MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf : ……./UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière** : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

BOUSLAH Aimen & SARI Nadjet

Thème

Influence des méthodes d'extraction sur la teneur en polyphénols des fruits de *Maclura pomifera*: évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne

Soutenu le: 17/09/2020 **Devant le jury composé de :**

Nom et Prénom	*Grade*		
Mme. BOUTELDJA Razika	*MCB*	*Univ. de Bouira*	*Présidente*
Mlle. BENSMAIL Souhila	*MAA*	*Univ. de Bouira*	*Promotrice*
Mme. DJOUAHRA-FAHEM Djamila	*MAA*	*Univ. de Bouira*	*Co-Promotrice*
Mlle. AIT MIMOUNE Nouara	*MCB*	*Univ. de Bouira*	*Examinatrice*

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions notre Dieu ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour achever ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice *Mme BENSMAIL Souhila* d'avoir accepté de nous encadrer, ainsi que pour les conseils, les orientations et le temps qu'elle nous a consacré à la réalisation de ce mémoire.

Un très grand merci à *Mme BOUTELDJA Razika* d'avoir accepté de présider notre jury.

Nous remercions également *Mme AIT MIMOUNE Nouara* d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Merci a toutes les personnes qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, qu'ALLAH vous protège.

A mes chers frères, Moussa et Abd el karim pour leur appui et leur encouragement.

A ma grande mère Louiza, A ma belle-soeur Lynda et A toute sa famille, merci du fond du cœur.

A mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mes amis Raouf, Fateh, Sidali, Sidahmed, Hamza, Yacine, Hicham, Khalef, Slimane, Menouer, Zaki, Riadh, Smail, Youcef, Mohammed, Tarek.

Merci d'être toujours là pour moi.

Aimen

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents que dieu les préserve et les garde en bonne santé.

A mes très chers frères et sœur : Amer, Mazigh, Ghania

Mon grand-père et ma grande-mère

Mes oncles et tantes ainsi que leurs épouses, époux et enfants

Mes chers cousins et cousines, spécialement: Abdarahmane, Youcef, Ayoub, Mariem, Malak et Sahara

Toutes mes amies

A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Nadjet

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction……. 01

Chapitre I : Partie bibliographique……. 03

I. *Maclura pomifera*…….. **03**

I.1. Généralités…….. **03**

I.2. Classification et systématique…… **03**

I.3. Les noms vernaculaires…….. **04**

I.4. Description botanique……. **04**

I.5. Les composés bioactifs de *M. pomifera*…… **07**

I.6. Utilisations…….. **07**

II. Les polyphénols……..... **09**

II.1. Définition et classification……..…….. **09**

II .1.1. Les non flavonoïdes……..... **09**

II.1.2. Les flavonoïdes…….. **11**

II.1.3. Les tannins……. **12**

II.2. La biosynthèse des polyphénols…… **13**

II.3. Propriétés biologiques des polyphénols…… **14**

II.3.1. Au niveau de la plante…… **14**

II.3.2. Au niveau de l'organisme…….. **14**

III. Méthodes d'extraction des composés bioactifs…….. **17**

III.1. Méthodes conventionnelles……. **17**

III.1.1. Macération…… **17**

III.1.2. Extraction par Soxhlet……..... **18**

III.1.3. Extraction par l'eau…….. **19**

III.2. Méthodes alternatives…….. **19**

III.2.1. Extraction assistée par microondes……... **19**

III.2.2. Extraction assistée aux ultrasons…….. **20**

Chapitre II : Matériel et Méthodes……... 22

I. Matériel……. **22**

I.1. Matériel non biologique……. **22**

I.2. Préparation du matériel végétal……..... **22**

II. Méthodes……..... **24**

II.1. Extraction des composés phénoliques……..... **24**

II.1.1. Extraction par macération……. **24**

II.1.2. Extraction par Soxhlet…… **24**

II.1.3. Extraction par sonication……..... **25**

II.1.4. Evaporation des extraits……. **26**

II.2. Méthodes de dosage……..... **26**

Chapitre III : Résultats et discussion…… 27

I. Effet de la méthode d'extraction……... **27**

I.1. Sur le rendement en polyphénols……... **27**

I.2. Sur le rendement en flavonoïdes……..... **29**

II. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes……..... **30**

III. Evaluation de l'activité antioxydante……..... **31**

IV. Evaluation de l'activité antibactérienne……..... **35**

IV.1. Activité antibactérienne des polyphénols……..... **35**

IV.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes……. **37**

V. Evaluation de l'activité antifongique……... **38**

Conclusion et perspectives…… 40

Références bibliographiques……. 42

Résumés

Liste des Abréviations

ABTS: *2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzotriazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt.*

BHT: Butylhydroxytoluène.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle.

EAG: Equivalent Acide Gallique.

EOR: Espèce Oxygène Réactive.

EQ: Equivalent Quercétine.

Fl-OH: Flavonoïdes.

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*.

GHZ: Géga Hertz.

H_2O_2: Peroxyde d'hydrogène.

$HO^{\bullet}$: Radical hydroxyle.

HO_2: Radical perhydroxyle.

KHz: kilo Hertz.

LDL: *Low Density Lipoproteine*.

MHZ: Méga Hertz.

MPa: Méga Pascal.

O_2^- : Anion superoxyde.

p/v: poids /volume.

$RO^{\bullet}$: Radical alkoxyle.

$ROO^{\bullet}$: Radical peroxyle.

v/v: volume/volume

Liste des Figures

Figure 1: La morphologie de l'arbre de *M. pomifera*……..……... **05**

Figure 2: L'aspect des feuilles de *M. pomifera*…… **05**

Figure 3: Les fleurs de *M. pomifera*……. **06**

Figure 4: L'aspect externe et interne du fruit de *M. pomifera*……. **06**

Figure 5: Structure chimique de base des acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques et des stilbènes…… **10**

Figure 6: Structure de base des flavonoïdes……. **11**

Figure 7: Structures chimiques de quelques flavanols……. **12**

Figure 8: Structures chimiques des tannins hydrolysables (a) et des tannins condensés(b) **13**

Figure 9: La technique de macération…….. **18**

Figure 10: Extraction par Soxhlet……..... **19**

Figure 11: Système d'extraction par microonde…….. **20**

Figure 12: Aspect des fruits de *M. pomifera* récoltés à l'état frais, séchés et la poudre obtenue après broyage……... **23**

Figure 13: Extraction des polyphénols de *M. pomifera* par macération…….. **24**

Figure 14: Procédé d'extraction par Soxhlet…… **25**

Figure 15: Extraction des composés phénoliques des *M. pomifera* par bain à ultrasons…. **26**

Figure 16: Structure chimique de l'osagine, la pomiférine et la macluraxanthone…… **33**

Figure 17: Pourcentage du DPPH restant en fonction de la concentration en polyphénols dans l'huile de fruits de *M. pomifera*……. **34**

Liste des Tableaux

Tableau I: Classification et systématique de l'espèce *M. pomifera*……. **04**

Tableau II: Avantages et inconvénients de l'extraction par ultrasons……. **21**

Tableau III: Liste du matériel non biologique utilisé pendant l'expérimentation……... **22**

Tableau IV: Teneurs en polyphénols de *M. pomifera* obtenus avec différentes méthodes d'extraction…… **28**

Tableau V: Comparaison de l'effet des solvants sur l'extraction des antioxydants phénoliques de *M. pomifera*…….. **29**

Tableau VI: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des différents extraits de *M. pomifera*……. **30**

Tableau VII: Résultats du test FRAP des différents extraits et flavonoïdes de *M. pomifera* …… **35**

Tableau VIII: Résultats des tests de diffusion sur disque pour l'extrait éthanoïque de *M. pomifera* (zones d'inhibition en mm)…… **36**

Tableau IX: Concentration minimale inhibitrice (µg/ml) de la pomiférine et l'osagine…. **37**

Tableau X: Effet antifongique du 2,3′,4,5′ tétrahydroxystilbène extrait du bois de *M. pomifera*……. **39**

INTRODUCTION

Introduction

Le règne végétal contient plusieurs substances biologiquement actives qui offrent à l'homme des ressources importantes à son hygiène, sa santé et son alimentation **(Bahorun *et al.*, 1996; Cherif *et al.*, 2015)**. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il existe plus de 4000 plantes médicinales, représentant 90% de la médecine traditionnelle en Afrique **(OMS, 2003)**. À l'heure actuelle, les fabricants développent des méthodes d'obtention des extraits et des principes actifs d'origine végétale tels que les coumarines, les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les terpènes afin de les exploiter dans la fabrication des médicaments **(Bahorun *et al.*, 1996)**.

Les plantes ont été utilisées comme des médicaments depuis longtemps à travers le monde. Dans les pays en développement, les herbes traditionnelles sont essentielles pour traiter les maladies et aider à découvrir de nouveaux antibiotiques **(Canli *et al.*, 2017)**.

La flore algérienne est connue par sa richesse et sa variété, formés une véritable bibliothèque phylogénétique, avec près de 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires **(Dobignard et Chatelain, 2010-2013)**. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, la flore médicinale de l'Algérie est encore inconnue, où seulement 146 espèces sont comptées comme médicinales **(Hamel *et al.*, 2018)**. Plusieurs espèces de la famille des *Moraceae* sont distribuées dans les différentes régions du pays. Elles sont caractérisées par plusieurs molécules bioactives et grâce à leurs propriétés biologiques, elles sont jusqu'à présent appliquées en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies **(Small et Catling, 2000; Sofowora, 2010)**. Parmi ces espèces, on trouve *Maclura pomifera*, communément appelée "*Osage orange"*, originaire du sud-ouest des États-Unis et caractérisée par sa richesse en polyphénols, en flavonoïdes et en alcaloïdes. Ces composés ont montré des propriétés anticancéreuses, antibactériennes, antidiabétiques, anti-inflammatoires et anti- nociceptives très intéressantes **(Su *et al.*, 2017; Orazbekov *et al.*, 2018)**. La plante possède également un effet très important pour traiter certaines pathologies comme l'eczéma, les blessures, le psoriasis, les verrues, certains types d'allergie cutanée, les fissures des pieds et des mains.

Le choix de la plante *Maclura pomifera* comme un sujet pour notre projet de fin d'étude est stimulé par le nombre faible des travaux déjà effectués et publiés sur ces composants bioactifs et leurs effets thérapeutiques. En plus, la méconnaissance de ses vertus par notre

population nous a encouragé afin d'initier cette recherche et d'améliorer la position de cette plante dans notre médecine traditionnelle.

Les objectifs visés par notre travail ciblent l'étude de l'influence de quelques méthodes d'extraction, conventionnelles et innovantes, sur le rendement en polyphénols des fruits de *M. pomifera*. Cette influence sera par la suite confirmée grâce à l'estimation des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits obtenus par des dosages colorimétriques. L'évaluation de certaines activités biologiques (activité antioxydante, activités antibactérienne et antifongique) des extraits phénoliques assure le développement d'une corrélation entre la méthode d'extraction, les teneurs en composés bioactifs d'intérêt et leur influence sur les trois activités ciblées. En dernier lieu, ces résultats seront comparés par rapport à ceux obtenus pour le latex qui caractérise les fruits à l'état frais afin de révéler l'effet du séchage.

