'une poudre homogène. Ensuite elle est conservée à l'abri de l'air, et de la lumière dans des sachets en papier mis dans des flacons en verre fermé hermétiquement.

2.1.2. Détermination de la teneur en eau :

Teneur en eau est la perte de masse mesurée dans les conditions d'essai. Elle est exprimée en pourcentage de la masse (grammes pour 100 grammes. La détermination de la teneur en eau d'une fraction d'épreuve (2178g de pulpe, 358g d'écorce de pomme de variété GALA, et 2500g de pulpe et 374g d'écorce de pomme de variété GOLDEN), par dessiccation sous une température de $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. (Twidwell et al., 2002).

La teneur est calculée par la formule suivante :

$$\text{TE}\% = (\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta) / \text{poids } \alpha \times 100$$

α : poids de l'échantillon (fruit frais)

β : poids de l'échantillon (fruit sec)

TE %: teneur en eau exprimé en pourcentage

2.1.3. Extraction des composés phénoliques :

Cette étape consiste à extraire le maximum des composés phénoliques contenue dans les fruits (Écorce et pulpe de pomme) en utilisant :

a- la méthode d'extraction par Soxhlet qui consiste à introduire la poudre de fruits (40g) dans la cartouche en papier filtre, cette dernière sera placée dans le Soxhlet surmonté d'un réfrigérant (Figure 5). L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (**William, B.J., 2007**).

En premier lieu, on verse 200 ml d'éther de pétrole dans le ballon qui est porté à ébullition. Après 2h et à raison de 07 siphonages, le solvant s'enrichi en substances solubles c'est la phase de dilipidation.

Une concentration avec un évaporateur rotatif permet l'obtention de la fraction lipidique (pour notre cas nous avons éliminé cette phase lipidique). Le marc dégraissé par l'éther de pétrole est repris par un mélange de (Méthanol/ Eau) à raison de (70/ 30) selon le même protocole et après une durée de plus de 10h et 01 siphonage/45min nous avons récupéré la fraction polaire.

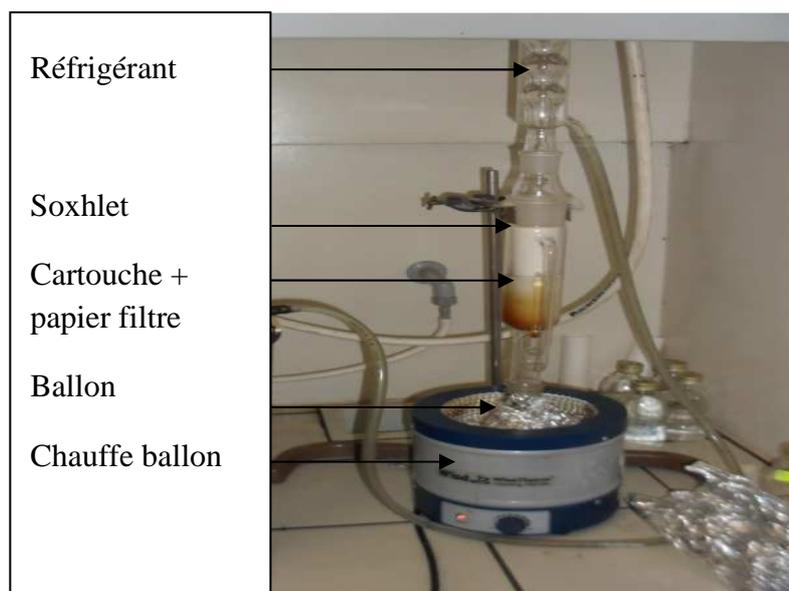


Figure 5 : Extraction par le Soxhlet (original 2018)

b- Le fractionnement en phases à l'aide d'une ampoule à décompter

Cet extrait aqueux va subir des affrontements par des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction, en passant par les étapes suivantes (**Anonyme, 2002**):

- Ether di-éthylique environ 10min
- Acétate d'éthyle environ 10min

- Butanol durant plus de 30min

- L'extrait aqueux obtenu est versé dans une ampoule à décanter. Nous ajoutons 18ml de l'Ether d'éthyle ; laissé décanter un moment, jusqu'à la séparation des deux phases bien distinctes. Cette étape permet d'extraire les génines libres. Nous ouvrons le robinet pour la récupération de la phase aqueuse. Le même volume du solvant est ajouté à cette dernière à chaque fois pour répéter l'extraction 3 fois.

La phase aqueuse obtenue a subi encore un affrontement par l'acétate d'éthyle qui permet d'extraire les monosides. Le même volume de solvant est ajouté à la phase aqueuse pour répéter l'extraction st 3 fois.

La phase aqueuse obtenue subi un dernier affrontement par le n-butanol, elle nous permet d'obtenir les di et les triglicosides. Cette extraction est répétée aussi 3 fois. Une évaporation rotative sous vide à une température de 40C° est effectuée pour les trois phases organiques récupérées.



a

b

c

Figure 6 : a- Affrontement et agitation **b-**Décantation de 2 phases **c-** Evaporation à sec à 40°C (Original, 2018).

Les quatre fractions obtenus (fraction étherique, fraction d'acétate d'éthyle et la fraction butanolique et la fraction aqueuse épuisée) de chaque Ech sont mises directement au lyophilisateur pour faciliter la bonne conservation des extraits purs. (Figure 7)

2.1.4. La lyophilisation

Cette technique permet d'obtenir un produit facilement soluble dans l'eau et qui, après addition d'eau présente les mêmes caractéristiques que le produit d'origine.



Figure 7 : Conservation des extraits finaux (Original, 2018)

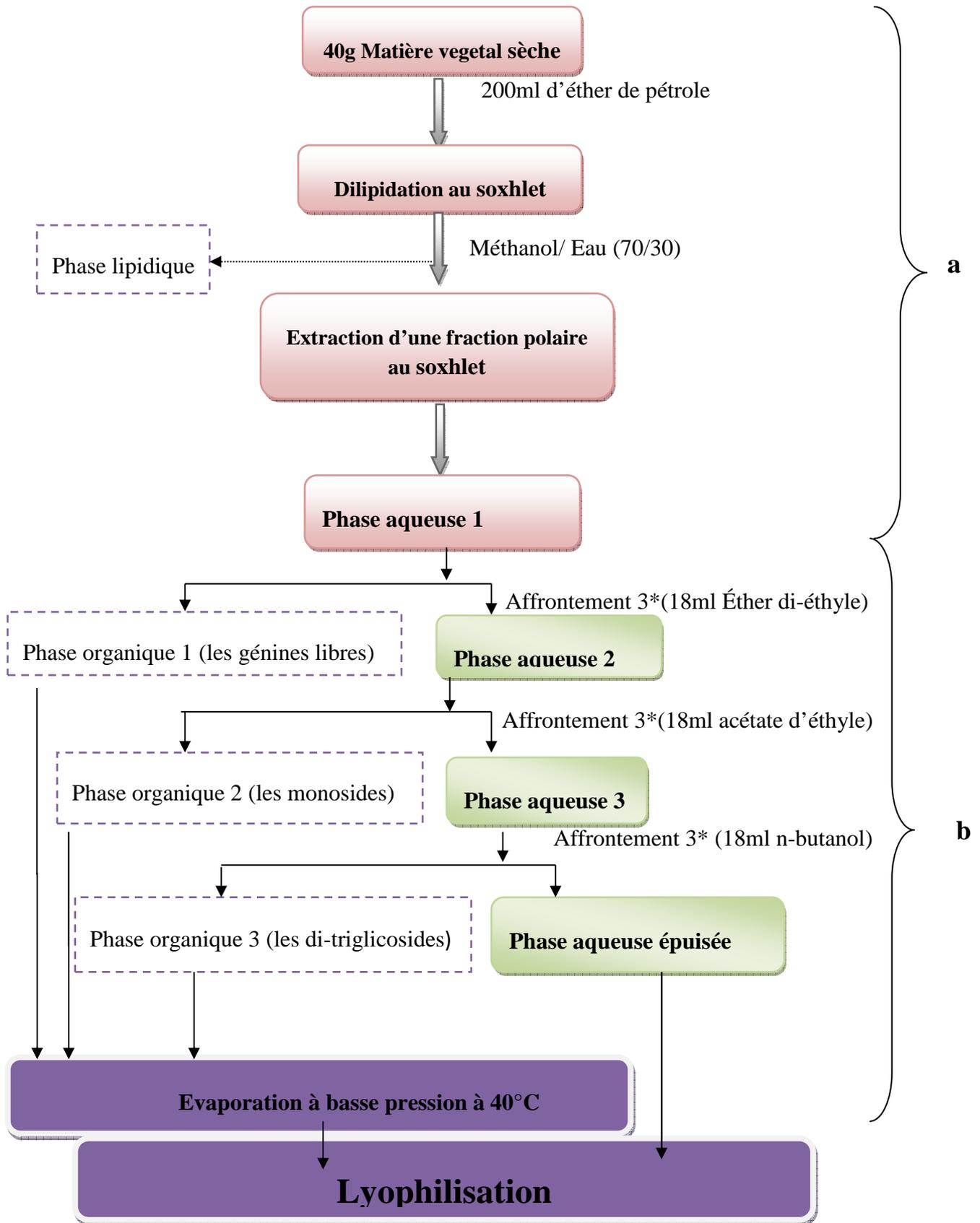


Figure 8: Protocole d'extraction des composés phénoliques secs et pur

a : William B.,2007

b : Anonyme 2002

2.1.5. Calcul du rendement des extraits :

Le rendement de l'extraction est calculé par la formule suivante

$$R = \frac{m - m_0}{m_T} \times 100$$

Avec :

m : la masse du ballon après l'extraction.

m_0 : la masse du ballon vide (avant l'extraction).

$(m - m_0)$: la masse de l'extrait sec.

m_T : la masse totale de poudre végétale utilisée dans l'extraction.

2.1.6. La spectrophotométrie à Infrarouge:

L'analyse FTIR est basée sur l'absorption de la lumière infrarouge par des transitions vibrationnelles dans des liaisons covalentes et surveille la composition chimique globale de l'échantillon. Un spectre de composé chimique est une superposition de spectres de tous les constituants (Boydston-white S. et al, 1999). De plus, les spectres IR tiennent compte non seulement de la nature chimique des molécules, mais également de leurs conformations (Goormaghtigh E. et al, 1994)

2.1.7. Analyse par chromatographie liquide à haute performance :

L'analyse est réalisée par un HPLC (YL. 9100). Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les extraits exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sans doute la technique la plus utile pour caractérisés les composés phénoliques.

Le principe de la technique :

20µl de chaque extrait est injectés sur une colonne de marque « RESTEK » ; type phase inverse C18 ; de dimension égale à 150mm * 4.6mm et une porosité de 5µm. La phase mobile est constituée de trois éluants : phase A : H2O : 1% Ac Acétique et Phase B : méthanol grade HPLC.

Le gradient d'éluant appliqué est comme suite :

Temps	Phase A	Phase B
0	95%	5%
55	5%	95%
60	95%	5%

Le débit est de 1ml/min. La détection a été effectuée par un détecteur à UV Visible à une longueur d'onde égale à 254nm et à une température de 25°C.

2.2. Evaluation des activités biologiques

2.2.1. Essai d'évaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydant des différents fractions de composés phénoliques de fruits de pomme *vis-à-vis* du radical DPPH, a été évaluée « in vitro » par la méthode de la spectrophotométrie à UV visible, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm. (Figure 9).

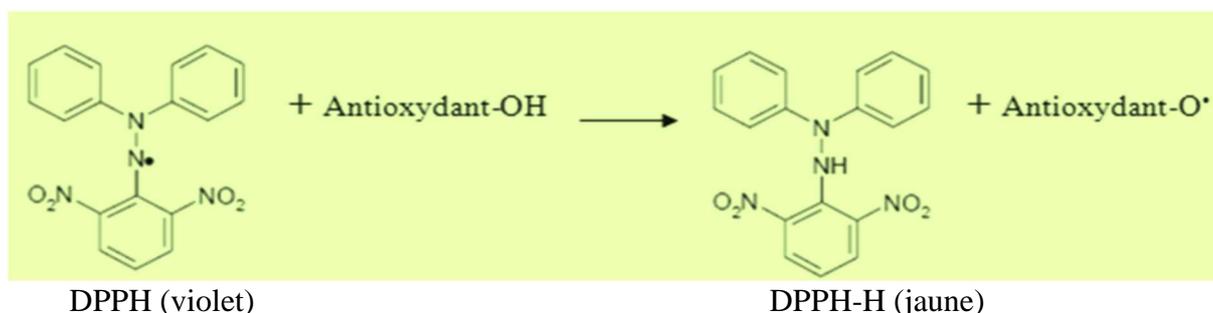


Figure 9: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel qui est l'acide ascorbique (vitamine C).

Mesure du pouvoir piégeage du radical DPPH

a- Principe :

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphenylpicryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphenylpicryl-hydrazine dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner

des protons (Sanchez Moreno, 2002). Cette décoloration est représentative de la capacité des flavonoïdes à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

b- Mode opératoire :

-préparation de la solution DPPH:

La solution de DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆, Mr : 394,33) est préparée par solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol.

-préparation des échantillons :

Les échantillons ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. Nous avons préparé des dilutions dont le but d'avoir différentes concentrations, ces dernières sont préparées comme suivant :

-préparation d'une solution mère de l'échantillon : 40g/l pour 1ml de méthanol il faudra utiliser 40mg d'échantillon.

A partir de cette solution mère (SM), nous avons préparé des dilutions à des concentrations plus faibles qui seront destinées à fournir des concentrations allant de 0 à 40mg/ml.

Le teste du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par (Mansouri et al., 2005), où 25µl de chacune de dilution des extraits testées et de l'acide ascorbique sont mélangées dans des tubes à essais avec 975 µl de la solution méthanolique de DPPH et incubé durant 30mn à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique et à la température ambiante du laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin.

Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante (Wang et al., 2002)

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{DO Témoin} - \text{DO Echantillon}) / \text{DO Témoin} * 100$$

L'IC50 a été déterminée pour chaque fraction.

2.2.2. Essai d'évaluation de l'activité antimicrobienne :

1. La méthode de diffusion

a- Principe:

Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antimicrobien des extraits testés sur des bactéries et des champignons, ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité

de ces souches vis-à-vis les différents extraits. Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés d'antibiotiques et déposés à la surface des milieux de cultures solides et ensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées. L'antibiotique commence à diffuser dès son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, ces boîtes sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie et 48h ou plus pour les champignons. L'effet d'antibiotique sur la croissance microbienne se traduit par la présence d'une zone appelée « zone d'inhibition » dépourvue des bactéries ou des champignons. Le même principe est suivi dans notre étude.

b- Protocole expérimental:

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota et al., 2008). Le support microbien est composé d'*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ainsi *Candida albicans* et *Aspergillus niger* qui ont été isolées de produits pathologiques provenant de laboratoire de microbiologie du laboratoire d'hygiène BLIDA. Dans cette méthode, nous utilisons des disques de 9 mm de diamètre (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany). La méthode commence par le :

- **Repiquage des espèces bactériennes** : les différentes espèces microbiennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum** : des colonies bien séparées des espèces microbiennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C.

- **Préparation des disques** : des disques de papier Wathman n°1 de 9 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester à raison de 25µml, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

- **Préparation des milieux de culture** : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

• **Ensemencement** : des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antimicrobienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation pour les bactéries et 48h pour les champignons à 37° C.

• **Expression des résultats** : L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un Pied à Coulisser le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques :

Présence de zone claire autour de disque : présence d'activité inhibitrice.

Absence de zone claire autour de disque : absence d'activité inhibitrice.

3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont confirmés par une étude statistique à savoir le test GLM par le logiciel Systat ver.2007 qui étudie l'effet de chaque facteur à part qui nous permet de faire la comparaison entre nos différents extraits.

NB : la fraction étherique est utilisée uniquement lors de l'identification par HPLC à cause de son très faible rendement.

Chapitre III :

Résultats et discussion

I. Etude phytochimique :

I.1. Teneur en eau des pommes:

Les analyses de nos échantillons montrent que les fruits de *Malus domestica* sont riches en eau avec un taux d'humidité important compris entre 68% et 83%. La pulpe de la Var. Golden delicious renferme un taux de 83% et l'écorce présente aussi une proportion considérable de 76%. D'autre part la pulpe de Var Royal gala renferme une quantité de 83% ; tandis que son écorce présente un taux de 68%. (Figure 10 (a et b)). A la lumière de ces résultats, nous pouvons déduire que la teneur en eau diffère d'une variété à une autre et de la partie du fruit analysé à une autre.

La pomme fraîche est un fruit de composition complexe constitué principalement d'eau jusqu'à (85,6%) et de glucides (13,8%) (USDA 2008). Elle est particulièrement riche en fibres avec une teneur moyenne de 2,4g/100g, en sels minéraux, vitamines et acides organiques. C'est résultats présentent la composition chimique moyenne du fruit qui est susceptible d'être modifiée en fonction des variétés, du degré de maturité des fruits, de ses conditions de production et du stockage.

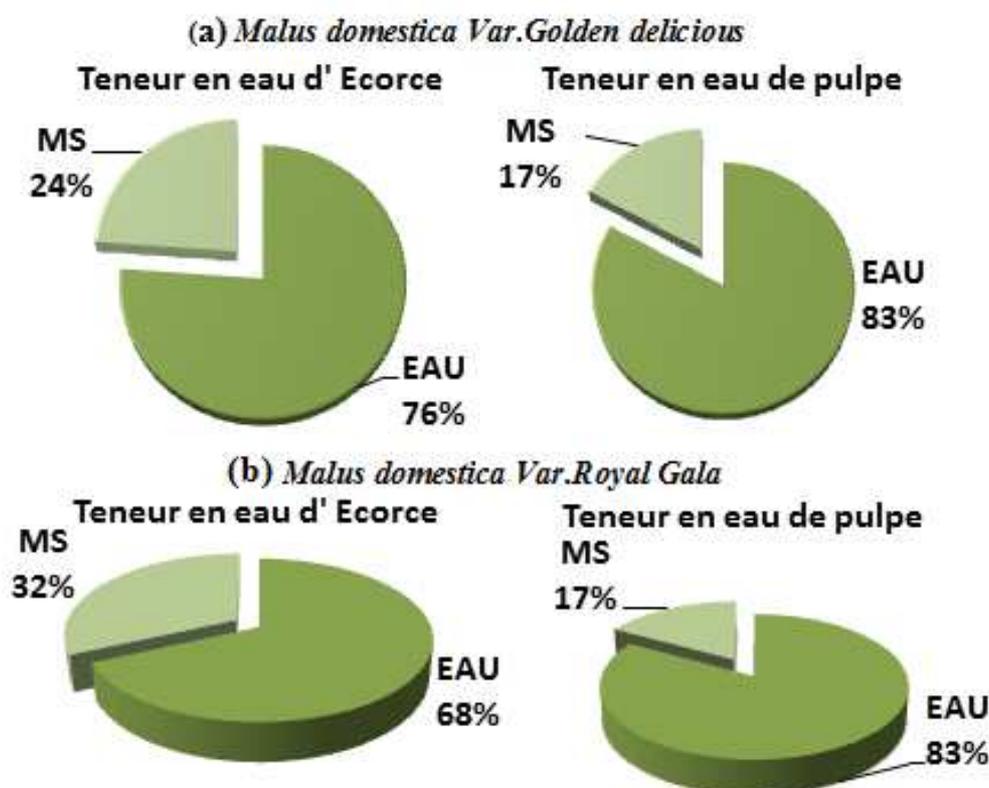


Figure 10 : (a) Teneur en eau du fruit de *Malus domestica* Var. Golden delicious, (b) Teneur en eau du fruit de *Malus domestica* Var. Royal Gala

I.2. Rendement en extraits :

Les rendements relatifs à différentes fractions obtenues pour les deux variétés à partir de 40 g de poudre végétale des fruits sont regroupés dans le tableau 2:

Tableau 2 : Rendement en extraits;

		<i>Malus domestica</i>			
		<u>Var. <i>Golden Delicious</i></u>		<u>Var. <i>Royal Gala</i></u>	
		Ecorce	Pulpe	Ecorce	Pulpe
Masse de l'échantillon (g)		40	40	40	40
Rendement en extraits des fractions (%)	Acétate d'éthyle	1.06%	0.075%	1.40%	1.32%
	Butanolique	3.03%	0.22%	3.28%	0.52%
	Aqueux	43.87%	37.55%	47.93%	32.45%

Les résultats du tableau précédant révèlent que les fractions aqueuses présentent un rendement le plus élevé variant entre 32 et 47 %, que se soit pour les écorces ou pour les pulpes. Par contre les extraits butanoliques ont présenté un rendement moyen entre 0.22 et 3.28% dont les extraits butanoliques des écorces sont beaucoup plus élevés que ceux de la pulpe. Par ailleurs, les extraits d'acétate d'éthyle ont un rendement faible par rapport aux autres extraits qui varie entre 0.075 et 1.40% pour les écorces et les pulpes.

L'Etude analytique par le teste GLM de l'effet de chaque facteur à part nous a montré que la variété n'a aucun effet sur la variation du rendement en composés phénoliques, par contre la partie du fruit utilisé pour l'extraction (pulpe ou écorce) agi significativement sur le rendement ($p= 0,047$). Le rendement le plus important obtenu est la fraction aqueuse, donc le solvant produit une différence hautement significative entre les rendements ($p= 0,000$) des différents composés phénoliques. (Figure 11)

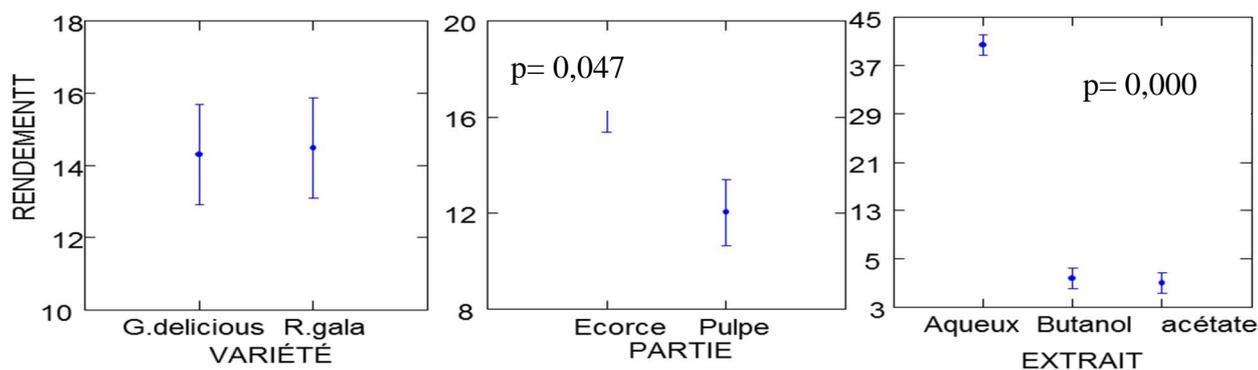


Figure 11: Analyse de la variance (test GLM) sur la variation des rendements selon la variété, la partie du fruit et le solvant utilisé.

Cette différence de répartition des polyphénols est marquée dans le fruit et selon la zone tissulaire considérée (pulpe, écorce). Par ailleurs, la pomme est reconnue comme un produit ayant des bienfaits pour la santé car, en plus de sa teneur élevée en fibres, des composés phénoliques sont présents en grande quantité dans sa chair et dans sa peau (180 mg équivalent acide gallique/100g fruit frais) (**Bratet et al., 2006**).

D'une façon générale, plusieurs études sur le sujet montrent que la concentration en polyphénols est plus élevée dans l'écorce que dans la pulpe du fruit (**Burda et al., 1990 ; Awadet et al., 2000 ; Guyot et al., 2002**). Cependant, les proportions des différentes classes de composés phénoliques sont très variables selon les variétés de pommes et selon les classes considérées (**Sanoner, 2001**). A titre d'exemple; les flavonols sont majoritairement présents dans l'écorce (**Price et al., 1999**). Selon les variétés ce pourcentage varie de 63 à 97%. A l'inverse, la concentration en acides hydroxycinnamiques est plus élevée dans la pulpe (**Guyot et al., 1998 ; Sanoner, 2001**).

De plus, les extraits phénoliques de l'écorce de pomme représentent un taux important par rapport à ceux de la pulpe. Ce qui concorde avec les résultats d'**Eberhardt et al., (2000)**, ou il a trouvé que l'écorce de pomme contiendrait de deux à six fois plus de composés phénoliques et de deux à trois fois plus de flavonoïdes que la pulpe.

Il est important de noter que nos résultats montrent que les différents extraits de la variété Royal Gala sont plus riches que ceux de la variété *Golden delicious*. De nombreuses disparités sont observées entre les variétés. Ainsi, la Royal Gala et la Fuji sont plus pauvres en dihydrochalcones que la Golden delicious. L'écorce des variétés Golden delicious, Braeburn et Granny Smith est bien plus riche en procyanidines que celle des variétés Empire ou Fuji. Concernant l'écorce des fruits, la teneur en flavonoïdes apparaît bien plus élevée dans les pommes colorées (Braeburn, Empire Fuji, Cripps Pink) (**Guyot et al. 2002b; Song et al., 2007**).

I.3. Résultats de spectroscopie à infrarouge FTIR :

Dans ce travail, nous avons exploité les spectres FTIR des différentes fractions (Gala et Golden) pour obtenir une signature des changements métaboliques induits par ces molécules.

Les spectres FTIR pour les différents extraits des écorces et des pulpes Golden et Gala (figures 12 « a et b ») et (figures 13 « a et b ») montrent les pics caractéristiques suivants:

Chapitre III : Résultats et discussion

3287 cm^{-1} ; 2931 cm^{-1} ; 1643 cm^{-1} ; 1342 cm^{-1} ; 1083 cm^{-1} ; 919 cm^{-1} ; 816 cm^{-1} ; 584 cm^{-1} respectivement.