La présente étude est subdivisée en trois parties, initiée par une synthèse bibliographique, suivie par la partie expérimentale afin d'atteindre les objectifs précédemment cités. La troisième partie qui doit représenter normalement nos résultats a été transformée à une comparaison entre les résultats obtenus par d'autres travaux de recherche réalisés sur la même plante. Cette modification a été la seule solution suite à l'arrêt des manipulations expérimentales au niveau des laboratoires vu la situation de confinement imposée par l'état afin d'éviter la propagation de la pandémie du COVID-19 au niveau des établissements universitaires.

CHAPITRE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUES

I. *Maclura pomifera*

I.1.Généralités

Maclura pomifera est une plante originaire d'Amérique du Nord, qui est souvent cultivée dans le monde entier comme arbre ornemental, en raison de ses feuilles scintillantes et ses fruits attrayants ou comme des clôtures vivantes (haies) le long des limites des fermes, grâce à ses fortes épines **(Plese et Miličić, 1973; Moser *et al*., 2011)**. Il provient d'une zone limitée centrée sur la vallée de la rivière Rouge dans le sud d'Oklahoma et le nord du Texas **(Del Weniger, 1996)** et est facilement reconnaissable par son gros fruit vert caractéristique **(Moser *etal*., 2011)**. *Maclura pomifera* est communément appelé "*Osage Orange*" ou "l'oranger des Osages" qui vient de la forme et de la taille de ses fruits ressemblant aux oranges, bien qu'ils n'aient rien à voir avec les agrumes **(Smith et Perino, 1981)** et du fait que le bois de cet arbre a été utilisé par la tribu indienne Osage pour construire des arcs **(Raffeneau-Delile, 2008)**.

En 1804, Lewis et Clarke ont découvert l'oranger des Osages dans la région du fleuve Mississipi **(Raffeneau-Delile, 2008)**. La dénomination scientifique de cet arbre par "*Maclura pomifera"* a été faite par le géologue américain William Maclure (1763-1840) **(Wagner, 1952)**. Cet arbre a été nommé et décrit pour la première fois par Constantine Samuel Rafinesque, qui l'a appelé *Ioxylon pomiferum* en 1817. Ensuite en 1818, son nom a été changé en *Toxylon pomiferum,* puis en *Joxylon pomiferum* en 1819. En 1818, Thomas Nuttallet l'a nommé *Maclura aurantiaca* en trouvant un peuplement de l'espèce. D'autres nomenclatures de cet arbre sont: *Broussonetia tinctoria, Toxylon aurantiacum* et *Toxylon maclura* **(Konya *et al*., 2017)**.

I.2. Classification et systématique

Maclura pomifera (Raf.) Schneid (1906) est une espèce monotypique qui fait partie de la famille des Moracées (mûriers) (**Tableau I**) (**Gardner *et al.*, 2017; Stojiljković *et al*., 2018)**. Elle est composée de 37 genres et approximativement de 1100 espèces **(Gardner *et al*., 2017)**. L'oranger des Osages est un arbre dioïque qui se trouve dans les zones désertes et des endroits inattendus **(Smith et Perino, 1981; Arab *et al*., 2019)**.

Tableau I: Classification et systématique de l'espèce *M. pomifera* **(Salem et Mohamed, 2013)**.

Régne	: *Plantae*
Sous règne	: *Tracheobionta*
Superdivision	: *Spermatophyta*
Division	: *Magnoliophyta*
Classe	: *Magnoliopsida* – Dicotylédones
Sous-classe	: *Hamamelididae*
Ordre	: Urticales
Famille	: *Moraceae*
Genre	: *Maclura* Nutt. – *Maclura*
Espèce	: *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid.

I.3. Les noms vernaculaires

Cette plante est connue par plusieurs noms telle que: *Americain Breadfruit, root-wood, bow-wood, hedge, bois d'arc, bois jaune, pomme de haie, pomme de cheval, pomme des Osages, orange du Kansas, Mock orange, Naranjo chino, Osage plum, Osage Thorn, Palo de Arco, Prairie Hedge plant*, etc. **(Ferro, 2014)**. En arabe est connue sous les noms suivants : شجرة المخ أو المخيخ, عيش المسافر, الغرموش

I.4. Description botanique

L'arbre de *M. pomifera* est épineux d'une hauteur de 15 à 20 m (**Fig. 1**) **(Smith et Perino, 1981)**, elle pousse vigoureusement sur tous les sols, y compris les sols alcalins **(Burns et Honkala, 1990)** et se caractérise par un taux de croissance rapide surtout en plein de soleil **(Watson, 1993; Tisserat *et al.*, 2019)**. Il a un tronc court, une couronne arrondie **(Starr *et al.*, 2003)** et une écorce profondément sillonnée avec une teinte orange **(Fratzl-Zelman *et al.*, 2016)**. Le bois du cœur est très dur, lourd, résistant à l'abrasion, extrêmement durable et insensible aux termites **(Starr *et al.*, 2003)**. La plante se propage facilement à partir des graines ou des boutures et elle est pollinisée par le vent. Des grandes quantités de pollen sont libérées, provoquant parfois le rhume des foins **(Peattie, 1953)**.

Les feuilles sont caduques, ovoïdes -oblongues, avec une base ronde et un apex pointu. Les jeunes feuilles sont pubescentes, alors que les adultes sont lisses **(Botta et Monache, 1995)**, lancéolées, sinuées, a une nervation pennée, alternes le long des rameaux, ovales acuminées, à bord lisse et prennent une couleur jaune à l'automne. Ils mesurent 4-12 cm de

long et 2-6 cm de large avec des marges entières (**Fig. 2**) **(Fratzl-Zelman *et al.*, 2016)**.

Figure 1: La morphologie de l'arbre de *M. pomifera* **(Jauron, 2010)**.

Figure 2: L'aspect des feuilles de *M. pomifera* (**Coder, 2016)**.

Les fleurs sont petites caractérisées par une couleur verte à jaune verdâtre apparaissant après les feuilles, de la moitié du mois mai jusqu'au juin **(Pool, 1919)**. Les fleurs staminées sont disposées en racèmes axillaires, à long pédoncule d'environ 2,5 à 4 cm du long sur l'éperon terminal des feuilles de la saison précédente. Ces fleurs ont quatre calices lobés avec étamines exsertes, mais sans pétales **(Stephens, 1969)**. L'arbre contient des pieds mâles groupés en grappe et des pieds femelles formés une inflorescence dense où les fleurs sont soudées entre elles. Chacune donne des akènes entourés par des sépales accrescents qui deviennent charnus (**Fig. 3**) **(Smith et Perino, 1981)**.

Figure 3: Les fleurs de *M. pomifera* **(Botta et Monache, 1995)**.

Le "hedge-ball" est un fruit multiple composé de nombreux druplets, à une structure globuleuse vert jaunâtre, de 8 à 12 cm de diamètre **(Vines, 1960; Stephens, 1969)**. L'intérieur du fruit est blanc, compact, homogène avec de petites pépins de couleur marron foncée, exhale un parfum citronné légèrement épicé (**Fig. 4**) **(Maaoui, 2014)**. Les fruits mûrissent en septembre-octobre et pèsent environ 150 à 700 g avec une moyenne de 450 g. Ils sont imprégnés d'un jus laiteux et collant qui provoque une dermatite chez certaines personnes. Les arbres peuvent commencer à porter leurs fruits à 10 ans. Les graines mesurent 8-12 mm du long et sont intégrés dans la cal charnu **(Vines, 1960)**. Ils sont de couleur crème au début, mais brunissent après vieillissement ou exposition à l'air. Le fruit de *M. pomifera* est non comestible mais certains animaux peuvent consommer leurs graines comme les mammifères, les grands herbivores (ex. chevaux, mulets,..) **(Clopton, 1953)** et autres animaux (renards, colin de virginie, ratons laveurs, cailles blanches et autres oiseaux) **(Barnett et Burton, 1997; Ferro, 2014)**.

Figure 4 : L'aspect externe et interne du fruit de *M. pomifera* **(Konya *et al.*, 2017)**.

I.5. Les composés bioactifs de *M. pomifera*

Maclura pomifera est caractérisé par plusieurs composés phénoliques qui ont été isolés et identifiés à partir des différentes parties de la plante, à savoir: les triterpènes, les stilbènes, les flavonols, les isoflavonoïdes des fruits (osajine et pomiférine) et les xanthones du bois de cœur et de l'écorce du tige, ainsi que deux flavanones (euchrestaflavanone B et euchrestaflavanone C) et quatre xanthones de l'écorce des racines (osanjaxanthone, alvaxanthone, macluraxanthone et 8-prényltoxyloxanthone) **(da Costa *et al.*, 1999; Rong Tsao *et al.*, 2003)**.

Les graines contiennent une protéine, l'hémagglutinine, qui agglutine les érythrocytes humains grâce à sa capacité de se lier à des α-D-galactopyranosides, et de la lectine qui est un mitogène lymphocytaire **(Bausch et Poretz, 1977)**. Des quantités inhabituelles de peptidases à sérine sont contenues dans le latex des fruits de *M. pomifera*. Ces protéases ont été utilisées pour hydrolyser les protéines et coaguler le lait **(Bertucci *et al.*, 2015)**.

Un alcaloïde, la maclurine présente dans toutes les parties de l'arbre. L'écorce est riche en acide tannique qui donne une teinture jaune **(Rong Tsao *et al.*, 2003)**. Les graines renferment des acides gras comme l'acide linoléique, l'acide stéarique, méthylesters d'acides gras, l'acide palmitique, du triacyl glycérol et de tocophérol **(Konya, 2017)**.

I.6. Utilisations

Les extraits de *M. pomifera* ont été utilisés en médecine traditionnelle dans le monde entier. La décoction préparée à partir des racines de *M. pomifera* est utilisée pour le traitement des yeux endoloris par les indiens Comanches d'Amérique du Nord **(Kupeli *et al.*, 2006)**. En Bolivie, la sève est utilisée pour le traitement des douleurs dentaires, alors les feuilles ont été utilisées pour traiter l'hémorragie utérine **(Bourdy *et al.*, 2004)**.

Plusieurs études ont montré que les composés bioactifs obtenus à partir des différentes parties de la plante présentent différentes activités: insectifuge, antibactérienne **(Jerkovic *et al.*, 2007)**, anti-tumorale, anti-inflammatoire, antipaludique, antioxydante, antifongique **(Canli *et al.*, 2017)** et anti-malaria **(Konya *et al.*, 2017)**. En plus, deux isoflavones prénylées isolées, la scandénone et l'auriculasine, ont montré une activité anti-nociceptive **(Arab, 2017)**.

L'extrait total des fruits de *M. pomifera* a montré une activité significative envers les récepteurs cannabinoides et éventuellement les interactions allostériques avec les récepteurs opiacés. Récemment, les isoflavones isolés de l'orange des Osages exercent une activité protectrice pour les cellules nerveuses du cerveau contre l'effet toxique du peptide β-

amyloïde; qui est considéré comme le responsable de la dégénérescence des neurones chez les malades par Alzheimer. Cependant, les mécanismes par laquelle ces isoflavones bloquent la toxicité du peptide β-amyloïde restent inconnus **(Orazbekov *et al.*, 2018)**.