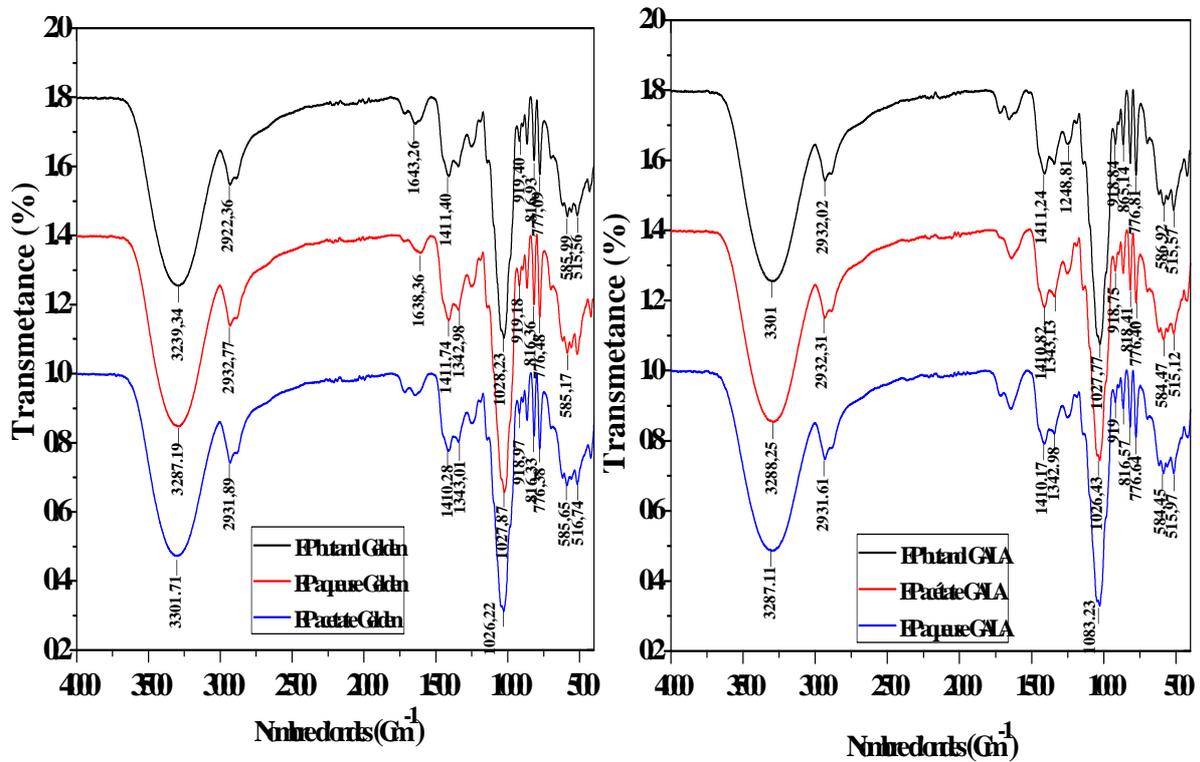


Figure 12 : a- Spectres IRTF des fractions d'écorce de Golden
b- Spectre IRTF des Fractions d'écorce de Gala

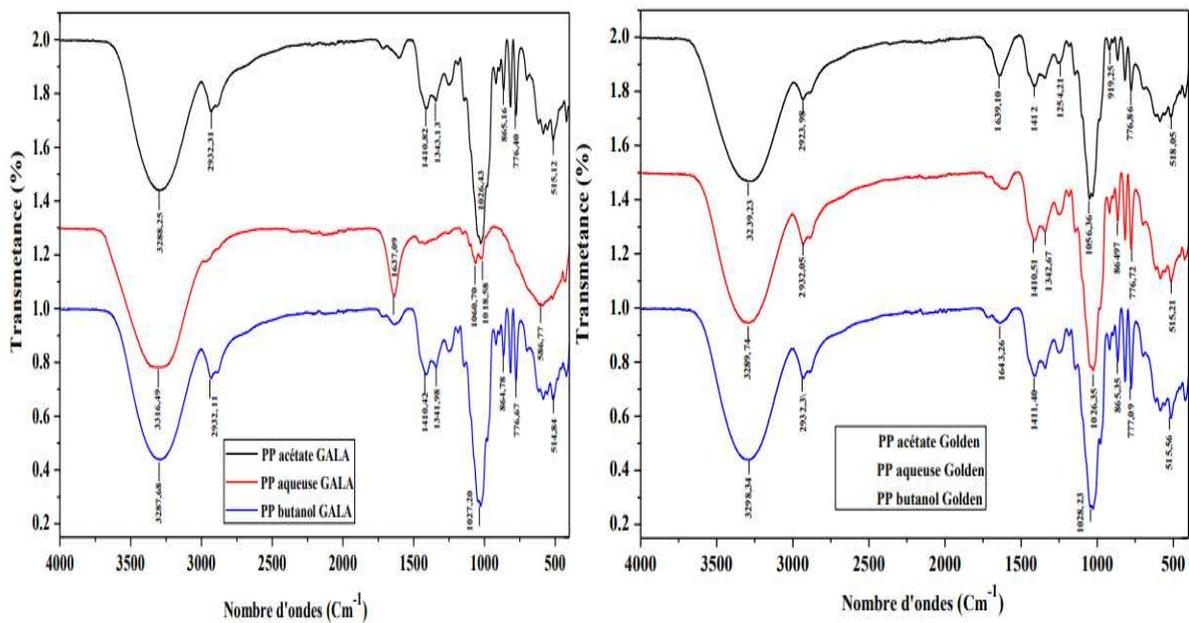


Figure 13 : a- Spectres IRTF des fractions de pulpe de Golden
b- Spectre IRTF des Fractions de pulpe de Gala

Le 3287cm^{-1} et le pic de 2931 cm^{-1} sont spécifiques au groupement OH et à la fréquence symétrique CH_2 (fréquence d'étirement CH_2). Le pic ayant la valeur de 1643 cm^{-1} représente la relation $\text{C}=\text{C}$; Le pic de 1342 cm^{-1} correspond au groupement phénolique OH; le pic 1083cm^{-1} correspond à la relation $\text{C}-\text{H}$, spécifique du noyau aromatique; le pic de 1044 cm^{-1} correspond au groupement cétone, tandis que les pics de 816 et 584 cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation in-situ, $\delta\text{C}-\text{H}$.

I.4. Analyse chromatographique liquide à haute performance (HPLC) :

Les groupements de flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux des témoins utilisés. (Figure14).

Les chromatogrammes d'HPLC des standards et des extraits sont représentés ci-dessus :

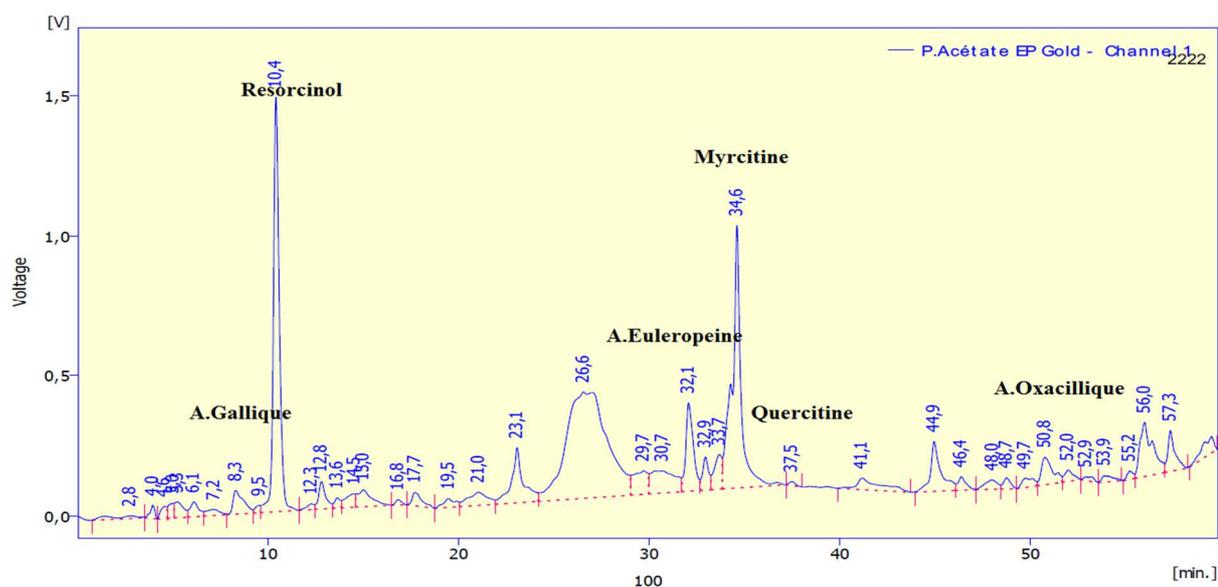


Figure 14 : Identification des polyphénols de l'extrait d'acétate d'éthyle d'écorce de pomme *Golden delicious*

Les caractéristiques des pics sont présentées dans le tableau 3 pour les différents extraits d'écorce de pomme Var. *Golden delicious*. Le chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle est présenté en figure 14. Les autres chromatogrammes des différents extraits des fruits étudiés sont en annexe 3.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 3 : Résultats du chromatogramme d'extrait d'écorce de pomme Var. *Golden delicious* à 254 nm.

Extrait	Composé	Temps de rétention min	Proportion %
ETHERIQUE	Resorcinol	10.2	21.2
	1	12.5	3.3
	2	17.6	4.6
	3	19.4	2.6
	Catéchine	21.2	1.9
	Epicatéchine	22.3	1.7
	4	23.1	12.6
ACETATE	A. Gallique	6.1	0.8
	Resorcinol	10.4	14.4
	1	23.1	3.8
	A.Euleropeine	32.1	3.9
	Myrcitine	34.6	13.8
	Quercitine	37.5	0.1
	2	44.9	5.9
	A.Oxacillique	50.8	1.8
3	56	4.1	
BUTANOLIQUE	A.Gallique	6.1	1.3
	Resorcinol	10.6	3.6
	1	18	2.8
	2	23.3	2.9
	Rutine	30.9	3.1
	A.Euleropeine	32	1.
	Myrcitine	34.2	14.9
	A.Cinnamique	34.8	8.2
	3	44.9	1.6
AQUEUX	A.Gallique	6.1	6.7
	Resorcinol	10.8	4.4
	1	17.7	4.6
	2	19.3	3.1
	3	23	7.1

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 4 : Résultats du chromatogramme d'extrait de pulpe de pomme Var.*Golden delicious* à 254 nm

Extrait	Composé	Temps de rétention min	Proportion %
ETHERIQUE	A.Gallique	6.7	2.1
	Resorcinol	11.5	6.5
	Catéchine	21.8	1.7
	1	23.6	3.5
	A.P.Caumarique	25.2	2.7
	Myrcitine	34.3	5.9
	2	49.6	3.6
ACETATE	3	56.2	4.4
	A.Ascorbique	3.8	14.8
	Naringinine	38.9	12.4
BUTANOLIQUE	Myrcitine	34.4	5.5
	Quercitine	37.5	0.6
	Kaempferol	41.3	1.6
	1	56.3	10.8
AQUEUX	A.Gallique	6.2	9.1
	1	27.6	34.2

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 5 : Résultats du chromatogramme d'extrait d'écorce de pomme Var. *Royal Gala* à 254 nm

Extrait	Composé	Temps de rétention min	Proportion %
ETHERIQUE	Myrcitine	34.5	8.6
	1	46.9	45.4
	Anthrone	48.3	6.8
ACETATE	Resorcinol	10.6	6.7
	1	12.9	3.4
	2	13.7	1.8
	3	23.5	2.9
	4	32.7	7.4
	AM Anisique	33.5	3.2
	Myrcitine	34.2	6.3
	A.Cinnamique	34.9	5.3
	5	35.2	14.2
	6	38.3	2.2
Kaempferol	41.4	1.4	
BUTANOLIQUE	A.Euleropeine	32.4	1.7
	Myrcitine	34.4	4.9
	Atrans2.4dimethoxy-cinnamique	39.2	1.4
	A.Oxacillique	50.8	6.1
	1	56.4	8.8
AQUEUX	A Ascorbique	3.4	0.2
	Resorcinol	10.4	2.9
	1	19.3	3.1
	2	23.2	5.1
	Myrcitine	34.2	11.7

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 6 : Résultats du chromatogramme d'extrait de pulpe de pomme Var. *Royal Gala* à 254 nm.

Extrait	Composé	Temps de rétention min	Proportion %
ETHERIQUE	A.Vanillique	4.5	8.4
	A.Syringinique	22.8	3
	A.Euleropeine	32.6	3.7
	Myrcitine	34	2.7
	A.cinnamique	34.8	6
	A.trans2.4dimethoxy cinnamique	38.1	1.7
	Naringenine	38.8	1.5
ACETATE	A.Vanillique	4.5	5
	A.trans-cinnamique	24.7	27.2
	A.Salicylique	30	17.5
	A.Cinnamique	34.8	2.2
	1	35.8	3.2
Kaempferol	40	2.6	
BUTANOLIQUE	A Vannilique	4.6	4.7
	Resorcinol	10.3	0.4
	Catéchine	21.7	0.4
	1	27.6	10.7
	2	39.4	7
	Kaempferol	40.1	3.7
	3	60.2	13.8
AQUEUX	A.Ascorbique	3.7	4.3
	1	24.6	2.4
	2	27.5	19.8
	A.Cinnamique	34.9	4.5
	Kaempferol	41.6	0.5
	3	45.3	1.1
	4	46.8	2.8

Chapitre III : Résultats et discussion

A la lumière de ces résultats, nous constatons que les différentes fractions sont riches en acides phénoliques et en flavonoïdes et cela est dans les écorces et pulpes de pommes étudiées.

Les résultats montrent la présence des acides phénoliques de dérivés d'acide benzoïque telle que l'acide Salicylique qui est présent dans la fraction acétate d'éthyle de la PP Var Royal gala, A. Vanillique qui est marqué par sa présence dans différentes fraction du même partie de ce dernier, ou d'Acide cinnamique qui est plus abondant dans la Var Royal gala et ces dérivés tel-que : Acide P Caumarique présent dans PP Var. Golden delicious. D'une manière générale ces acides phénols sont connus pour leurs propriétés Antibactériens (**Didry et al., 1982**), Antifongiques(**Ravn et al., 1984**)et Antioxydants(**Hayase et Kato, 1984**).

Les flavonoïdes apparient dans nos fractions ils sont de type :

- flavonols telque : Catéchine qui est marqué par sa présence dans la fraction etherique des deux parties du fruit de Golden, la Quercitine et la Myricitine qui apparient avec des quatités bien abodante dans les écorces des deux Var et plus au moins abondantes dans les pulpes, ainsi le Kaempferol qui apparait en trace dans les deux pulpes des deux Var. Se sont des flavonoïdes qui jouent un rôle d'Anti-oxydants (**Hirose Y, 1984**) ou ils réduisent le stress oxydatif, d'inflammation, d'athérogénèse et de la mutagenèse (**Kuzuhara T. et al, 2009**) et d'Antiviraux(**Lee KH., et al, 2005**).

- flavonones: Naringinine c'est des aglycones, ils ont une activité anti-inflammatoire et immuno-modulatrice, atténue l'inflammation des voies aériennes induite par un allergène (**Ying Shi., et al, 2009**).

Les différences entre la composition chimique des extraits et selon les variétés choisies se traduisent dans la richesse de ces extraits en polyphénols ainsi que le composant majoritaire de chaque fraction.

Nous avons remarqué aussi que la fraction aqueuse est la fraction la plus pauvre en composés poly phénoliques par rapport aux autres fractions et cela pour les quatre échantillons.

Les flavonols et les anthocyanes sont presque exclusivement présents dans l'écorce. Quelques variétés comme 'Red Delicious' ou 'Golden Delicious' ont de la quercitrine en faible quantité dans l'écorce (**Guyot, Marnet et al. 1998; Tsao, Yang et al. 2003**).

Les flavanols sont généralement la classe majoritaire des composés présents dans l'ensemble du fruit avec la présence d'un grand nombre de procyanidines plus ou moins condensées,

suivies des acides hydroxycinnamiques, surtout présents dans la chair. Suivant la variété considérée, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine ou la procyanidine B2 sont généralement les composés majoritaires (Podsdek, Wilska-Jeszka et al. 2000; Alonso-Salces, Korta et al. 2001; Tsao, Yang et al. 2003).

On peut également noter une répartition très inégale de certains composés entre les différents tissus du fruit. L'écorce est le compartiment qui contient la plus grande partie des composés phénoliques du fruit (65% des polyphénols dosés pour la variété à cidre 'Kermerrien'). Vient ensuite l'écorce (24%), le trognon (10%) et enfin les pépins (1%) (Guyot, Marnet et al. 1998). Ce classement ne tient cependant pas compte de la taille relative des différents compartiments rapportés en milligrammes par grammes de matière sèche, l'écorce est le compartiment le plus riche en composés phénoliques, suivi des pépins, du trognon (données pour les variétés 'Jonagold' et 'Elstar') (Awad, De Jager et al. 2000).

II. Activités biologiques des différents extraits de pommes:

II.1. Activité antioxydante :

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure flavonoïque et l'activité antioxydante (RICE-EVANS, 1995).

Pour ce test nous avons utilisé la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Pour cela, on a préparé une gamme de dilutions (0, 2, 4, 8, 16, 24, 32 et 40) mg/ml pour l'acide ascorbique, et les différents extraits. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de droites (Figure 15, 16 et 17) dont les équations sont présentées sur les graphes:

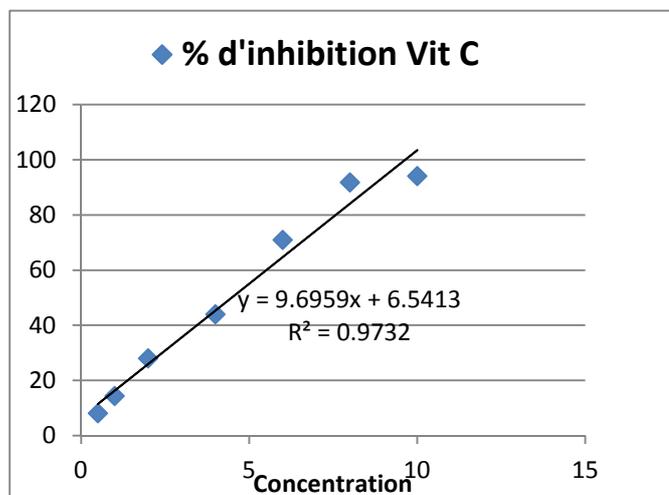


Figure 15: Activité antioxydante de Vit C

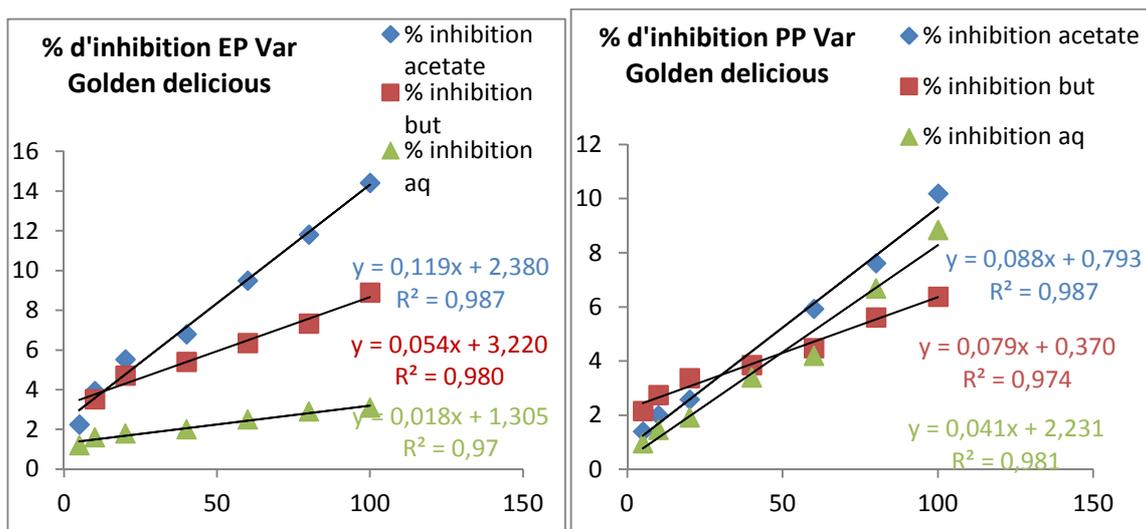


Figure 16: Activité antioxydante des extraits Var *Golden delicious*

(acétate d'éthyle butanolique, aqueuse).

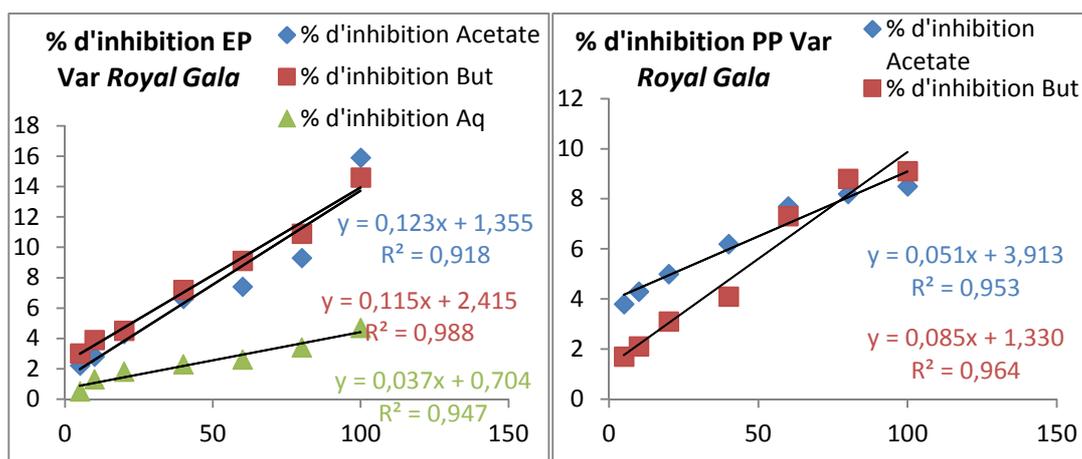


Figure 17: Activité antioxydante des extraits Var *Royal Gala*

L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en IC_{50} . Pour chaque extrait, IC_{50} est déduite de la droite d'activité correspondante.

Selon le tableau 7, l'antioxydant standard (Vit C) a montré une activité antioxydante puissante avec une IC_{50} de l'ordre de 4.48 $\mu\text{g/ml}$. Tous les extraits présentent une activité radicalaire très faible par rapport à la vitamine C. Mais les extraits d'acétate d'éthyle sont les plus actifs pour les deux parties du fruit de différentes variétés (Tableau 7).

Il est important de mentionner que l'activité anti oxydante de l'écorce est plus importante que celle de la pulpe pour tous les extraits et pour les deux variétés.

Les résultats de la phytochimie confirment la présence et la répartition de composés phénoliques tel-que l'acide gallique et l'acide ascorbique et des flavonoïdes tel-que la myricitine et la quercitine dans les différentes fractions, cela peut être expliqué par la structure différente des composés phénoliques qui est l'élément déterminant de leur activité. Pour les acides phénoliques, l'activité antioxydant augmente proportionnellement avec le degré d'hydroxylation et la présence de groupement C=CH-COOH (**Balasundram et al., 2006**). Pour les flavonoïdes, la relation structure activité antioxydante est généralement plus compliquée que les acides phénoliques à cause de la complexité de la molécule de flavonoïdes (**Bors et al., 1997**).

Tableau 7: Valeurs des IC₅₀ des différents extraits et témoin déterminées par le test au DPPH.

Extraits			IC ₅₀ (µg/ml)
Vit C			4.48
Var Golden	EP	Acetate	400.16
		Butanolique	866.29
		Aqueux	2705
	PP	Acetate	559.17
		Butanolique	628.22
		Aqueux	1165.09
Var Gala	EP	Acetate	395.4
		Butanolique	413.7
		Aqueux	1332.32
	PP	Acetate	903.66
		Butanolique	572.5
		Aqueux	ND

II.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques :

L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée après 24h d'incubation pour les bactéries et 48h pour les champignons à 37C° et les résultats sont représentés dans le tableau 8.

Le pouvoir antimicrobien de nos produits est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) autour des disques contenant 25µl d'extrait a une concentration de 20mg/ml.

Chapitre III : Résultats et discussion

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Mutai et al., 2009). Cet auteur a classé les diamètres des zones d'inhibitions (Z.I) de la croissance microbienne en 5 classes :

- ✓ Très fortement inhibitrices : $\varnothing \geq 30$ mm. +++
- ✓ Fortement inhibitrices : $21 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 29$ mm. ++
- ✓ Modérément inhibitrices : $15 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 20$ mm. +
- ✓ Légèrement inhibitrices : $11 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 15$ mm. (+ou-)
- ✓ Non inhibitrices : $\varnothing < 10$ mm. (-)

Lors de ce test, nous avons utilisé des disques de (9mm) de diamètre.

Tableau 8: Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne pour les extraits d'écorce de *Malus domestica* Var. *Golden delicious*.

Extrait MicroOrganismes		Extrait EP					
		Acétate d'éthyle		Butanolique		Aqueux	
		Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S
B Gram -	<i>Escherichia coli</i>	00	-	00	-	15	+
	<i>Salmonella spp</i>	11	±	15	±	14	±
B Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	±	12	±	00	-
	<i>Bacillus cereus</i>	00	-	00	-	00	-
CH	<i>Candida albicans</i>	14	±	00	-	00	-
	<i>Aspergillus niger</i>	00	-	00	-	00	-

Z.I : zone d'inhibition ; S : sensibilité

Les résultats du tableau 8 montrent que l'activité des extraits d'écorce de *Malus domestica* Var. *Golden delicious* est différente :

- L'extrait acétate d'éthyle est légèrement inhibiteur de la croissance de 2 souches bactériennes sur quatre testés. L'inhibition légère est observée sur la souche bactérienne à Gram⁻ de *Salmonella spp*, et la souche à Gram⁺ de *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition de 11mm. (Figure 18). Par contre aucun effet n'est marqué sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*.



Figure 18: Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP Var. *Golden delicious*

Pour les souches fongique, l'inhibition est moyenne de *Candida albicans* (14mm) et nulle pour l'espèce *Aspergillus niger*(Figure 19).



Figure 19 : Activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP de pomme Var *Golden delicious*

L'extrait butanolique inhibe la croissance de 2 souches bactériennes sur quatre testés. L'inhibition de la croissance de la souche à Gram⁻ de *Salmonella spp* est modéré (15mm), par contre celle de la souche à Gram⁺ de *Staphylococcus aureus* est une légère (12mm). (Figure 20). Ce même extrait n'a aucun effet sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* et sur les espèces fongiques testés.



Figure 20 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique d'EP Var. *Golden delicious*

Nous avons remarqué qu'il n'y a pas une différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram- pour les deux extraits (acétate d'éthyle et butanolique).

Tandis que, l'extrait aqueux inhibe la croissance des bactéries Gram⁻ à savoir *Escherichia coli* et *Salmonella spp* avec une zone d'inhibition modéré de 15mm et 14mm respectivement. (Figure 21). D'autre part, cet extrait n'a montré aucun effet sur les bactéries Gram+ ni sur les espèces fongiques.



Figure 21 : Activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'EP Var. *Golden delicious*

Tableau9 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits de pulpe de *Malus domestica* Var. *Golden delicious*.

μOrganismes		Extrait		Extrait PP					
				Acétate d'éthyle		Butanolique		Aqueux	
				Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S
B Gram -	<i>Escherichia coli</i>	00	-	13	±	00	-		
	<i>Salmonella spp</i>	13	±	00	-	14	±		
B Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	00	-	13	±	12	±		
	<i>Bacillus cereus</i>	12	±	00	-	00	-		
CH	<i>Candida albicans</i>	10	±	10	±	14	±		
	<i>Aspergillus niger</i>	00	-	00	-	00	-		

Z.I : zone d'inhibition ; S : sensibilité

Les résultats de cette activité des différents extraits de pulpe de *Malus domestica* Var. *Golden delicious* peuvent s'expliquer comme suite :

- L'extrait d'acétate d'éthyle inhibe 2 souches bactériennes sur quatre testés. Les résultats du tableau 9 montrent une faible activité sur la bactérie Gram- *Salmonella spp*(13mm) (figure 22 (a)) et sur la souche *Bacillus cereus* (12mm) Gram + (figure 22 (b)). Par contre cet extrait n'a aucune activité inhibitrice sur la souche bactérienne *Escherichia coli* Gram-, et la souche bactérienne Gram+ *Staphylococcus aureus*. Il est à noter qu'il n'y a pas une différence de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram-.