La pomiférine qui est un constituant du fruit de *M. pomifera* présente un effet gastro-protectif contre les dommages gastriques provoquées par l'indométacine chez les rats, avec une absence totale de toxicité selon la littérature **(Bozkurt *et al.*, 2017)**.

Récemment, il a été prouvé que la farine des graines du fruit possède les qualités appropriées pour être utilisée dans la lubrification, comme un biocarburant et dans des préparations cosmétiques et pharmaceutiques **(Moser *et al.*, 2011; Ferro,2014; Harry-O'Kuru *et al.*, 2015)**.

Aux États-Unis, depuis les années 1930 et grâce à la résistance du bois de l'oranger des Osages, il est utilisé comme protection contre le vent, contre l'érosion des sols et dans la fabrication des poteaux et des clôtures pour les bétail **(Starr *et al* .,2003; Elliot *et al.*, 2017)**. Il est également utilisé dans la transformation des aliments et la production des pesticides et des teintures. Grace à sa résistance aux maladies et aux insectes, l'arbre de *M. pomifera* est cultivé dans différents pays du monde, pour son aspect décoratif dans de nombreux parcs, ce qui permet de fournir un abri et une couverture pour la faune **(Burns et Honkala, 1990)**.

II. Les polyphénols

II.1. Définition et classification

Les végétaux sont la source principale des polyphénols, qui sont considérés comme des métabolites secondaires permettant la défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phyto-micronutriments et principalement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et des fruits (jaune, orange, rouge). Les polyphénols comportent environ 8000 composés **(Edeas, 2007)** qui sont devisés en deux grands groupes: les non flavonoïdes contenant les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et principalement les coumarines **(Hoffmann, 2003)** et les flavonoïdes, dont les composés essentiels sont représentés par : les flavones, isoflavones, flavanones, flavonols, anthocyanines, proanthocyanidines et les flavanols **(Pincemail *et al.*, 2007)**.

II.1.1. Les non flavonoïdes

II.1.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques ayant au moins une fonction carboxyle et un groupe hydroxyle phénolique. Ils sont divisés en deux sous-classes: les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique **(Thompsen *et al.*, 1984)**.

A. **Acides hydroxybenzoïques C6-C1** (**Fig. 5a**): ce sont des acides sous forme libre et à l'état d'esters ou hétérosides sous forme combiné **(Afanas'ev *et al.*, 1989)**. Cette sous classe est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices et les fraises. La concentration de ces acides peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme dans les fruits rouges et l'oignon **(Murota *et al.*, 2004)**. Les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique sont les acides hydroxybenzoïques majeurs dans les végétaux **(Chanforan, 2010)**.

B. **Acides hydroxycinnamiques C6-C3** (**Fig. 5b**): ce sont des acides estérifiés rarement libres et peuvent être amidifiés ou combinés avec des sucres ou des polyols tels que l'acide quinique **(Thompsen *et al.*, 1984; Afanas'ev *et al.*, 1989)**. Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, dont les concentrations les plus élevées sont observées dans la partie externe du fruit mûr. Les pommes de terre, les pêches, les oranges, les pommes, les tomates et le raisin sont les principales sources des acides hydroxycinnamiques **(Laura *et al.*, 2009)**.

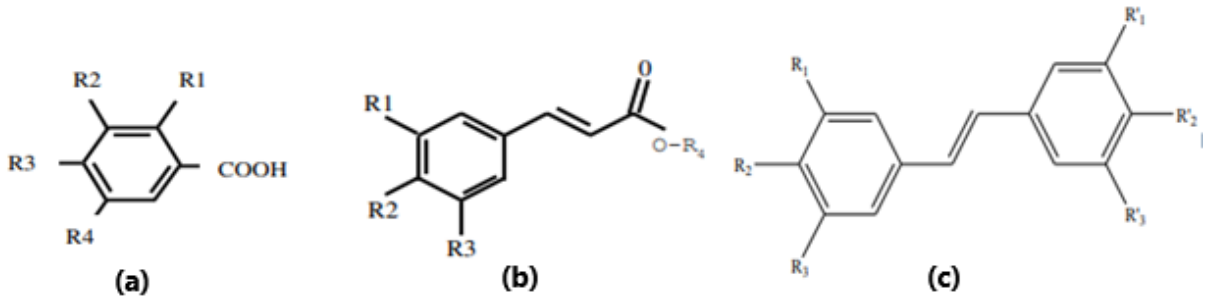

Figure 5: Structure chimique de base des acides hydroxybenzoïques (a) **(Thompsen *et al.*, 1984)**, acides hydroxycinnamiques (b) **(Afanas'ev *et al.*, 2001)** et des stilbènes **(Parage, 2013)**.

II.1.1.2. Stilbènes

Ces composés ont une structure C6-C2-C6 (**Fig. 5c**), avec un cycle A qui possède deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B caractérisé par des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en position méta, ortho et para. Deux cycles aromatiques sont reliés par une double liaison pour former un système conjugué. Les stilbènes sont présents en petites quantités dans l'alimentation humaine **(Belkheiri *et al.*, 2010)**, dont les principales sources sont le raisin et le vin **(Sun *et al.*, 2006)**.

II.1.1.3. Lignines $(C6\text{-}C3)_n$

La lignine est un polymère fortement ramifié, constitué de trois alcools phénoliques simples. Chez les plantes, les alcools s'oxydent en radicaux libres par une enzyme ubiquiste, la peroxydase. Les radicaux libres réagissent au hasard et de façon spontanée pour former de la lignine **(Hopkins, 2003)**.

II.1.1.4. Lignanes $(C6\text{-}C3)_2$

Lignanes sont représentées par la structure de type $(C6\text{-}C3)_2$ dont laquelle l'unité (C6-C3) est considérée comme un propylbenzène et définit comme des composés bioactifs, non-nutritifs et non caloriques. Elles sont abondantes dans le lin et les graines de sésame et à des faibles quantités dans les fruits et les légumes **(Peterson *et al.*, 2010)**.

II.1.1.5. Coumarines C6-C3

Elles ont considérés comme des composés phénoliques non volatils, qui se trouvent dans de nombreuses parties des végétaux telles que les racines et les écorces. Elles sont caractérisées par des odeurs agréables, dont certains sont utilisés en parfumerie ou pour aromatiser le tabac, par contre d'autres sont très toxiques. Les coumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés émanant des cétones de l'α-pyrone. Il s'agit d'une lactone de

l'acide ortohydroxycinnamique **(Garabeth *et al.*, 2007)**.

II.1.1.6. Les quinones

Ces substances présentent deux fonctions cétones. Elles sont généralement des couleurs rouge, jaune ou orange et brillantes. Les quinones servent comme des colorants, des médicaments et des fongicides. Elles sont répondues non seulement dans les végétaux mais également au niveau des animaux et des microorganismes **(Kansole, 2009)**.

II.1.2. Les flavonoïdes

Ils regroupent plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils possèdent des pigments qui jouent le rôle de colorations jaune, orange et rouge des différentes parties des végétaux **(Ghedira, 2005)**. La structure de base de tous les flavonoïdes est C6-C3-C6 (**Fig. 6**). Ils possèdent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux noyaux aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C **(Tapas *et al.*, 2008)**. Parmi les classes principales des flavonoïdes on cite: les flavones, les flavonoles, les flavanones, les flavan-3-ols, les anthocyanes et les isoflavones **(Sadasivam *et al.*, 2003)**.

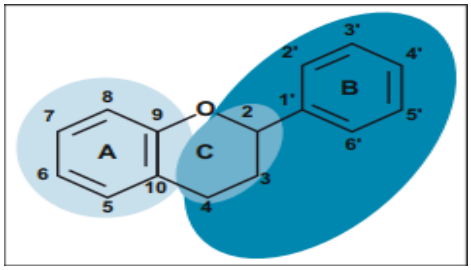

Figure 6: Structure de base des flavonoïdes **(Chira *et al.*, 2008)**.

II.1.2.1. Flavonols et flavones

Les flavonols appartiennent à la classe des flavonoïdes qui sont largement répandus. La myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol sont des flavonols généralement présents sous forme d'O-glycosides **(Crozier, 2003)**.

Les flavones sont des composés glycosylés, leur structure est très proche des flavonols avec l'absence du groupement OH en C3 et constituée aussi de nombreuses substitutions, telles que l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C-alkylation **(Bohm *et al.*, 1998)**.

II.1.2.2. Flavanones et flavan-3-ols

Les flavanones sont définis par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2. Les réactions d'hydroxylation, d'O-méthylation et de glycosylation sont formées grâce à la haute réactivité de la structure des flavanones.

L'hespéridine (hespéridine-7-O-rutinoside) est le flavanone le mieux connu des agrumes **(Chira *et al.*, 2008)**.

Les Flavan-3-ols rassemblent les diverses catéchines (catéchine, epicatéchine, epicatéchine gallate, gallocatéchine gallate, gallocatéchine) ainsi que les pro-anthocyanidines. Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un groupe OH en position 3 (**Fig. 7**) **(Tabart, 2011)**.

Figure 7: Structures chimiques de quelques flavanols **(Manach *et al.*, 2004)**.

II.1.2.3. Isoflavones

Ils possèdent des structures similaires aux œstrogènes. Le cycle aromatique B est lié en C3 au lieu du C2 comme chez les autres flavonoïdes, avec des groupements OH en position C7 et C3. Le soja est la source alimentaire principale des isoflavones **(Tabart, 2011)**.

II.1.2.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont considérées comme le groupe le plus grand et le plus varié des colorants hydrosolubles des plantes **(Kopjar *et al.*, 2009)**. Elles sont présentes dans les vacuoles des cellules les plus externes (épidermes et hypodermes) et dérivent de la voie des phényl-propanoïdes. Il existe au moins 20 anthocyanidines différentes dans le nombre et la position de leurs groupes hydroxyles et méthoxyles. Plusieurs molécules d'anthocyanes se diffèrent dans la stabilité. Cette différence est due à la modification des parties glycosyliques et aromatiques ou aliphatiques des anthocyanidines **(Guignard, 2000; Kuti, 2004; Oren-Shamir, 2009)**.

II.1.3. Les tanins

Ce sont des composés phénoliques qui possèdent la capacité de se combiner aux protéines en solution et de les précipiter **(Silanikove *et al.*, 2001)**. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, etc.) **(Zhang *et al.*, 2010)** et sont caractérisés par une structure complexe constituée d'unités répétitives monomériques qui se diffèrent par

leur degré d'oxydation et leurs centres asymétriques **(Hemingway, 1989)**. Les tanins sont divisés en deux grandes classes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés **(Jacob *et al.*, 1972)**.

II.1.3.1. Tanins hydrolysables

Ils correspondent à des oligo ou des polyesters d'un sucre, généralement le D-glucose, et d'un nombre différent d'acide phénolique (**Fig. 8a**). Ce dernier est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins, soit l'acide éllagique dans le cas des tanins classiquement dénommés éllagitanins **(Jean, 2009)**.

II.1.3.2. Tanins condensés

Ils sont définis comme des polymères flavaniques formés par des unités de flavan-3-ols maintenues ensemble par des liaisons C-C (**Fig. 8b**). Ils se diffèrent des tanins hydrolysables par l'absence de sucre dans leurs molécules et leur structure est proche de celle des flavonoïdes **(Jean, 2009)**.