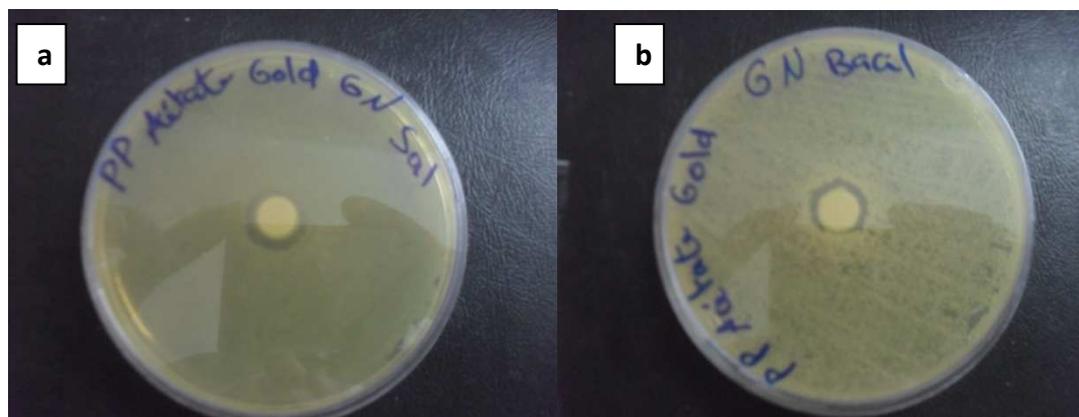


Figure 22: Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de PP Var. *Golden delicious*

Chapitre III : Résultats et discussion

Cet extrait d'acétate d'éthyle a une légère activité inhibitrice sur la souche fongique *Candida albicans* (10mm) et aucune activité sur *Aspergillus niger* (figure 23).



Figure 23 : Activité antifongique de l'extrait d'acétate d'éthyle de PP Var. Golden delicious

Au contraire, l'extrait butanolique de cette pulpe du même fruit inhibe la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* avec une zone moyennement faible de 13mm chacune (figure 24), mais aucun effet n'est noté sur *Salmonella spp* et *Bacillus cereus*.

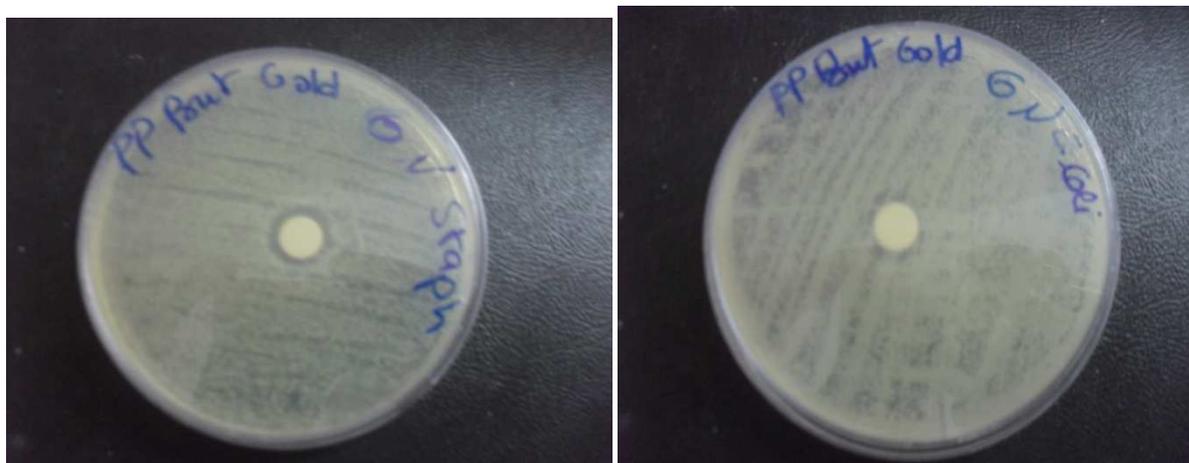


Figure 24 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique de PP Var. Golden delicious

Sur la souche fongique *Candida albicans*, une zone d'inhibition de 10mm est marquée tandis qu'*Aspergillus niger* est résistant (figure 25).



Figure 25 : Activité antifongique de l'extrait butanolique de PP Var. Golden delicious

L'extrait aqueux de ce même Ech a révélé la résistance d'*Escherichia coli* et *Bacillus cereus* et la sensibilité de *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 14mm et 12 mm respectivement (figure 26).



Figure 26 : Activité antibactérienne de l'extrait aqueux de PP Var. Golden delicious

D'autre part, la souche fongique *Candida albicans* marque une zone d'inhibition modérée de 14mm tandis que l'*Aspergillus niger* est toujours résistant (figure 27).



Figure 27 : Activité antifongique de l'extrait aqueux de PP Var. Golden delicious

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 10 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits d'écorce de *Malus domestica* Var. *Royal Gala*.

μOrganismes		Extrait		Extrait EP					
				Acetate		Butanolique		Aqueux	
		Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S		
B Gram -	<i>Escherichia coli</i>	00	-	00	-	00	-		
	<i>Salmonella spp</i>	00	-	13	±	00	-		
B Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	±	12	±	00	-		
	<i>Bacillus cereus</i>	00	-	00	-	00	-		
CH	<i>Candida albicans</i>	00	-	00	-	00	-		
	<i>Aspergillus niger</i>	00	-	00	-	00	-		

Z.I : zone d'inhibition ; S : sensibilité

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits d'écorce de *Malus domestica* Var. *Royal Gala* peuvent s'expliquer comme suit :

- L'extrait d'acétate d'éthyle a inhibé une seule souche bactérienne sur quatre testés en dépit de leur morphologie et de leur Gram. En effet, il a une faible activité sur la bactérie Gram + *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de (11 mm) (figure 28). Nous avons enregistré une absence d'activité sur 3 souches bactériennes, 2 souches à Gram - : *Salmonella spp* et *Escherichia coli* et une souche à Gram + : *Bacillus cereus*.



Figure 28 : Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle d'EP Var. *Royal Gala*

Même résultats négative observés pour les souches fongiques.

Chapitre III : Résultats et discussion

- L'extrait butanolique a révélé la sensibilité de *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 13mm et 12 mm respectivement (figure 29) et la résistance d'*Escherichia coli* et *Bacillus cereus* ainsi les souches fongiques testés.



Figure 29 : Activité antibactérienne de l'extrait butanolique d'EP Var. *Royal Gala*

Tous les microorganismes testés ont marqué une résistance vis-à-vis de l'extrait aqueux d'écorce de *Malus domestica* Var. *Royal Gala*.

Tableau 11 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits de pulpe de *Malus domestica* Var. *Royal Gala*.

Extrait μOrganismes		Extrait PP					
		Acetate		Butanolique		Aqueux	
		Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S	Z.I (mm)	S
B Gram -	<i>Escherichia coli</i>	00	-	11	±	00	-
	<i>Salmonella spp</i>	15	+	13	±	00	
B Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	+	11	±	00	-
	<i>Bacillus cereus</i>	00	-	12	±	00	-
CH	<i>Candida albicans</i>	12	±	10	±	00	-
	<i>Aspergillus niger</i>	00	-	00	-	00	-

Z.I : zone d'inhibition ; S : sensibilité

Les résultats de l'activité des différents extraits de pulpe de *Malus domestica* Var. *Royal Gala* peuvent s'expliquer comme suite :

Chapitre III : Résultats et discussion

- L'extrait d'acétate d'éthyle montre une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de 2 souches bactériennes à savoir *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus* avec 15mm et 17mm respectivement (figure 30), mais Aucune activité n'est marquée sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*.



Figure 30 : Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de PP Var. *Royal Gala*

D'autre part, une activité légère est notée vis-à-vis la souche fongique *Candida albicans* avec zone d'inhibition de 12mm (figure 31) et une résistance totale de *Aspergillus niger* pour cet extrait.



Figure 31: Activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle de PP Var. *Royal Gala*

Les résultats obtenus de l'extrait butanolique de pulpe de *Malus domestica* Var. *Royal Gala* ont montré une légère inhibition vis-à-vis toutes les souches bactériennes à savoir les Gram- : *Escherichia coli* et *Salmonella spp* avec une zone d'inhibition de 11mm et 13mm

Chapitre III : Résultats et discussion

respectivement et Gram + : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec une zone de 11mm et 12mm respectivement (figure 32).

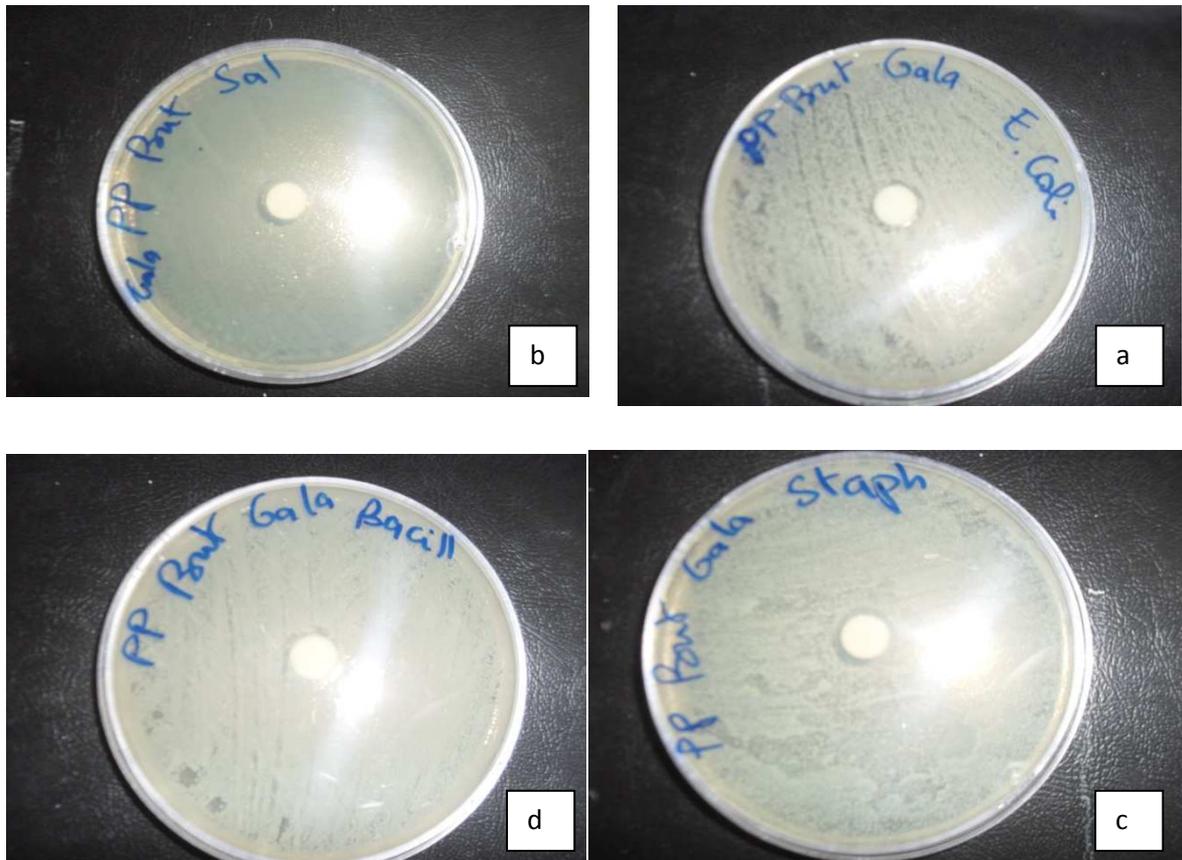


Figure 32: Activité antibactérienne de l'extrait butanolique de PP Var. *Royal Gala*

Ainsi une activité légère est notée sur *Candida albicans* 10mm (figure 33) et aucun effet d'inhibition sur *Aspergillus niger*.

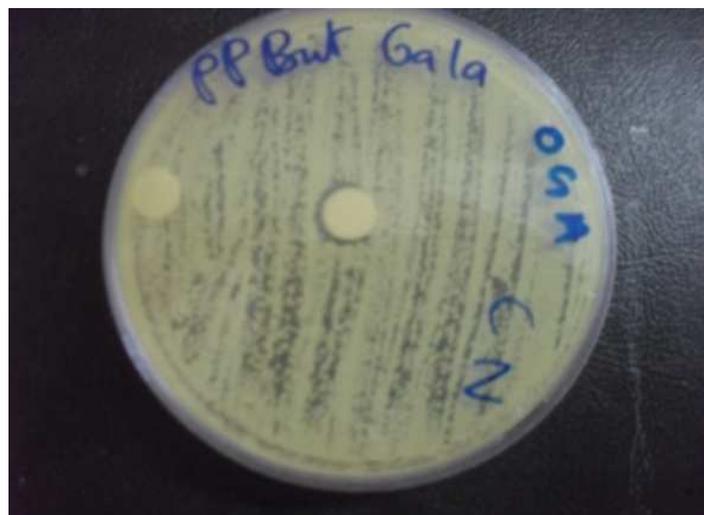


Figure 33 : Activité antifongique de l'extrait butanolique de PP Var. *Royal Gala*

Chapitre III : Résultats et discussion

L'extrait aqueux de pulpe de *Malus domestica* Var. *Royal Gala* n'a aucune activité antimicrobienne vis-à-vis les souches testées.

Tous nos extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que les extraits de fruits de *Malus domestica* Var. *Golden delicious* et Var. *Royal Gala* présentent des propriétés antimicrobiennes.

Les analyses statistiques effectuées par le logiciel Systat de 2007 ont révélé que les parties de la pomme la pulpe et l'écorce ont le même pouvoir antimicrobien sur les souches testées : bactériennes et fongiques et qui varie selon le type de souches ou la différence est très significative (0.001).

Néanmoins, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré l'activité la plus importante que l'extrait butanolique et l'extrait aqueux mais avec une différence non significative, surtout sur la souche *Salmonella spp* qui est habituellement issue des aliments non désinfectés et provoque des intoxications alimentaires qui induisent à la déshydratation ou à des infections très dangereuse pour la santé humaine et la souche *Staphylococcus aureus* qui sont également les premiers responsables des infections nosocomiales de nos jours. Donc ces extraits sont une alternative aux médicaments habituels, pour lesquels une résistance a été constatée, pour empêcher la prolifération de ces germes pathogènes pour l'homme.