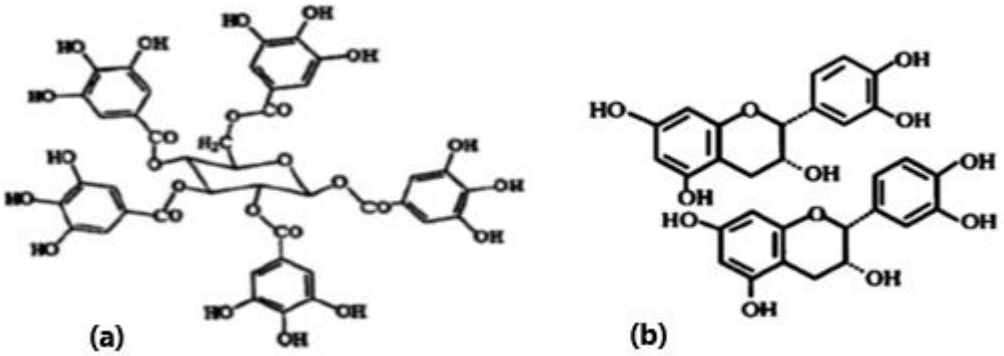

Figure 8: Structures chimiques des tanins hydrolysables (a) et des tanins condensés (b) **(Jean, 2009)**.

II.2. La biosynthèse des polyphénols

La synthèse des composés phénoliques se fait à partir des hydrates de carbone *via* la voie d'acide shikimique et la voie d'acétate. Les acides cinnamiques et leurs dérivés sont produits après transamination et désamination au cours de la première voie alors que les poly-cétoesters ou polyacétates (malonate) sont produits via la deuxième voie. Les composés phénoliques peuvent se combiner avec des oses ou bien à des acides **(Chira *et al.*, 2008)**.

II.3. Propriétés biologiques des polyphénols

II.3.1. Au niveau de la plante

Les principales fonctions de ces composés dans les plantes sont de prévenir les agents pathogènes, les parasites et les ennemis naturels et de limiter les dommages causés par les rayons ultraviolets. Dans ce cas, ils jouent un rôle protecteur et antioxydant **(Legrand, 2015)**. Ils existent dans diverses parties des plantes supérieures et participent dans de nombreux processus physiologiques, tels que la reproduction, la croissance cellulaire, l'enracinement et la germination **(Boizot *et al.*, 2006)**. De plus, ils donnent aux plantes une couleur et une odeur uniques **(Liu *et al.*, 2007)**.

II.3.2. Au niveau de l'organisme

Plusieurs études récentes ont ciblé les polyphénols, notamment les flavonoïdes vu leurs différentes propriétés physiologiques telles que les activités antiallergique, anti-arthérogénique, hépato-protective anti-inflammatoire, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anti-carcinogénique, anti-thrombotique, vasodilatoire et cardio-protective **(Middleton *et al.*, 2000; Ksouri *et al.*, 2007)**. Ces effets sont attribuées à leur propriété antioxydant qui est du à leurs fonctions redox impliquées dans la destruction oxydative par neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou la décomposition des peroxydes **(Nijveldt *et al.*, 2001)**.

Les polyphénols jouent des fonctions bénéfiques importantes dans deux domaines: la phytothérapie et l'industrie alimentaire **(Leong *et al.*, 2002)**. Plusieurs études prouvent l'effet positif de la consommation des polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, à cause de leur activité antioxydante qui assure une bonne conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Actuellement, les industriels commercialisent des aliments riches en polyphénoles. L'application pratique des polyphénoles en industrie cosmétique apparait dans la lutte contre la production des radicaux libres néfastes pour la peau **(Hennebelle *et al.*, 2004)**.

II.3.2.1. Polyphénols et cancer

L'action des composés phénoliques sur les lignées des cellules cancéreuses humaines permet d'en protéger et de réduire le nombre de tumeurs et leur croissance **(Scalbert *et al.*, 2005)**. Ces composés se réagirent par plusieurs mécanismes telles que: l'activité oestrogénique ou antioestrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention du stress oxydant, activité anti-inflammatoire et le

changement de la signalisation cellulaire **(Garcia-Lafuente *et al.*, 2009)**.

II.3.2.2. Rôle antioxydant des polyphénols

Les polyphénoles ont des propriétés antioxydantes et sont capables de capter les radicaux libres produits en permanence par l'organisme ou formés en réponse aux agressions environnementales (polluants,cigarette, infections...) tels que O_2^- (anion superoxyde), HO_2 (radical perhydroxyle ou hydroperoxyle: H–O–O•), H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), HO• (radical hydroxyle), RO• (radical alkoxyle), ROO• (radical peroxyle) et l'O_2 **(Mukhtar *et al.*, 2000)**.

La capacité des polyphénols à neutraliser les radicaux libres est due à la richesse de leurs structures en résidus hydroxyles. Ils sont considérés comme des antioxydants primaires et radicalaires qui permettent de ralentir la formation des radicaux libres et interrompre la chaîne auto-catalytique. toutefois, les mécanismes des polyphénols ayant des effets bénéfiques sur la santé *via* une action antioxydante ne sont pas élucidés **(Spencer *et al.*, 2001)**. Les polyphénols peuvent agir selon différents mécanismes:

1. **L'inhibition enzymatique**

Des études *in vitro* indiquent que les polyphénols ont la capacité de se lier à des protéines. Dans le cas des flavonoïdes, ils permettent l'inhibition d'un grand nombre enzymes (**Haslam, 1996; Havesteen, 2002)**, la modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que des processus de transcription de certains gènes.

En plus des effets antioxydants, ces interactions, qui sont encore à valider *in vivo*, peuvent être à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes. Par exemples, les acides hydroxycinnamiques sont des inhibiteurs de protéines de coagulation (la thrombine et le facteur Xa) qui peuvent agir comme anticoagulants **(Monien *et al.*, 2006)**.

Les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, inhibent la production des espèces réactives oxygénées (EOR) par formation du complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR **(Dangles *et al.*, 2006; 2008)**. Cette double procédure est bien expliquée dans le cas de la xanthine oxydase, une enzyme qui est connue comme une source biologique importante pour le superoxyde oxydatif. Une étude sur la goutte **(Hansaki *et al.*, 1994)**, a montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et peuvent donc protéger contre cette maladie en réduisant les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains.

2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ou de cuivre sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils s'impliquent surtout dans la composition des hémoprotéines et des cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour le superoxyde dismutase), mais ils agissent aussi pour produire des radicaux hydroxyles en réduisant le peroxyde d'hydrogène. Les polyphénols qui se trouvent dans les plantes et dans les aliments sont considérés comme de bons agents chélateurs des ions métalliques **(Morris *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1998; Hider *et al.*, 2001)**.

3. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été largement étudiée pour déterminer les principaux éléments de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox **(Jovanovic *et al.*, 1994)**, les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux superoxydes, peroxyles, alkoxyles et hydroxyles plus vite par transfert d'hydrogène**.(Laouini, 2014).**

II.3.2.3. Protection contre les maladies cardiovasculaires

L'effet protecteur des polyphénols sur le système cardiovasculaire est de mieux en mieux connu. Selon une étude néerlandaise, le taux de mortalité par les maladies coronariennes s'est diminué chez les hommes âgés à cause de la consommation des alimentes riches en flavonoïdes **(Hertog *et al.*, 1995)**. La prévention de ce type de pathologies se fait par l'intervention des mécanismes d'action des polyphénols *via* l'inhibition de l'oxydation du LDL, l'agrégation des plaquettes et de la formation des cellules spumeuses dans les aortes **(Scalbert *et al.*, 2005)**.

III. Méthodes d'extraction des composés bioactifs

Le grand intérêt des métabolites secondaires a poussé les recherches dans le cadre des études phytochimiques et biologiques **(Jones et Kinghorn, 2006)**. L'extraction de ces composés bioactifs consiste à séparer les parties médicinales actives des composants inactifs ou inertes en utilisant des solvants sélectifs **(Handa, 2008)**. L'efficacité de l'extraction réside dans la sélection et la préparation minutieuse des échantillons toute en faisant des recherches approfondies afin de trouver des protocoles qui conviennent à une classe particulière de composés ou d'espèces de plantes. Le choix du procédé idéal garantit une réduction des contaminations par des composés interférents et d'empêcher la décomposition d'importants métabolites ou la formation d'artefacts en raison des conditions d'extraction ou d'impuretés du solvant **(Jones et Kinghorn, 2006)**. Plusieurs procédures d'extraction sont à distinguer et qui peuvent être classées en deux catégories: conventionnelle et alternative.

III.1. Méthodes conventionnelles

Les techniques conventionnelles sont des méthodes anciennes utilisées pour avoir à partir des plantes, différentes substances phytochimiques. Elles regroupent plusieurs méthodes différentes **(Nguyen van, 2010)**.

III.1.1. Macération

La macération est une technique courante qui sert à extraire de petites quantités de substances végétales en laboratoire, car elle peut être effectuée commodément dans des Erlenmeyers **(Jones et Kinghorn, 2006)**. Elle est largement adoptée et utilisée dans la recherche sur les plantes médicinales et dans la vinification **(Azwanida, 2015)**.

Cette technique se base sur le trempage des matières végétales (grossières ou en poudre) dans un récipient contenant un solvant approprié, qui peut être renouvelé plusieurs fois, et fermé avec du parafilm ou du papier aluminium pour empêcher l'évaporation, puis laissé sous agitation fréquente à température ambiante pendant une période minimale de 3 jours (**Fig. 9**). Le traitement sert à adoucir et briser la paroi cellulaire du tissu végétal afin de libérer les composés phytochimiques solubles. Après 3 jours, le mélange est pressé et filtré puis concentrer par évaporation du solvant. Dans cette méthode conventionnelle, la chaleur est transférée par convection et conduction, dont le choix du solvant déterminera le type du composé à extraire **(Azwanida, 2015)**.

La simplicité, la facilité de mise en œuvre, le faible coût et la possibilité d'augmenter l'échelle d'extraction sont les principaux avantages de la méthode **(Jones et Kinghorn, 2006;**

Mandal *et al*., 2015; Colvin, 2018). Cependant, elle n'assure pas une extraction complète du composé recherché qu'après trois changements du solvant d'extraction, au minimum. De plus, des contaminations bactériennes sont révélées si le solvant utilisé est l'eau **(Nguyen van, 2010; De Silva *et al*., 2017)**.

Figure 9: La technique de macération (**Mwangi, 2018)**.

III.1.2. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet, est une technique standard utilisée pendant longtemps et se considère comme la référence principale pour évaluer la performance des autres méthodes d'extraction solide-liquide **(Nguyen van, 2010)**.

Au niveau de l'appareil Soxhlet (**Fig. 10**), l'échantillon est introduit dans une cartouche qui pendant toute l'opération est progressivement lavé par un solvant frais ou une combinaison de solvants par évaporation à partir d'un ballon de distillation. Lorsque le liquide parvient le niveau de débordement, un siphon aspire le solvant d'extraction de la cartouche et le décharge à nouveau dans le ballon de distillation, transportant les composés extraits dans le liquide en vrac. Cette opération est répétée jusqu'à l'extraction complète **(Mandal *et al*., 2015)**.