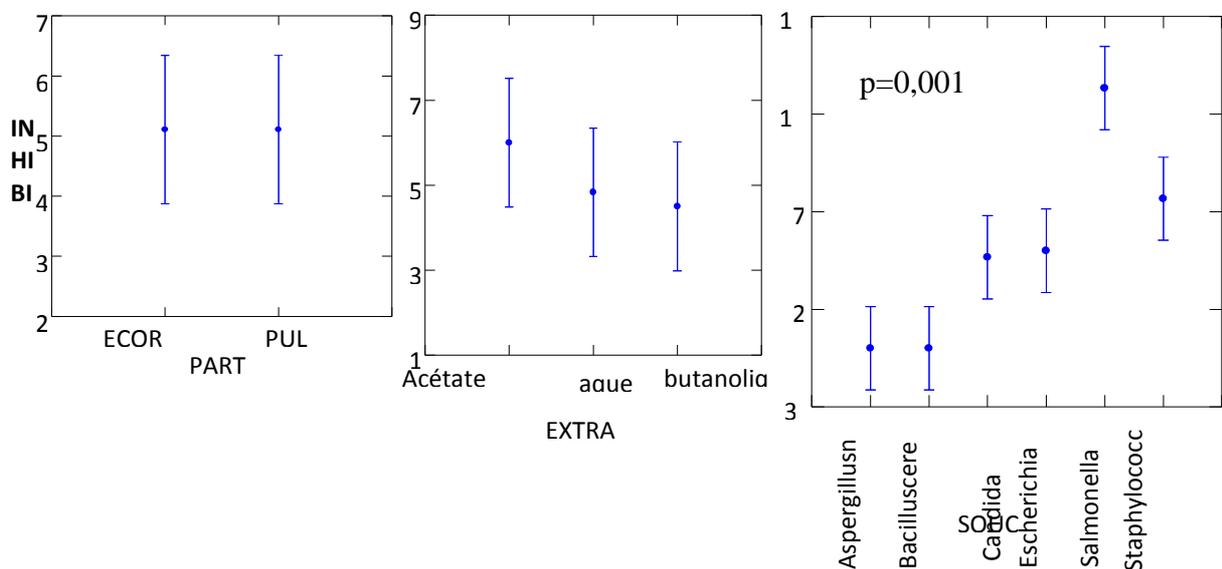


Figure 34 : Variation de l'activité antimicrobienne selon la partie du fruit, le solvant utilisé et la sensibilité des souches microbiennes

Du moment que certains flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (COWAN M., 1999), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes (RECIO et al., 1989).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Basli et al., 2012).

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par Katarzyna et al., en 2007 et ils ont démontré que de nombreux composés flavonoïques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes (El Ajjouri et al., 2008). Nos extraits renferment certains composés flavonoïdes et acide polyphénoliques démontré dans la partie analyses phytochimiques. Donc, l'activité antibactérienne des extraits observée, peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis ces microorganismes, qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que, l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (karou et al., 2005).

Nous pouvons expliquer aussi ces résultats par plusieurs études qui rapportent que les différents composés flavonoïdes ont des propriétés antimicrobiennes, notamment la quercétine (Groot, 1998 ; Shan et al., 2007, Gatto et al., 2002, Bhattacharya et al., 2006, Luis et al., 2006) et la catéchine (Cowan, 1999). Ohemenget al., (1993) rapportent que les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils se sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN _ gyrase. Des études récentes de Sato et al., (1995) ; Mliane, (2004) ; Hatano et al., (2005) ont montré l'effet bactéricide de certains flavonoïdes sur *Staphylococcus aureus*, notamment, certains flavonols qui sont des molécules très actives pour l'inhibition des germes testés. Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique. D'autre part, (Mori et al., 1987) ils ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Chapitre III : Résultats et discussion

Les teneurs en flavanes et leur degré de polymérisation suivent un gradient croissant du cortex vers l'écorce de la pomme. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet anti-fongique protecteur de ces molécules (**Guyot S., et al., 1998**)

Conclusion

Conclusion

L'introduction régulière dans le régime alimentaire de fruits ou de leurs extraits biologiquement active devient une des préventions possibles contre plusieurs maladies graves. Parmi ces fruits nous avons les pommes que nous avons choisies pour leur importance dans la prévention des maladies cardiovasculaires. L'étude s'est axée sur la valorisation d'une espèce végétale locale à présence abondante en Algérie: *Malus domestica*, à travers la caractérisation de sa composition chimique et la détermination de certaines propriétés biologiques de différents extraits de pulpe et d'écorce de deux variétés différentes : *Golden delicious* et *Royal gala*.

Les résultats ont montré que la teneur en eau de *Malus domestica* var. Golden delicious est plus importante (de 83%/PP et 76%/EP) que celle de la var. *Royal gala* (83%/PP et 68%/EP). Ces taux permettent aux fruits de réhydrater et de faciliter l'élimination des toxines dans l'organisme humain.

Les spectres FTIR des différents extraits écorces et pulpes de pommes étudiées ont confirmé la présence des noyaux aromatiques, des groupes phénoliques, fréquence d'étirement CH₂, des groupes hydroxyliques et des fonctions cétones. Tous ces groupements confirment la présence des composés phénoliques dans nos extraits.

D'autre part, l'analyse qualitative par HPLC nous a permis d'identifier certains composés polyphénoliques surtout les acides phénoliques : de dérivé d'acide benzoïque tel-que l'acide Salicylique et l'acide Vanillique et ou d'acide cinnamique tel-que l'acide P Coumarique et les flavonoïdes tel-que les flavonols : Quercitine, Myricitine, Catéchine Kaempferol et les flavonones : la Naringinine dans les deux types de fruits. Les composés les plus abondants sont les flavonols et les acides cinnamiques qui ont les propriétés Antibactérienne, Antifongiques, Antioxydants, anti-inflammatoire et antivirale. Ce qui demande alors une augmentation de la consommation des pommes à titre préventif.

L'estimation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques, s'est révélée très faible par rapport à la Vit c, mais plus importante pour l'extrait d'écorce de pomme par rapport à l'extrait de sa pulpe. Ainsi, la fraction d'acétate d'éthyle est la fraction dont le pouvoir réducteur est important par rapport à la fraction butanolique et la fraction aqueuse, ou cette dernière présente la plus faible activité. Donc la consommation régulière de ces fruits entiers assure l'augmentation des antioxydants dans le corps ce qui induit à la neutralisation des radicaux libres et favorise l'élimination des substances toxiques.

Tous nos extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées : *E.Coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, ainsi *Candida albicans* et

Conclusion

Aspergillus niger ce qui confirme que les extraits de fruits de *Malus domestica* Var. *Golden delicious* et Var. *Royal Gala* présentent des propriétés antimicrobiennes.

Il est important de signaler que la différence n'était pas marquée par rapport à la partie de fruit étudiée (écorce et pulpe) mais plus tôt :

- La nature de fraction dont nous avons noté que la fraction d'acétate d'éthyle a montré l'activité la plus importante que fraction butanolique et la fraction aqueuse mais avec une différence non significative
- Les souches testées dont nous avons noté que les souches bactériennes *Salmonella spp.*, et *Staphylococcus aureus* et la souche fongique *Candida albicans* ont été les plus sensibles à nos extraits. Nous constatons que ces derniers sont une alternative aux médicaments habituels, pour les quels une résistance a été constatée, pour empêcher la prolifération de ces germes pathogènes pour l'homme.

Comme perspectives et en vue de poursuivre et approfondir ce travail, il serait intéressant de :

- Tester d'autres doses de composés phénoliques de pommier d'autres variétés et de leurs feuilles et écorce de l'arbre.
- Faire d'autres analyses telles que CCM, UV-visible et la CPG pour déterminer les composés majoritaires des flavonoïdes et ceux qui sont responsables de l'activité biologique
- Évaluer l'activité anti-oxydante des flavonoïdes en utilisant d'autres méthodes comme la méthode de réduction de Fer (FRAP).
- Évaluer l'activité antimicrobienne des flavonoïdes sur une gamme élargie de souches, en utilisant plusieurs méthodes comme la méthode de Micro atmosphère.
- Étudier d'autres activités pharmacologiques des flavonoïdes telles que les activités antidiabétique, anti-cholestérol et anti-inflammatoire.
- Élaborer une préparation galénique ou cosmétique dans laquelle seront incorporés les flavonoïdes et apprécier ainsi son efficacité

Références bibliographiques

1. **Alonso-Salces, R. M., A. Barranco, B. Abad, L. A. Berrueta, B. Gallo and F. Vicente. 2004.** Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2938–2952.
2. **Anonyme, (2002).** Extraction des flavonoïdes Rapport CRD Saidal 80P.
3. **Anonyme, (2008).** A- Teneur Pourcent Gramme D'aliments Comestibles : Pomme Fraiche Pulpe Et Eau. Fiche Nutritionnelle. Table De Composition Nutritionnelle. PP. 39-43.
4. **Anonyme, (2015).** Fichier canadien sur les éléments nutritifs <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/saine-alimentation/donnees-nutritionnelles.html> . Consulté le 26/08/2018. 4p.).
5. **Aprifel, (2008).** Site internet de l'agence des fruits et des légumes frais. Fiches nutritionnelles par produits : la pomme. <http://www.aprifel.com/fiches produits>.
6. **Augustin Scalbert, (2003).**Unité des Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France PP. 42-50.
7. **Awad M. A. et De Jager A. 2000.** "Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of "Jonagold" and "Elstar" apples during and after regular and ultra low oxygen storage."
8. **Awad M. A., De Jager A., Van der Plas L. H. W. et Van der Krol A. R. 2001.** "Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of "Elstar" and "Jonagold" apples during development and ripening." *Scientia Horticulturae* **90**: 69-83.
9. **Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006).** "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
10. **Basli, A., Chibane, M., Madani, K., and Oukil, N. (2012).** "Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf." *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
11. **Bhattacharya R., Tulsawani R.K., Vijayaraghavan R., (2006).** Effect of trolox and quercetin on sulfur mustard-induced cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Indian J. Pharmacol.*, Vol.38 N°1 PP. 38-42.
12. **Birt D.F., Hendtich S., Wang W., (1999).** *Pharmacology and Therapeutics* Vol.72 N°90 PP. 151-177.
13. **Boateng J., Verghese M. (2012).** Protective effects of the phenolic extracts of fruits against oxidative stress in human lung cells. *International journal of pharmacology* 8: 152-160.

14. **Bors, W., Michel, C., and Stettmaier, K. (1997).** "Antioxidant effects of flavonoids." *Biofactors*, 6(4), 399-402.
15. **Boutabet K., (2007).** Etude pharmaco-chimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Magister de pharmaco-chimie, université de Jijel. 120P.
16. **Boyer J., Liu RH., (2004).** [Apple phytochemicals and their health benefits.](#) *Nutr J.* May Vol.3 N°1 PP.5-7.
17. **Brat P., George S., Bellamy A., Chaffaut L. D., Scalbert A., Mennen L., Arnault N. et Amiot M. J. (2006).** "Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables." *J. Nutr.* 136(9): 2368-2373.
18. **Burda S., Oleszek W. et Lee C. Y. (1990).** "Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 945- 948.
19. **Bylka W., Mathawska I., et Pilewski N.A., (2004).** Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association.*, Vol.7 N°2 PP. 24-26.
20. **Cambon A., (1989).** *Science, Technique, Technologie*, N°11 PP. 4-10.
21. **Canillac N., et Mourey A., (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* against *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* N°18 PP. 261– 268.
22. **Castagnini C., Luceri C., Toti S., Bigagli E., Caderni G., Femia A.P., Giovannelli L., Lodovici M., Pitozzi V., Salvadori M., Messerini L., Martin R., Zoetendal E.G., Gaj S., Eijssen L., Evelo C.T., Renard C.M.G.C., Baron A., Dolara P. (2009).** Reduction of colonic inflammation in HLA-B27 transgenic rats by feeding Marie Menard apples, rich in polyphenols. *British Journal of Nutrition* 102: 1620–1628.
23. **Challice J.S. et Westwood, M.N., (1973).** Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. *Bot. J. Linn. Soc.* N°67 PP. 121-148.
24. **Chevreau E., et Morisot D., (1983).** Variabilité génétique d'une collection d'espèces des genres *Malus* et *Pyrus*, Analyse botanique et enzymatique. D.E.A. INRA. Station d'arboriculture fruitière PP. 1- 8.
25. **Chouinard S. et Ford B., (2000).** Adult onset tic disorders. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, Vol.68 N°6 PP. 738-743.
26. **Cook P.R. 1996.** Hypothesis on differentiation and the inheritance of gene superstructure. *Nature* N°245 PP. 23-25.

27. **Cowan M., (1999).** Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev. N°12 PP. 564-582.
28. **Cowan M., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews, Vol.12 N°4 PP. 564-570.
29. **Dauchet L., Peneau S., Bertrais S., Vergnaud A.C., Estaquio C., Kesse-Guyot E., Czernichow, S. Favier A., Faure H., Galan P., Hercberg S. (2008).** Relationships between different types of fruit and vegetable consumption and serum concentrations of antioxidant vitamins. British Journal of Nutrition 100: 633–641.
30. **De Amicis F., Perri A., Vizza D., Russo A., Panno M.L., Bonofiglio D., Giordano C., Mauro L., Aquila S., Tramontano D., Ando S. (2013).** Epigallocatechin gallate inhibits growth and epithelial-to-mesenchymal transition in human thyroid carcinoma cell lines. J. Cell. Physiol. 228: 2054–2062.
31. **De Oliveira M., Sichieri R., et Sanchez Moura A., (2003).** Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. Nutrition N°19 PP. 253-259.
32. **De Oliveira M., Sichieri R., et Venturim Mozzer R., (2008).** A low-energy-dense diet adding fruit reduces weight and energy intake in women. Appetite, Vol.51 N°2 PP. 291-299.
33. **Decloitre F., (1993).** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. Cahiers de Nutrition et de diététique., Vol.28 N°2 PP. 85-95.
34. **Demigné C., Guyot S., Vaysse P., Ripetti-Ballester V., Kelner J.J., Aprikian O., Manach C., Morand C., Rémésy C. (2003).** Le rôle des différents nutriments et de leurs possibles interactions dans les effets santé de la pomme. Fruits 58: 297–306.
35. **Denis M.C., Furtos A., Dudonné S., Montoudis A., Garofalo C., Desjardins Y., Delvin E., Levy E. (2013).** Apple peels polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. PLoS ONE 8 (1): e53725. doi:10.1371/journal.pone.0053725.
36. **Depeint F., Gee J. M., Williamson G., et Johson I.T., (2002).** Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. Proceeding of the Nutrition Society, N°61 PP. 97-103.
37. **Didry N, Pinkas M et Torck M, 1982.** La composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *gaidelia*. PI med. Phytother. XVI. 7-15 p.