Du même que la macération, l'extraction par Soxhlet est une méthode simple, non couteuse et qui ne nécessite pas une étape de filtration. Cependant, elle présente des limites comme la consommation des volumes importants du solvant et le temps prolongé d'extraction, ce qui peut dégrader les composés cibles (**Nguyen van, 2010)**.

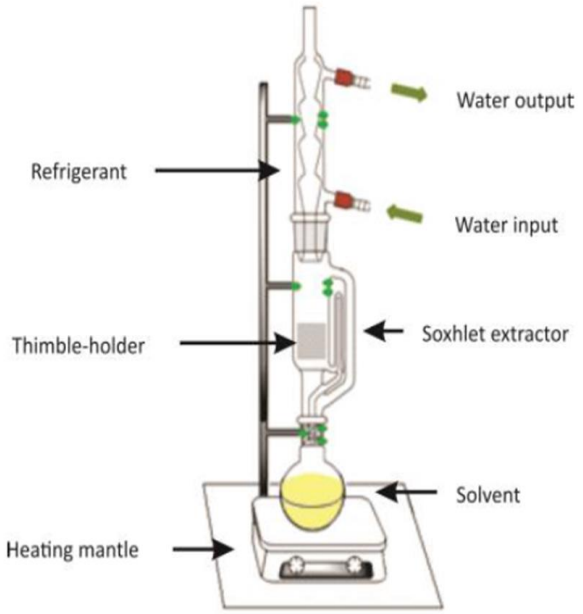

Figure 10: Extraction par Soxhlet **(Guntero *et al*., 2017)**.

III.1.3. Extraction par l'eau

Malgré que les médicaments traditionnels soient préparés généralement par extraction à l'eau sous forme d'infusions (trempage dans de l'eau chaude ou froide) ou de décoctions (extraction à l'eau bouillante); de nombreux chercheurs ne préfèrent pas de travailler avec des extraits aqueux pour plusieurs raisons:

- La difficulté de séparation des constituants solubles dans l'eau par des méthodes conventionnelles comme la chromatographie sur gel de silice.
- Vu le haut point d'ébullition de l'eau et de sa tension superficielle élevée, le processus de concentration des extraits d'eau par un évaporateur rotatif est très difficile.
- L'eau n'est pas un solvant idéal pour l'extraction de nombreux constituants végétaux biologiquement actifs. Il assure une extraction préférentielle des composés polaires, bien que certains composés hydrophobes soient également extraits en raison de la co-solubilité et du fait que la polarité de l'eau diminue à des températures élevées **(Jones et Kinghorn, 2006)**.

III.2. Méthodes alternatives

III.2.1. Extraction assistée par microondes

Les microondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques avec une fréquence allant de 300 MHZ à 300 GHZ, dont la fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm **(Kaufmann et Christen, 2002)**.

Le principe du chauffage par micro-ondes est fondé sur l'effet direct des micro-ondes sur les molécules par conduction ionique et rotation dipolaire (**Fig. 11**). Ces deux mécanismes ont lieu simultanément généralement dans de nombreuses applications. Lorsqu'un champ électromagnétique est appliqué, une migration électrophorétique des ions est subie, c'est la conduction ionique. La résistance de la solution à ce flux d'ions entraînera un frottement et donc chauffera la solution. La rotation des dipôles signifie le réalignement des dipôles avec le champ appliqué. À 2450 MHz, qui est la fréquence utilisée dans les systèmes commerciaux, les dipôles s'alignent et randomisent $4{,}9\times10^{9}$ fois par seconde et ce mouvement moléculaire forcé entraîne un échauffement **(Eskilsson et Björklund, 2000)**.

Par comparaison au Soxhlet, l'extraction par microondes est plus rapide et exige des volumes faibles en solvant afin d'assurer des rendements plus élevés. Néanmoins, elle présente quelques inconvénients:

- La méthode est limitée en termes de solvants et de nature de la matière solide;
- Les composés thermolabiles ne peuvent pas être extraits;
- Le solvant doit posséder une propriété diélectrique pour donner un meilleur rendement **(Kaufmann et Christen, 2002; Mandal *et al*., 2015; Rocchetti *et al*., 2019)**.

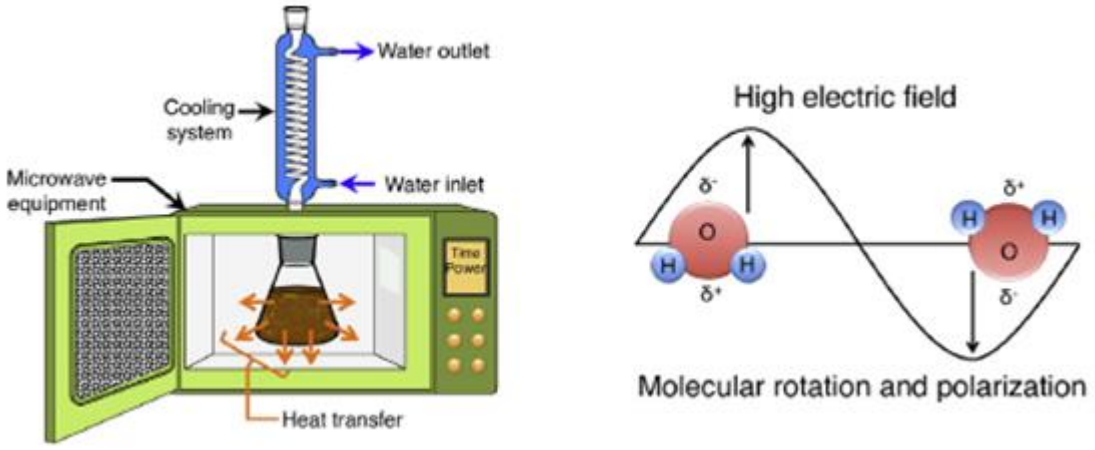

Figure 11: Système d'extraction par microonde **(Barba *et al*., 2016)**.

III.2.2. Extraction assistée aux ultrasons

Les ultrasons sont des fréquences supérieures à 20 kHz, qui est le seuil de détection auditive humaine. La source de sortie de l'ultrason est généralement un corps vibrant, qui fait vibrer le milieu environnant, puis l'onde ultrasonore transfère l'énergie à d'autres particules voisines. La puissance, la fréquence et l'amplitude sont les principaux paramètres jouant un rôle vital dans le processus de sonication **(Wen *et al*., 2018)**.

Les ultrasons peuvent produire la cavitation, les vibrations et l'écrasement dans le milieu d'extraction. Ces effets peuvent briser la paroi cellulaire et s'appliquer avec succès dans les processus d'extraction des composants du produit naturel. Lorsque les ondes ultrasonores sont en contact avec la surface du matériel végétal, les bulles de cavitation s'effondrent et des micro-jets rapides s'orientent vers la surface du matériel végétal. Ces derniers provoquent la décomposition de la paroi cellulaire et l'exsudation du contenu cellulaire, de sorte que divers composés peuvent être extraits des plantes naturelles **(Wen *et al.*, 2018)**. Le **tableau II** résume les différents avantages et inconvénients liés à l'utilisation des ultrasons pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes.

Tableau II: Avantages et inconvénients de l'extraction par ultrasons **(Mandal *et al.*, 2015; Dzah *et al.*, 2020)**.

Avantages	**Inconvénients**
Rendement élevé	Les effets d'ultrasons sur le rendement d'extraction peuvent être liés à la nature de la matrice végétale
Temps d'extraction réduit	La quantité de puissance dissipée du bain dans le système analytique n'est généralement pas très importante
La capacité de conserver l'activité biologique des composés extraits	L'intensité élevée de l'irradiation peut produire des espèces radicales pouvant interférer avec les composés extraits

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes

Une partie de ce travail a été réalisée au sein de la faculté SNV-ST, au niveau des laboratoires de Biochimie et de Microbiologie (Département de Biologie). En vue de la conjoncture difficille que notre pays traverse et dans l'impossibilité de déplacer durant le confinement appliqué depuis le mois de Mars, on était dans l'obligation de cesser les manipulations sans avoir les résultats prévus de notre étude.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel utilisé au cours de cette procédure est récapitulé dans le tableau III.

Tableau III: Liste du matériel non biologique utilisé pendant l'expérimentation.

Réactifs et produits chimiques	Verrerie et petit materiel	Appareils
Ethanol 96%	Spatule Flacon Ballon à fond rond 250 mL Erlenmeyers 250 mL Béchers Fioles 250 mL Entonnoirs Parafilm, coton Papier filtre wattman N°1 Eprouvette: 10 mL, 25 mL Micropipette: 100-1000 µL Cartouche de Soxhlet	Agitateur magnétique (Jlab Tech) Balance analytique (KERN) Hotte chimique (Cruma 670) Bain Marie (Nuve Bath) Bain à ultrasons (SELECTH) Rota-vapeur (Stuart) Etuve (Venticell) Soxhlet (BEHR) Broyeur éléctrique (NEüFU)

I.2. Préparation du matériel végétal

Les fruits de *M. pomifera* ont été récoltés au mois de Novembre 2019 dans la Wilaya de Sétif. Au niveau du laboratoire, les échantillons ont été lavés par l'eau de robinet afin de débarrasser de la poussière, puis conserver à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Les fruits sont découpés par la suite en petits morceaux, puis séchés à l'étuve à 37˚C pendant une semaine. Les

échantillons séchés sont stockés dans un récipient en verre recouvert par le papier aluminium afin d'éviter la photo-oxydation qui peut altérer la composition en substances bioactives. Les fruits séchés sont broyés à l'aide d'un mixeur électrique afin d'obtenir une poudre fine avant de procéder aux différentes méthodes d'extraction (**Fig. 12**).

Figure 12: Aspect des fruits de *M. pomifera* récoltés à l'état frais, séchés et la poudre obtenue après broyage.

Un certain nombre de fruits de *M. pomifera* récoltés (à l'état frais) ont été utilisés sans passer par une étape de séchage, afin d'extraire le latex blanc. Pour cela, nous avons procédé à découper les fruits en deux morceaux avec un couteau propre. Le latex a été récupéré dans des tubes coniques *via* un entonnoir. L'application d'une pression sur les morceaux est nécessaire afin de libérer à chaque fois le maximum du latex. Ce dernier a été conservé au congélateur avant de passer à l'étape de centrifugation, qui indispensable pour éliminer toutes traces de particules.

II. Méthodes

II.1. Extraction des composés phénoliques

II.1.1. Extraction par macération

On introduit dans deux Erlenmyers de 250 mL, 10 g de la poudre des fruits de *M. pomifera*, puis on ajoute 33,33 mL d'éthanol 96%, ce qui correpond à un rapport de 1:3,33 (p/v). Avant de lancer l'extraction, les deux Erlenmyers ont été recouverts complètement avec du papier aluminium alors leurs orifices ont été fermés avec du parafilm. On les place par la suite sur une plaque agitatrice pendant 72 h (**Fig. 13**). Une fois la durée est atteinte, les extraits sont récupérés sans passer par une étape de filtration. Sur les résidus obtenus, on a ajouté 16,6 mL d'éthanol 96% afin de procéder à une deuxième extraction pendant 48 h **(Vuorela, 2005)**. Après filtration, sur coton puis sur papier Wattman N°1, les extraits des deux étapes ont été mélangés puis conservés dans des flacons propres à 4°C.