38. **Ding M., Lu Y., Bowman L., Huang C., Leonard S., Wang L., Vallyathan V., Castranova V., Shi X. (2004).** Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract. *Journal of Biological Chemistry* 279: 10670-10676.
39. **Dülger B., Gonuz A., (2004).** Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia* and *Stachys* species. *Pharm. Biol.* N°42 PP. 301-304.
40. **Eberhardt M.V., Lee C.Y., Liu R.H., (2000).** [Antioxidant activity of fresh apples.](#) *Nature*; N°405 PP. 903-904.
41. **El Ajjouri M., Badr S., Mohamed G., Abderrahman A., Abdellah F., Mohamed R., Fatiha A., et Mohamed A., (2008).** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. Vol.12 N°4 PP. 345- 351.
42. **Feliciano R., Antunes C., Ramos A., Serra A., Figueira M., Duarte C., De Carvalho A., Bronze M. (2010).** Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *J. of Functional Food* 2: 35-45.
43. **Fernandes I., Marques F., De Freitas V., Mateus N. (2013).** Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chemistry* 141: 2923-2933.
44. **Gatto MT., Falocchio S., Grippa E., Mazzanti G., Battinelli L., Nicolosi G., Lambusta D., Saso L., (2002).** Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acylestere. *Bioorg. Med. Chem.* Vol.10 N°2 PP. 269-272.
45. **Gerhauser C. (2008).** Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Medica* 74: 1608-1624.
46. **Gerhauser C., (2008).** Cancer chemopreventive potentiel of apples, apples juice, and apple components. *Plante Med* N°74 PP. 24-26.
47. **González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. 2007.** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricin hospitalaria* , Vol.22 N°3 PP. 287-293.
48. **Groot H., (1998).** Une sagesse ancienne remise au bout du jour. *Tabula*, N°3 PP. 4-9
49. **Guyot S., Doco T., Souquet J.-M., Moutounet M. et Drilleau J.-F. 1997.** "Characterisation of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. *Kermerrien*) skin and pulp." *Phytochemistry* 44(2): 351-357.

50. **Guyot, S., Le Bourvellec C., Marnet N. et Drilleau J.-F. 2002a.** "Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity." *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **35**: 289-291.
51. **Guyot, S., N. Marnet, D. Laraba, P. Sanoner and J. F. Drilleau. 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). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1698–1705.
52. **Hadi M., (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur 105P.
53. **Hansen L., (2009).** Fruit and vegetable intake and serum cholesterol levels: a cross-sectional study in the Diet, Cancer and Health cohort. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology; ISAFRUIT Special Issue*; PP. 42-46
54. **Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ed.Phytochemistry. Vol. 66* 2055P.
55. **Hayase F et Kato M, 1984.** Antioxydant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. vetaminol.* **30**, 37-46 p
56. **Hemminki K., Li X., Sundquist J., et Sundquist K., (2010).** Risk of cancer following hospitalization for type 2 diabetes. *Oncologist* N°15 PP. 548–555.
57. **Hertog M. G., (1996).** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.*, Vol.55 N°1B PP. 385-397.
58. **Hertog M., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., (1993).** Dietary antioxidant flavonols and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*; Vol.342 1007P.
59. **Hirose Y, Iwama F, (1984).** Antioxydant isolé de pépins de raisin. *Mélanges d'isomères optiques de catéchine. Yukagaku*, vol. 33, no7, pp. 435-438
60. **Joshiyura K.J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E., (2001).** The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*, N°134,1106P.
61. **Kahle K., Kempf M., Schreier P., Scheppach W., Schrenk D., Kautenburger T., Hecker D., Huemmer W., Ackermann M., Richling E. (2011).** Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr* **50**: 507–522.

62. **Kalaiselvi P., Rajashree K., Priya L.B., Padma V.V. (2013).** Cytoprotective effect of epigallocatechin3-gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells. *Food and Chemical Toxicology* 56: 110–118.
63. **Karou D., Dicko M.H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S., Traoré A.S., (2005).** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. *Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire*. PP. 8-11
64. **Katarzyna U., Anna M., Marta M., Joanna J.B., et Grzegorz W., (2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, Vol.62 N°2 PP. 132-135.
65. **Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S., (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, Vol.96 N°3 PP. 229-245.
66. **Knekt P., Jarvinen R., et Reunanen A., (1996).** Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* N°312 PP.81-87.
67. **Korban S. et R.M., Skirvin, (1994).** Nomenclature of the cultivated apple. *HortScience* N°19 PP. 177-180.
68. **Kuzuhara T, Iwai Y, Takahashi H, Hatakeyama D, Echigo N. (2009).** Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of influenza A virus RNA polymerase. *PLoS Curr.* Oct 13;1:RRN1052
69. **Lafaoun J. P., Tharaud- Payer, C. Et Levy G., (1996).** *Biologie des plantes cultivées- 2eme édition. Tome I- organisation / physiologie de la nutrition.* Ed. Lavoisier, Paris, 227 P.
70. **Lahoual M., (2004).** Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat d'état de l'université de Constantine.140P.
71. **Laufenberg, G., K. Kunz, and M. Nystroem. 2003.** Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87: 167-198.
72. **Leontowicz H., Leontowicz M., Gorinstein S., Martin-Belloso O. et Trakhtenberg S., (2007).** Apple peels and pulp as a source of bioactive compounds and their influence on

- digestibility and lipid profile in normal and atherogenic rats. *MedycynaWeterynaryjna*, Vol.63 PP. 1434–1436.
73. **Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2012).** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry* 130: 928–936.
74. **Li Q., Zhou S., Jing J., Yang T., Duan S., Wang Z., Mei Q., Liu L. (2013).** Oligosaccharide from apple induces apoptosis and cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 57: 245– 254.
75. **Licht T.R., Hansen M., Poulsen M., Dragsted L.O., (2010).** Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: role of apple pectin. *BMC Microbiol*; PP.10-13.
76. **Liu L., Li Y.H., Niu Y.B., Sun Y., Guo Z.J., Li Q., Li C., Feng J., Cao S.S. and Mei Q.B. (2010).** An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF-kB pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis* 31: 1822–1832.
77. **Luis JC., Valdes F., Martin R., Carmona AJ., Dimz J., (2006).** DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. *Lusitanicum*. *Fitoterapia*. Vol.77 N°6 PP.71-78.
78. **Macheix, A. Fleuriet, P. Sarni-Manchado et Cheynier V 2003** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire.
79. **Manach C., Mazur A., and Scalbert A., (2005).** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol*. N°16 PP.77–84.
80. **Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230– 42.
81. **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P., (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. N°89 PP. 411-420.
82. **Marfek A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.121P.

83. **Marfek A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.121P.
84. **Mattes R.D., Campbell W., (2009).** Effects of food form and timing of ingestion on appetite and energy intake in lean young adults and in young adults with obesity. J Am Diet Assoc N°109 PP. 430–437.
85. **Miliane H., (2004).** La quercitine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat. Paris, 155P.
86. **Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S., (1987).** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoides against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*.Ed. Phytochemistry, N°26 2234P.
87. **Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D., Roussis V., (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. Journal of Ethnopharmacology, Vol.123 N°1 PP. 143-148.
88. **Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P., Barrett J.f., (1993).** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. Vol.3, N°.2 P. 30-34.
89. **Parekh J. et Chanda S., (2007).** In vitro antibacterial activity of crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz flower (Lythaceae). Braz. J. Microbiol. N°38 PP. 2-4
90. **Peng I.W., Kuo S.M. (2003).** Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. J. Nutr. 133: 2184–2187
91. **Price, K. R., T. Prosser, A. M. F. Richetin and M. J. C. Rhodes. 1999.** A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. Food Chemistry 66: 489–494
92. **Ravrn H, Andary C, Kovacs G et Molgaard P, 1984.** cafféic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. Biochimie. Syst. Ecol. 17, 175-184 p.
93. **Recio M.C., Rios J. L. And Villar A., (1989).** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. Phototherapy. Res., N°3 PP. 117-125.
94. **Rehder, A. (1956).** : Manual of cultivated tress and shrubs ; Rehderedition -2nd, ed.New-York, the Macmillan Company, 996 p.

95. **Rice-Evans C.A., Miller N. J., Bolwer P.G., Bramley P.M. et Ridham J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.*, N°22, 375P.
96. **Rota M.C., A. Herrera, R.M. Martínez, J.A. Sotomayor, and M.J. Jordán. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* N°19 PP.681-687.
97. **Roupas P., Noakes M. (2010).** Apples, their antioxidants and benefits to human health. CSIRO Food and Nutritional Sciences.
98. **Rupasinghe V., Thilakarathna S., Nair S. (2012).** Polyphenols: chemistry, dietary sources and health benefits. Chapter Polyphenols of apples and their potential health benefits. Editions: Nova Science Publishers Inc. Hauppaug 333-368.
99. **Sanchez-Moreno C., (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* N°8 PP. 121–137.
100. **Sanchez-Tena S., Alcarraz-Viz n G., Marín S., Torres J.L., Cascante M. (2013).** Epicatechin gallate impairs colon cancer cell metabolic productivity. *J. Agric. Food Chem.* 61: 4310–4317
101. **Sanoner, P. (2001).** *Les polyphénols de la pomme à cidre : diversité variétale et oxydation* (Thèse de doctorat, Université de Caen Basse Normandie, FRA).
102. **Sanoner, P., S. Guyot, N. Marnet, D. Molle and J. F. Drilleau. 1999.** Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4847–4853.
103. **Sato M., Tsuchiya H., Takas I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M., (1995).** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Saphora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics *Phytother. Res.* N°7 PP. 12-15.
104. **Scalbert A., Williamson G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085.
105. **Serra A., Seabra I., Braga M., Bronze M., De Sousa H., Duarte C. (2010b).** Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *J. Supercritical Fluids* 55: 184-191.
106. **Serra A.T., Matias A.A., Frade R.F.M., Duarte R.O., Feliciano R.P., Bronze M.R., Figueira M.E., De Carvalho A., Duarte C.M.M. (2010a).** Characterization of

- traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods* 2: 46-53.
107. **Serra A.T., Rocha J., Sepodes B., Matias A.A., Feliciano R.P., De Carvalho A., Bronze M.R., Duarte C.M.M., Figueira M.E. (2012).** Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties - Correlation of response with composition. *Food Chemistry* 135: 2378–2386.
108. **Servais P., (2002).** Removal of biodegradable dissolved organic carbon in BAC filters: a modelling approach. *Proceedings of the IWA Conference on BAC filtration.* Delft.
109. **Shan B., Cai Y.Z., Brooks G.D., Cokk H., (2007).** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food Chemistry.* N°117 PP. 112-119.
110. **Shinohara K., Ohashi Y., Kawasumi K., Terada A. et Fujisawa T., (2010).** Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*; N°16 510P.
111. **Song JM, Lee KH, Seong BL. (2005).** Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res. Nov*;68(2):66-74.
112. **Szakiel A., Paczkowski C., Pensec F., Bertsch C. (2012).** Fruit cuticular waxes as a source of biologically active Triterpenoids. *Phytochem Rev.* 263-284.
113. **Szent-Györgyi A., (1938).** Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale* Vol.46 N°995 PP. 1893-1971.
114. **Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B., (2008).** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research,* Vol.7 N°3 PP. 1089-1099.
115. **Thilakarathna S.H., Wang Y., Rupasinghe H.P.V., Ghanam K. (2012).** Apple peel flavonoid- and triterpene-enriched extracts differentially affect cholesterol homeostasis in hamsters. *Journal of Functional Foods* 4: 963-971.
116. **Tow W.W., Premier R., Jing H., Ajlouni S. (2011).** Antioxidant and antiproliferation effects of extractable and nonextractable polyphenols isolated from apple waste using different extraction methods. *Journal of Food Science* 76.
117. **Twidwell, L.G., J. McCloskey, M., Gale-Lee,(2002).** Removal of Hazardous Constituents from Wastewater, In: *Proceedings Mineral Processing Plant Design, Control and Practice*, Vol. 2, Eds. A.L. Mular, D.N. Halbe, D.J. Baratt, Vancouver, Canada, SME , Littleton, CO., 1847P.
118. **USDA. (2008).** sur <http://www.ars.usda.gov>.

119. **Veeriah S., Kautenburger T., Habermann N., Sauer J., Dietrich H., Will F., Pool-Zobel B.L. (2006).** Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis* 45:164–174.
120. **Veeriah S., Kautenburger T., Habermann N., Sauer J., Dietrich H., Will F., Pool-Zobel B.L. (2006).** Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis* 45:164–174.
121. **Vieira F.G.K., Di Pietro P.F., Da Silva E.L., Borgesa G.S.C., Nunes E.C., Fett R. (2012).** Improvement of serum antioxidant status in humans after the acute intake of apple juices. *Nutrition Research* 32: 229–232.
122. **Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J. (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* N°84 PP. 152–158.
123. **Wang J. Et Mazza G. (2002).** Effects Of Anthocyanins And Other Phenolic Compounds On The Production Of Tumor Necrosis Factor A In LPS/IF N-Y Activated RAW 264. 7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem*, N°50. 4183P.
124. **Wang Z., Wilson, G.F., Griffith, L.C., (2002).** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the *Drosophila* Eag potassium channel. *J. Biol. Chem.* Vol.277 N°27 PP. [24022--24029](#)
125. **William, B.J., (2007).** “The original of the soxhlet extractor”, *Journal of Chemical Education*, Volume 84, n°12, Canada, pp 1913.
126. **Yang J., & Liu R. H., (2009).** Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.57 N°18 PP. 8581–8586.
127. **Yao M. et Roberts S.B., (2001).** **Dietary energy density and weight regulation.** *Nutr Rev*; N°59 PP.247–258
128. **Ying Shi, Jian Dai, Hua Liu, Ruo-Ran Li, Pei-Li Sun, Qiang Du, Ling-ling Pang, Zhen Chen, and Kai-Sheng Yin (2009).** Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-κB activity in a murine model of asthma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87(9): 729–735
129. **Ziberna L., Tramer F., Moze S., Vrhovsek U., Mattivi F., Passamonti S. (2012).** Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 1750–1759.