Figure 13: Extraction des polyphénols de *M. pomifera* par macération.

II.1.2. Extraction par Soxhlet

Une quantité de 20 g de la poudre des fruits de *M. pomifera* a été introduite dans une cartouche poreuse. Avant de placer cette dernière au niveau de l'extracteur de l'appareil, la cartouche a été recouverte avec du coton afin d'éviter le débordement de la poudre pendant l'extraction. Un volume de 250 mL d'éthanol 96% est mis dans un ballon à fond rond placé sur la plaque chauffante du Soxhlet (**Fig. 14**). L'extraction a été réalisée pendant 6 h avec une température de 60-70˚C, jusqu'à l'épuisement de la coloration caractéristique de la poudre.

Après refroidissement, l'extrait récupéré au niveau du ballon est transféré dans un flacon puis conservé à 4˚C.

Figure 14: Procédé d'extraction par Soxhlet.

II.1.3. Extraction par sonication

Dans deux Erlenmyers de 250 mL, nous avons introduit séparémment 10 g de poudre des fruits additionnés de 33,33 mL d'éthanol 96%. Les orifices ont été fermés par le parafilm puis coiffés avec du papier aluminium. Les deux Erlenmyers sont placés par la suite dans un bain à ultrasons rempli avec de l'eau distillée, puis exposés aux ultrasons, en utilisant une fréquenece fixe de 40 KHz pendant 2 h (**Fig. 15**). Afin d'éviter l'augmentation de la température pendant l'extraction, l'eau distillée du bain a été renouvelée selon les besoins. Après 2 h, les extraits récupérés sont filtrés à travers du coton afin de débarasser de la poudre, puis filtrés une autre fois à l'aide du papier Wattman N°1. Les extraits filtrés sont conservés à 4°C jusqu'à l'évaporation.

Figure 15: Extraction des composés phénoliques de *M. pomifera* par bain à ultrasons

II.1.4. Evaporation des extraits

Après toutes ces extractions, une étape d'évaporation par un rota-vapeur est préconiseé pour éliminer l'excès d'éthanol et récupérer les différents extraits phénoliques de *M. pomifera*. Ces derniers sont transférés dans des petits flacons recouverts par le papier aluminium puis placé dans l'étuve (35-40°C) afin d'éliminer les traces du solvant. Les extraits obtenus sont consérvés à 4°C et à l'ombre.

II.2. Méthodes de dosage

Les différentes techniques de dosage prévues durant notre travail ne sont pas réalisées vu la situation du confinement appliquée afin d'éviter la propagation de la pandémie du COVID-19. Il s'agit de détermination des rendements en polyphénols obtenus après chaque méthode d'extraction, le dosage des polyphénols **(Sfahlan *et al.*, 2009)**, des flavonoïdes **(Bahroun *et al.*, 1996)** et de l'activité anti-oxydante **(Djerrad *et al.*, 2015)** des différents extraits et de l'extrait brut.

L'estimation des activités antibactérienne **(Bolou *et al.*, 2011)** et antifongique **(Grover et Moore, 1962)** a été également prévue afn d'étudier les différentes activités biologiques des extraits phénoliques de *M. pomifera* par comparaison à son extrait brut.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

I. Effet de la méthode d'extraction

I.1. Sur le rendement en polyphénols

Afin de révéler l'influence de la méthode d'extraction sur le rendement en polyphénols des fruits de *M. pomifera,* **Peterson et ses collaborateurs (2000)** ont choisi deux procédés d'extraction, la macération et le Soxhlet. La partie exploitée des fruits est la croûte (écorce) définie comme étant la partie du fruit allant de la surface externe vers l'intérieur jusqu'à le périmètre externe de la couche de graines.

Pour chaque expérience, 250 g de la matière végétale séchée ont été mélangés soit avec l'hexane, le méthanol ou le dichlorométhane. Après 24 h d'extraction pour les deux procédés, les résultats obtenus montrent que l'extraction au Soxhlet en utilisant le méthanol assure le meilleur rendement de 11,2% (poids d'extrait = 28 g). La substitution du méthanol par le dichlorométhane pour le même procédé baisse le rendement en polyphénols jusqu'à atteindre une valeur de 0,736% (extrait de 1,84 g). Du même, un rendement plus faible de 0,308% a été remporté avec l'hexane.

Cette différence est principalement induite par la nature du solvant qui a une relation étroite avec la solubilité des composés bioactifs recherchés. De plus, le premier extrait obtenu par l'application du méthanol, présente un aspect visqueux même après évaporation. Les résultats liés à cette extraction ont été interprétés sur la base de la solubilité des autres constituants tels que l'amidon, les sucres et l'eau dans le méthanol chaud, ce qui augmente de manière significative la masse de l'extrait méthanoïque.

Dans une autre étude, trois méthodes d'extraction ont été choisies cette fois par **Altuner *et al.* (2012)** afin de maximiser le rendement en polyphénols obtenus à partir des fruits de *M. pomifera*. Pour cela, deux méthodes conventionnelles, la macération et le Soxhlet, ont été comparées à une nouvelle méthode basée sur l'application d'une haute pression hydrostatique. En plus, deux systèmes solvants ont été sélectionnés pour chaque méthode d'extraction, il s'agit du méthanol et un mélange de solvants eau: éthanol: méthanol: acétone avec les proportions suivantes: 2,5/2,5/2/2 (v/v/v/v). Les quatre solvants peuvent être classés selon leur polarité croissante comme suivant: acétone<éthanol<méthanol<eau.

Les résultats obtenus (**Tableau IV**) montrent que le système solvant ou le cocktail choisi assure une extraction totale supérieure par comparaison à celle obtenue par le méthanol. Ces résultats ont été expliqués sur la base de la solubilité des polyphénols dans les systèmes solvants par effet de la différence de polarité, étant donner que le système solvant

utilisé est plus polaire par rapport le méthanol seul **(Altuner *et al.*, 2012)** et tout dépend de la nature chimique (simple ou polymérisée), les propriétés structurelles et physico-chimiques des polyphénols de *M. pomifera*. De plus, la présence d'une teneur plus élevée en eau dans le système solvant provoque un gonflement du matériel végétal, ce qui entraîne une augmentation du contact avec le solvant, contribuant ainsi à une amélioration du rendement d'extraction (**Mahmoudi *et al.*,2013)**.

Tableau IV: Teneurs en polyphénols de *M. pomifera* obtenus avec différentes méthodes d'extraction **(Altuner *et al.*, 2012)**.

Méthode	**Teneur en polyphénols (µg EAG/mL)**	**Temps d'extraction**
Macération+méthanol	319	2 h
Macération+Cocktail de solvants	358	
Soxhlet+méthanol	316,9	14 h
Soxhlet+ Cocktail de solvants	345	
500 MPa+ méthanol	760	10 min
500 MPa+ Cocktail de solvants	913,2	

Cependant l'extraction par haute pression hydrostatique a été la plus rentable avec un taux en polyphénols de 913,2 µg EAG/mL d'extrait obtenu suite à l'application d'une pression de 500 MPa pendant uniquement 10 min. De plus, il a été révélé que le rendement en polyphénols dans le cocktail de solvants augmente avec l'augmentation de la pression hydrostatique, qui est interprété par l'effet de la pression sur l'amélioration de la solubilité des composés phénoliques.

Il est clair selon les résultats présentés dans le tableau en dessus, que la macération est plus efficace que l'extraction par Soxhlet pour les deux systèmes solvants utilisés. Ces résultats sont expliqués par la sensibilité de la plupart des composés phénoliques à plusieurs facteurs de dégradation tels que la température, la présence d'oxygène et la lumière. En conséquence, la méthode d'extraction par Soxhlet a donné un rendement plus faible en composés phénoliques par rapport la macération vu qu'elle expose ces composés à une haute température et à l'oxygène **(Altuner *et al.*, 2012)**.

Les composés bioactifs s'accumulent, dans la plupart des cas, dans des vacuoles situées à l'intérieur de la cellule végétale entourée d'une paroi rigide. La température élevée peut éclater la paroi cellulaire et libérer les composés bioactifs dans la solution d'extraction. En raison de l'effet de chauffage, les composants de la cellule se dissolvent plus efficacement

dans le solvant. Cependant lorsque le temps d'extraction est prolongé, il favorise la diminution du rendement d'extraction car la température élevée entraîne l'oxydation, l'épimérisation et la dégradation des composés désirés (**Vuong *et al.*,2013) ;(Jiménez-Moreno *et al.*,2019).**

L'efficacité relative des différents solvants pour l'extraction des antioxydants phénoliques de *M. pomifera* a été étudiée par **Schall et Quackenbush (1956)**. La démarche appliquée durant cette étude est une série d'échantillons de 50 g de poudre séchée et traitée dans un extracteur de type Soxhlet. Ils ont constaté que le méthanol était le solvant le plus efficace des autres solvants essayés (acétate d'éthyle, trichloréthylène, chloroforme) puisqu'il présente une polarité plus élevée (chloroforme<acétate d'éthyle<méthanol).

Tableau V: Comparaison de l'effet des solvants sur l'extraction des antioxydants phénoliques de *M. pomifera* **(Schall et Quackenbush, 1956)**.

Solvants	**Rendement (%)**
Acétate d'éthyle	23,9
Trichloréthylène	18,2
Chloroforme	21,8
Méthanol	51,8

I.2. Sur le rendement en flavonoïdes

Dans le travail publié par **Tsao *et al.* (2003)**, deux composés phénoliques, plus spécifiquement des isoflavones, l'osajine et la pomiférine ont été extraits par macération à partir de 594 g de fruits de *M. pomifera* découpés en petits morceaux puis trempés dans 700 mL d'acétate d'éthyle pendant 24 h. La masse de l'extrait brut sec obtenu est de 9,12 g ce qui représente un rendement en polyphénols de 1,53%. L'osajine et la pomiférine représentent 25,7% (2,344 g) et 36,2% (3,301 g) de l'extrait brut, respectivement. La teneur des deux isoflavones dans le fruit de *M. pomifera* est de 9,5 g/kg de fruit répartie en 0,39% pour l'osajine et 0,55% pour la pomiférine. Ils ont constaté que cette teneur en isoflavones est la plus élevée par rapport à tous les travaux réalisés auparavant sur des matières végétales contenant des isoflavones.

L'étude menée par **Ribaudo *et al.* (2015)** a également ciblé ces deux isoflavones, dont l'extraction par Soxhlet à partir de 200 g de fruits de *M. pomifera* dans 1 L de l'éther di-éthylique pendant 16 h a été le procédé choisi cette fois. L'étape d'extraction a été précédée

par une délipidation avec 1 L de l'éther de pétrole pendant 48 h. Les rendements obtenus sont plus faibles par rapport l'étude précédente et correspondent à 4 g (2%) d'osajine et 0,7 g (0,35%) de pomiférine.

II. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Dans la majorité des travaux, l'estimation de la teneur en polyphénols extraits à partir des fruits de *M. pomifera* a été réalisée par la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteu.

Orhan *et al.* (2016) ont révélé un taux moyen en polyphénols de l'ordre de 196,06±2,75 mg EAG/g d'extrait sec, suite à l'utilisation de l'acétate d'éthyle comme le solvant d'extraction. Ce taux a été diminué après la substitution de ce solvant par l'un des solvants indiqués dans le **Tableau VI** jusqu'à atteindre la valeur la plus faible de 24,41±0,31 mg EAG/g d'extrait sec en présence de l'éthanol.

Tableau VI: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des différents extraits de *M. pomifera* **(Orhan *et al.*, 2016)**.

Solvant d'extraction	Teneurs en polyphénols (mg EAG/g d'extrait)	Teneurs en flavonoïdes (mg E.Quercetine/g d'extrait)
Acétate d'éthyle	196,06±2,75	66,13±4,30
Ethanol	24,41±0,31	1,25±0,26
Eau distillée	47,66±1,17	11,23±2,42
n-butanol	64,76±1,62	10,22±0,45

Peu des travaux déjà réalisés sur les polyphénols de *M. pomifera* s'intéressent à la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux. Selon notre recherche bibliographique, un seul article celui publié par **Orhan *et al.* (2016)** ont signalé que la concentration en flavonoïdes totaux des extraits de fruits de *M. pomifera* est de l'ordre de 1,25±0,26 mg E.Quercetine/g d'extrait sec obtenu après une extraction avec l'éthanol (**Tableau VI**). La substitution de ce solvant par l'acétate d'éthyle augmente de manière très significative la teneur en flavonoïdes pour atteindre la valeur de 66,15 ± 4,30 mg E.Quercetine/g d'extrait sec. L'estimation de ces teneurs a été procédée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium.

Dans une étude qui a ciblé cette fois les polyphénols de l'écorce des racines de *M. pomifera,* un taux très proche a été trouvé par **Teixeira *et al.* (2009)** de l'ordre de 186,96 mg E.catéchine/g d'extrait. Ce taux a été assuré par une nouvelle méthode d'extraction basée sur le broyage dans un mortier en verre en présence du sable de mer et du n-hexane. Il est à noter

que le rendement en polyphénols totaux obtenus à partir de 150 mg d'échantillon était 73 mg (48,67%) ce qui reflet la richesse de l'écorce des racines de *M. pomifera* en composés phénoliques, où macluraxanthone représente le constituant majoritaire (1,374 g/100g de poudre) avec une absence totale de l'osajine et la pomiférine.

Selon les travaux déjà publiés, le rendement en polyphénols achevé par **Teixeira *et al.* (2009)** est le plus élevé par rapport aux résultats obtenus avec le fruit de *M. pomifera.* La différence entre les teneurs en polyphénols de ces travaux est due à plusieurs facteurs qui influent le rendement d'extraction en ces composés. Parmi ces paramètres, on peut se référer: la méthode et le solvant d'extraction, le temps d'exposition au solvant, les conditions climatiques et environnementales dans lesquelles la plante a été cultivée et qui peuvent influencées la qualité des échantillons, la sensibilité de la méthode de dosage,…

Dans une autre étude, les polyphénols contenant dans l'huile des graines de *M. pomifera* ont été dosés après leur extraction **(Fatnassi *et al.*, 2010)**. L'extraction de l'huile à été réalisée par Soxhlet via l'hexane pendant 8 h. Par la suite, les polyphénols ont été extraits deux fois par le méthanol à partir de 2 g d'huile par la technique de macération pour obtenir un extrait méthanoïque. Les résultats de dosage démontrent que le contenu en phénols totaux dans l'huile des graines de *M. pomifera* est faible correspondant à 8,5 mg/100g d'huile.

III. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés phénoliques est considérée comme étant principalement due à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs **(Orhan *et al.*, 2016)**.

L'estimation de l'activité antioxydante de l'extrait de fruits de *M. Pomifera* a été évaluée le plus souvent par deux à trois méthodes: piégeage du radical libre (DPPH$^{\bullet}$), la réduction au chlorure ferrique (FRAP) et le test d'ABTS. La majorité des travaux réalisés sur ce type d'activité visent les flavonoïdes extraits de la plante de *M. pomifera* plus de déterminer celles induites par les extraits bruts en polyphénols totaux.

L'activité antioxydante de la pomiférine et l'osajine isolés des fruits de *M. pomifera* par **Vesselá *et al.* (2004)** expriment des taux d'inhibition du radical DPPH de l'ordre de 17±2% et 3±1%, respectivement, pour la même concentration testée de 7 µM. La conclusion tirée à partir des résultats obtenus est que la pomiférine présente une activité antioxydante plus élevée par rapport à certains standards, catéchine et acide urique, habituellement utilisés comme des références durant les différents tests spécifiques à cette activité.

L'étude réalisée par **Hamed et Hussein (2005)** montre que l'extrait cétonique des fruits de *M. pomifera* est caractérisé par un pourcentage d'inhibition de ~52,86% pour une concentration de 1 mg/mL du méthanol mesuré par le test DPPH. Le fractionnement de cet extrait par chromatographie sur gel de silice conduit à la séparation de l'osajine et la pomiférine des autres constituants. Ces deux composés phénoliques exercent des taux d'inhibition de 16,38% (osajine) et 85,52% (pomiférine) testés avec la même concentration (1 mg/mL).

Les travaux de **Teixeira *et al.* (2009)** ont démontré la grande capacité de l'extrait phénolique de l'écorce des racines de *M. pomifera* à nettoyer le radical libre DPPH. Un pourcentage d'inhibition de 92,5% a été assuré par une quantité de 60 µg d'extrait sec dissout dans 20 µL d'un solvant approprié. Par contre, l'extrait obtenu à partir des feuilles de *Ficus carica* (même famille que *M. pomifera, Moraceae*) nécessite une concentration de 300 µg d'extrait sec afin d'atteindre le même pourcentage d'inhibition. L'activité antioxydante de l'extrait de *M. pomifera* a été également évaluée par le test d'ABTS, où les résultats obtenus sont très proche de ceux liés à l'inhibition du radical DPPH, avec une inhibition complète de 100% assurée par les mêmes concentrations précédemment précisées. Le macluraxanthone (13,76 mg/g d'écore de racines) participe avec seulement 20% de l'activité antioxydante de cet extrait (80% est dû aux autres xanthones présents dans l'extrait total).

Orhan *et al.* (2016) ont déterminé les activités antioxydantes de quatre extraits différents des fruits de *M. pomifera* déjà détaillés dans le **Tableau VI** et trois composés purifiés à partir de ces extraits: la pomiférine, l'osajine et le macluraxanthone. Ils ont révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle est capable d'atteindre un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de ~70% pour une concentration de 250 µg d'extrait/mL d'éthanol. Par contre, les autres extraits assurent, pour la même concentration, des taux d'inhibition inférieurs à 20%. Parmi les trois composés phénoliques purifiés, le macluraxanthone exerce le taux d'inhibition le plus élevé (~92%), suivi par la pomiférine (~80%) et en dernier l'osajine avec un taux d'inhibition inférieur à 10%. Ces taux ont été obtenus avec une concentration de 100 µg/mL.

Les résultats obtenus par l'ensemble de ces chercheurs permettent de conclure que:

- Le macluraxanthone s'est avéré le plus actif en tant qu'antioxydant que la pomiférine ;
- Certains travaux ont négligé complètement l'activité antioxydante de l'osajine ;
- La présence de ces composés au niveau de leurs extraits d'origine réduit leur activité antioxydante, ce qui indique que la purification de ces composés

phénoliques est très importante afin d'exploiter au maximum les différentes propriétés liées à leur activité antioxydante.

Les propriétés antioxydantes du macluraxanthone ont été étudiées pour la première fois par **Teixeira et ses collaborateurs (2009)**. Ils ont suggéré que ce composé a une capacité antioxydante similaire à la rutine. Cependant, la majorité des autres travaux publiés ont ciblé les deux isoflavones, la pomiférine et l'osajine, vu leur abondance à côté du scandenone et l'auriculasine dans les fruits de *M. pomifera* **(Kupeli *et al.*, 2006)** et donc probablement les responsables des différentes propriétés thérapeutiques de cette partie de la plante.

Le macluraxanthone est un xanthone catécholique, qui a deux groupes 5,6-dihydroxyle non protégés au niveau du cycle B (**Fig. 16**). Ce type de structure semble être d'une grande importance pour l'activité de piégeage des radicaux des xanthones. Dans leur processus d'oxydation, les xanthones se transforment en quinones en libérant deux électrons. Cependant, lorsque l'un des groupes hydroxyle dans le diol vicinal est protégé, la libération n'est pas possible et les activités anti-radicalaires diminuent nettement **(Teixeira *et al.*, 2009)**.

A partir de la même figure, on constate que la différence entre l'osajine et la pomiférine réside uniquement au niveau d'un seul groupement hydroxyle en position 3`. Cette modification a été très largement suffisante afin de supprimer l'activité antioxydante de l'osajine. Ceci est dû au fait que la structure de l'osajine possède moins de groupement-OH (type phénolique) pouvant agir comme donneur d'hydrogène que la pomiférine.

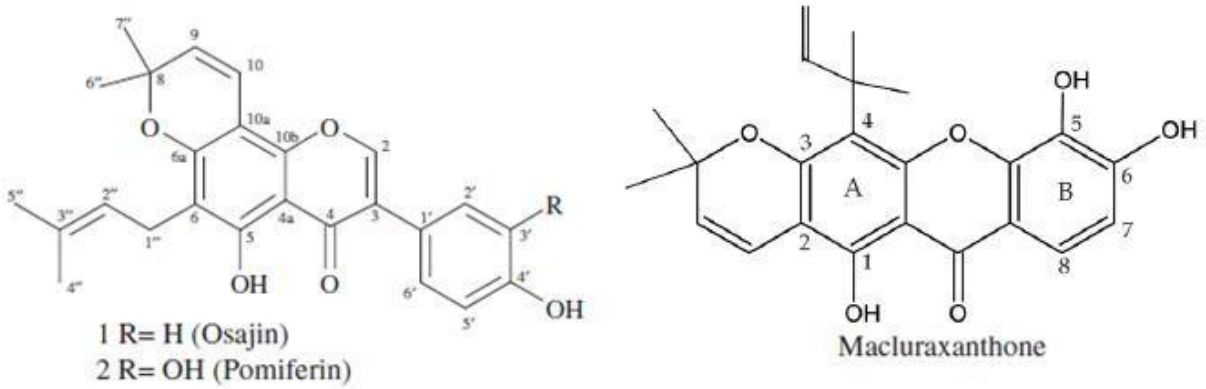

Figure 16: Structure chimique de l'osajine, la pomiférine et le macluraxanthone **(Teixeira *et al.*, 2009; Orhan *et al.*, 2016)**.

D'autre part, l'activité antioxydante de l'huile des graines de *M. pomifera*, indique un pourcentage d'inhibition de 50% pour un extrait de 5,2 g d'huile contenant 1,30 mg de polyphénols. La **figure 17** montre la courbe de réduction en % de DPPH restant en fonction de la quantité de polyphénols (mg) **(Fatnassi *et al.*, 2010)**.