Annexes

Annexe 1

➤ Appareillage, Verrerie et Milieux de culture

Appareillage	Verrerie <i>et</i> consommables	Milieu de culture et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bain-marie ▪ Balance analytique ▪ Chromatographie liquide a haute performance (HPLC) ▪ Hôte à flux laminaire ▪ Plaque chauffante ▪ Etuve bactériologique (37°C) ▪ Evaporateur rotatif ▪ Réfrigérateur ▪ Etuve ▪ Broyeur électrique ▪ Spectrophotomètre UV-visible ▪ Agitateur magnétique ▪ Pied à coulisse ▪ Ultrason ▪ Purificateur d'eau ▪ Spectroscopie FTIR ▪ Soxhlet 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampoule à décanter. ▪ Ballons (250-500ml) ▪ Bêcher ▪ Boîtes de pétrie ▪ Flacons ▪ Erlen Meyer ▪ Pipettes Pasteurs ▪ Tubes à essai en verre ▪ Entonnoir ▪ Papier aluminium ▪ Spatule ▪ Papier filtre ▪ Disque d'imbibé de 9mm ▪ Seringues ▪ Portoir pour tubes ▪ Eprovette ▪ Cuvette de spectrophotomètre ▪ Ciseau ▪ Fiole ▪ Micro seringue ▪ Ecouvillons ▪ Cartouches pour soxhlet ▪ Micropipettes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gélose nutritive GN ▪ OGA <p>Réactifs utilisés :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Eau distillée ▪ Eau ultrapure ▪ L'eau de javel ▪ L'eau physiologique ▪ Ether di-éthylique ▪ Butanol ▪ Quercitine ▪ Acétate d'éthyle ▪ AlCl₃ (chlorure d'aluminium) ▪ Acide ascorbique ▪ Ether de pétrol ▪ Methanol ▪ Methanol grade HPLC ▪ Acide acetique

Annexe2

➤ Photos de quelques appareils :



Étuve



Evaporator rotatif



HPLC



Purificateur d'eau



Spectrophotomètre UV-visible



Spectrophotomètre FTIR



Ultrason



Lyophilisateur



Balance de precision



Pied a coulisse



Microseringue



Micropipette

Annexe 3

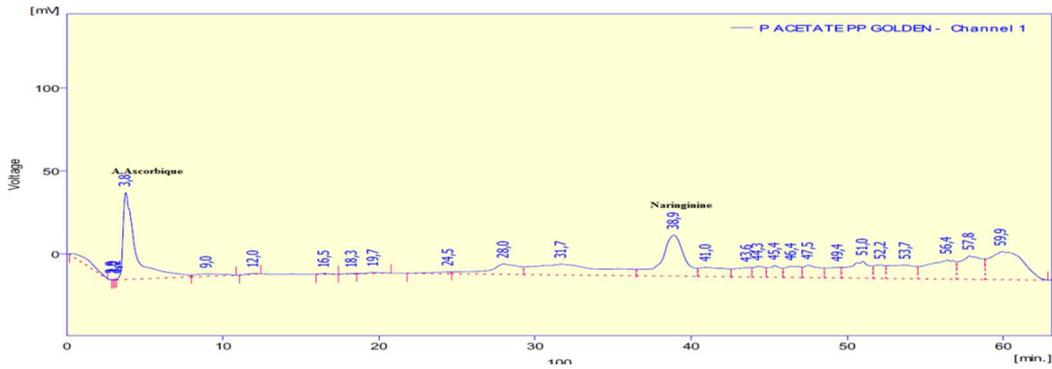


Figure 35: Identification des polyphénols de l'extrait d'acétate d'éthyle PP Golden delicious

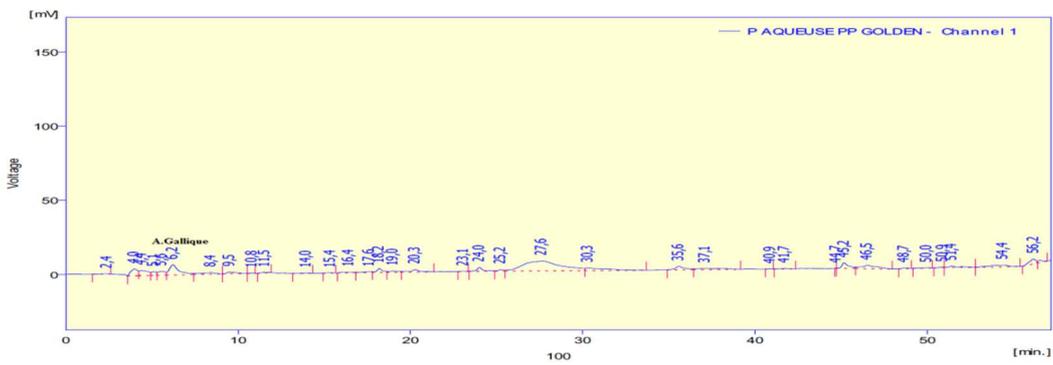


Figure 36: Identification des polyphénols de l'extrait Aqueux PP Golden delicious

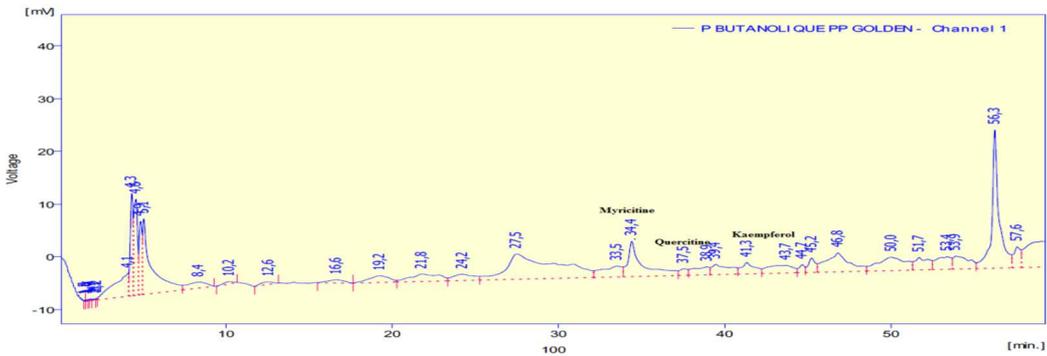


Figure 37: Identification des polyphénols de l'extrait butanolique PP Golden delicious

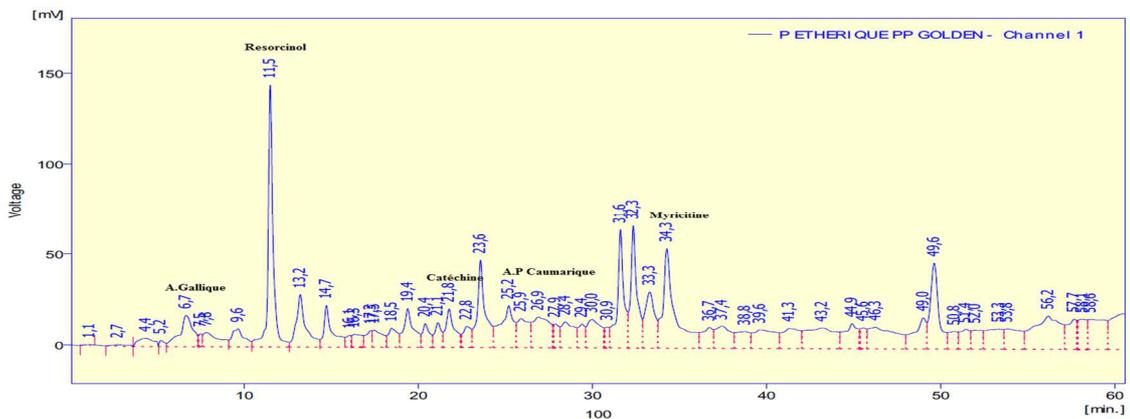


Figure 38: Identification des polyphénols de l'extrait étherique PP Golden delicious

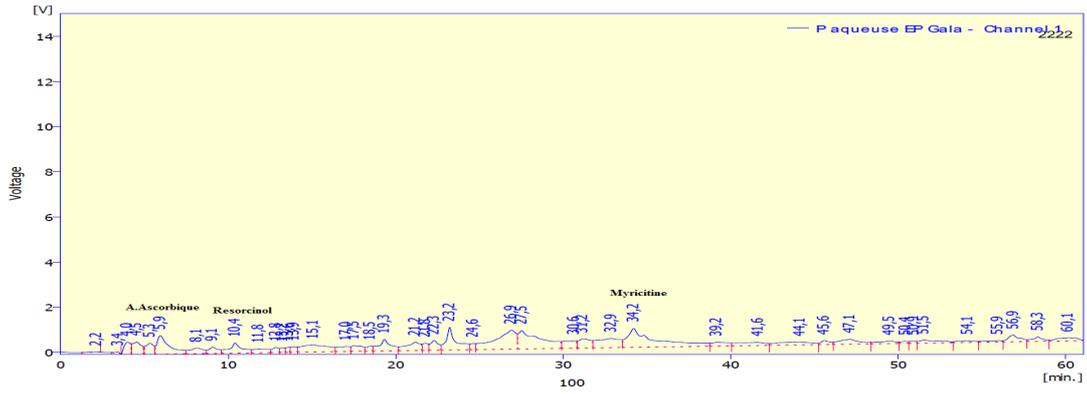


Figure 43: Identification des polyphénols de l'extrait aqueux EP Royal gala

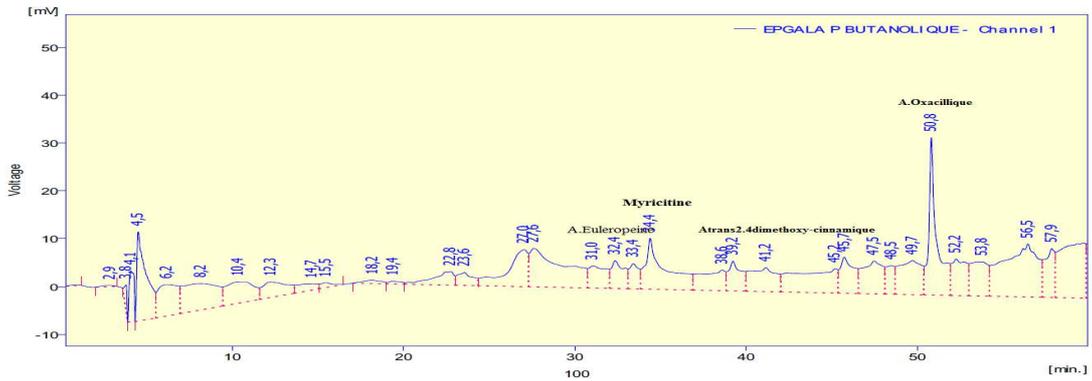


Figure 44: Identification des polyphénols de l'extrait butanolique EP Royal gala

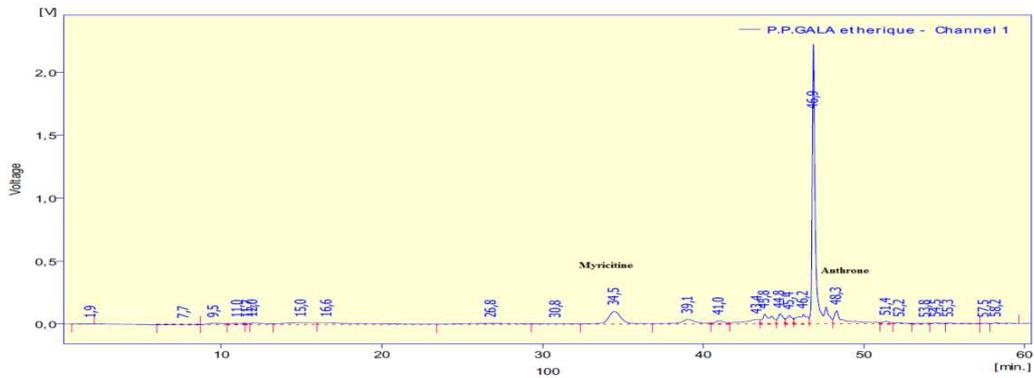


Figure 45: Identification des polyphénols de l'extrait étherique EP Royal gala

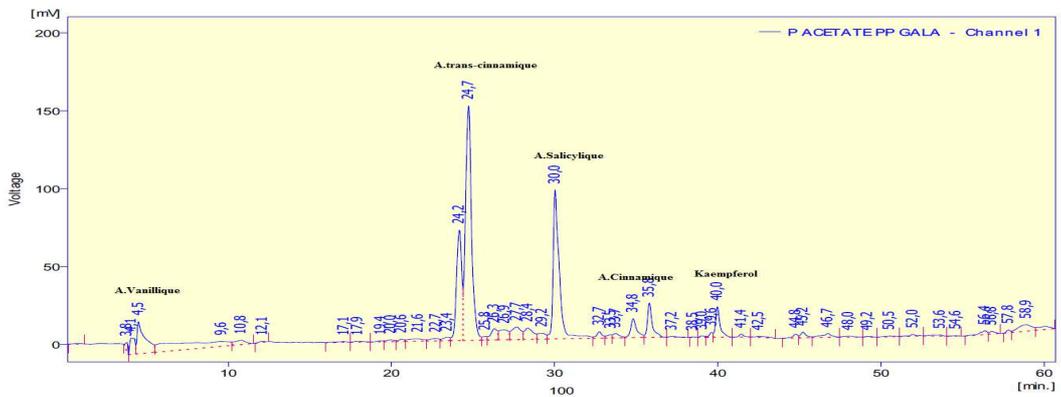


Figure 46: Identification polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle PP Royal gala