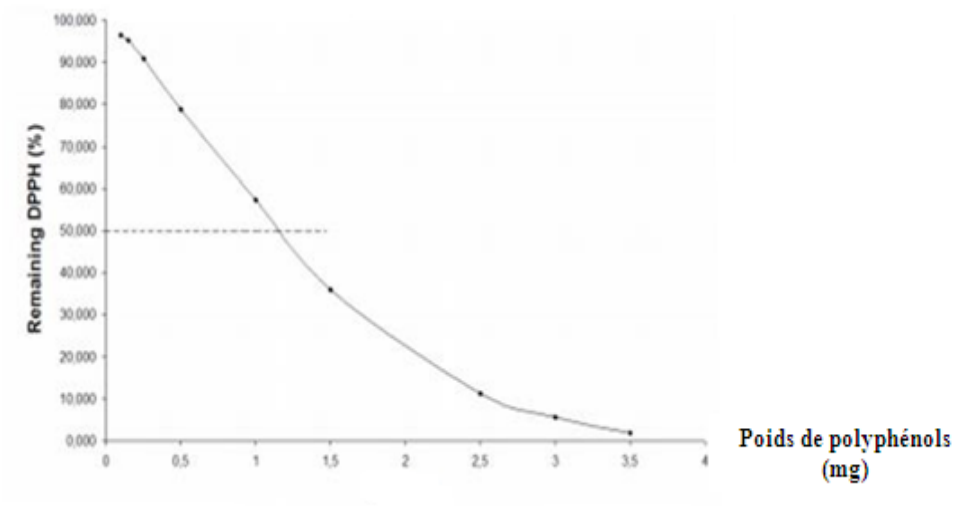

Figure 17: Pourcentage du DPPH restant en fonction de la concentration en polyphénols dans l'huile des graines de fruits de *M. pomifera* **(Fatnassi *et al.*, 2010)**.

La détermination de l'activité antioxydante *via* le test FRAP réalisé par **Tsao *et al.* (2003)**, a prouvé que la pomiférine est plus active que le BHT, le $FeSO_4$ et le α-tocophérol. Par contre, elle est plus faible par comparaison à la vitamine C (acide ascorbique) et le Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E. Les résultats de ce test confirment que l'osajine n'avait aucune activité antioxydante.

Le pouvoir réducteur de chaque extraits de fruits de *M. pomifera* mesuré par le même test sont résumé dans le **Tableau VII**. Les résultats sont donnés en valeurs d'absorbance mesurées à 700 nm, où plus l'absorbance est élevée plus l'activité antioxydante est grande. La même concentration de 125 µg/mL à été utilisée pour mesurer le pouvoir réducteur des extraits et des composés flavonoïdes purifiés. Les résultats illustrés dans ce tableau sont en concordance avec ceux spécifiques du test DPPH précédemment détaillés. Une autre fois, cette étude prouve à travers le dosage du pouvoir réducteur que le macluraxanthone est l'antioxydant le plus actif par comparaison à la pomiférine et l'osajine **(Orhan *et al.*, 2016)**.

Tableau VII: Résultats du test FRAP des différents extraits et flavonoïdes de *M. pomifera* **(Orhan *et al.,* 2016)**.

Type d'extrait/composé	Pouvoir réducteur FRAP (Absorbance à 700 nm)
Acétate d'éthyle	1,237±0,048
Ethanol	0,401±0,011
Eau distillée	0,484±0,009
n-butanol	0,580±0,008
Osajine	0,354±0,007
Pomiférine	0,926±0,018
Macluraxanthone	0,942±0,038
Standard (quercétine)	2,027±0,018

IV. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le traitement des infections bactériennes repose principalement sur l'utilisation des antibiotiques. Pour cela la recherche s'oriente vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes comme agents antimicrobiens dans le but de résoudre les problèmes associés aux développement des résistances bactériennes contre les antibiotiques synthétiques.

IV.1. Activité antibactérienne des polyphénols

L'activité antibactérienne de l'extrait de fruits de *M. pomifera* cultivée dans la région d'İzmir (Türkiye) a été testé contre 20 souches bactériennes afin d'évaluer son activité contre les différents germes à Gram$^+$ et à Gram$^-$ **(Canli *et al.,* 2017)**. L'extrait a été préparé par macération dans l'éthanol pendant 48 h à température ambiante. Par la suite, l'activité antibactérienne a été essayée avec trois concentrations différentes d'extrait correspondant à 4 mg, 8 mg et 12 mg dilué dans 30, 100 et 150 µL d'éthanol/disque. Toutes les souches bactériennes sont incubées à 37°C pendant 24h en contact de l'extrait éthanoïque.

Les résultats obtenus (**Tableau VIII**) montrent que l'extrait phénolique de *M. pomifera* présente une activité contre 11 souches bactériennes (*E. durans, K. pneumoniae, P. fluorescens* P1, *S. typhimurium* SL 1344, *S. epidermidis* DSMZ 20044, *P. vulgaris* (CI), *L. innocula, E. faecium*) avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 13 mm. Pour la majorité de ces souches, nous constatons une sensibilité un peu stable à l'effet de l'extrait phénolique malgré l'augmentation du volume de l'extrait utilisé et qui est traduite par des zones d'inhibition assez proches et parfois même stables (le cas de *S. aureus* ATCC 25923).

Une seule souche celle d'*E. faecalis* ATCC 29212 a été sensible à partir de la concentration la plus élevée contrairement aux autres souches sensibles. Les autres souches ont été totalement résistantes malgré l'augmentation de la concentration de l'extrait jusqu'à 5 fois. D'après ces résultats on peut conclure que les bactéries Gram$^-$ sont plus résistantes par rapport aux bactéries Gram$^+$ contre les composants bioactifs de *M. pomifera*.

L'extrait a été également testé contre une seule souche de levure *Candida albicans*, mais elle était insensible à l'effet des trois concentrations choisies suite à une incubation durant 48 h à 27°C.

Tableau VIII: Résultats des tests de diffusion sur disque pour l'extrait éthanoïque de *M. pomifera* (zones d'inhibition en mm) **(Canli *et al.*, 2017)**.

Bactérie/levure	**Concentration en extrait déposée (mg)/disque**		
	4	**8**	**12**
Bacillus subtilis DSMZ 1971	-	-	-
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	-	-	-
Enterococcus durans	7	8	9
Enterecoccus faecalis ATCC 29212	-	-	7
Enterecoccus faecium	9	10	11
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	-
Escherichia coli (CI)	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	7	8	9
Listeria innocua	8	9	9
Listeria monocytogenes ATCC 7644	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa DSMZ 50071	-	-	-
Pseudomonas fluorescens P1	7	9	9
Proteus vulgaris (CI)	9	11	13
Salmonella enteritidis ATCC 13075	-	-	-
Salmonella infantis	-	-	-
Salmonella kentucky	-	-	-
Salmonella typhimurium SL 1344	7	8	9
Staphylococcus aureus ATCC 25923	8	8	8
Staphylococcus aureus (CI)	10	11	13
Staphylococcus epidermidis DSMZ 20044	8	9	10
Candida albicans DSMZ 1386	-	-	-

(-) : Absence d'inhibition

IV.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes

L'activité antimicrobienne de deux composants isoflavones, la pomiférine et l'osajine isolés à partir des fruits de *M. pomifera*, a été évaluée par **Mahmoud, (1981)**. Les deux composés ont été purifiés à partir de l'extrait brut par fractionnement sur gel de silice. L'activité antibactérienne a été testée contre cinq souches (*Staphylococcus aureus* 13709, *Escherichia coli* 9637, *Salmonella gallinarum* 9184, *Klebseilla pneumoniae* 10031, *Mycobacterium smegmatis*) selon la méthode de dilution sur gélose par comparaison à l'antibiotique, le sulfate de streptomycine.

Les résultats trouvés (**Tableau IX**) montrent que la pomiférine et l'osajine présentent une activité intéressante contre toutes les souches testées, surtout dans le cas de *M. smegmatis* où une concentration de 6,25 µg/mL, pour les deux composés, a été largement suffisante pour inhiber la croissance.

La même efficacité d'inhibition que l'antibiotique de référence, le sulfate de streptomycine, a été observée dans le cas de pomiférine pour *E. coli* 9637 et *S. gallinarum* 9184. Par contre, l'osajine, a été plus active que l'antibiotique contre *S. gallinarum* 9184.

Tableau IX: Concentration minimale inhibitrice (µg/mL) de la pomiférine et l'osajine **(Mahmoud, 1981)**.

	Composé		
	Sulphate de Streptomycine	**Pomiférine**	**Osajine**
Staphylococcus aureus ATCC 13709	3,1	25	25
Escherichia coli ATCC 9637	12,5	12,5	25
Salmonella gallinarum ATCC 9184	25	25	12,5
Klebseilla pneumoniae ATCC 10031	1,56	25	25
Mycobacterium smegmatis	0,78	6,25	6,25

Les polyphénols notamment surtout les tannins et les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être dù à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et les glucosidases) ou d'autres interactions pour inactiver les protéines de transport et de l'enveloppe cellulaire et les adhésines microbiennes (**Cowan, 1999**). Le mécanisme d'action des effets antimicrobiens des flavonoïdes est très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on suggère :

- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Hilliard, 1995**).
- blocage des fonctions de la membrane cytoplasmique (**Tsuchiya *et al.*, 2000**).

- privation de substrat nécessaire à la croissance microbienne.
- Inhibition du métabolisme énergétique de la cellule microbienne (**Haraguchi *et al.*, 1998**).

V. Evaluation de l'activité antifongique

Selon notre recherche, aucun travail n'a été publié sur l'activité antifongique des extraits obtenus à partir des fruits de *M. pomifera*. Par contre, une étude réalisée par **Barnes et Gerber (1955)**, indique que les stilbènes extraits à partir du bois de l'oranger des Osages présentent un effet toxique sur les champignons.

L'effet toxique de la substance isolée, 2,3`,4,5`-tétrahydroxystilbène, a été testé contre 13 souches fongiques, comprenant des moisissures et des levures: *Myrothecium verrucnrin, Pullularia pullulans, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Candida albicans, Microsporum azrdouini, Penicillium notitum, Rhodotorula glutinis, Saccharomyces cerevisiae, Ceratostomella ulmi, Fusarium bulbigenum, Microsporum canis* et *Trichophyton mentagrophytes.*

La substance d'intérêt a été extraite à l'eau bouillante pendant 1 h. Par la suite et afin d'obtenir cette substance sous forme purifiée, l'extrait obtenu a subi différents traitements à l'éther et l'acétone puis passé à travers une colonne contenant le gel de silice. La procédure adoptée assure un rendement qui varie entre 0,5 et 1% en 2,3`,4,5`-tétrahydroxystilbène. L'activité antifongique a été évaluée par l'inoculation du milieu de culture liquide (bouillon à l'extrait de malt) ensemencé auparavant par les spores de chaque moisissure. L'effet antifongique a été évalué visuellement ou après la détermination du poids sec des cultures fongiques obtenus après 2-4 jours d'incubation à 22-32°C.

Les résultats obtenus (**Tableau X**) indiquent que le bois de *M. pomifera* a une activité inhibitrice très efficace contre quatre champignons: *Myrothecium verrucnrin, Pullularia pullulans, Microsporum canis* et *Trichophyton mentagrophytes* avec une faible activité contre *Fusarium bulbigenum*. La concentration assurant ces résultats est de 0,2 mg/mL d'eau distillée stérile. Les autres souches ont été résistances à l'action du 2,3`,4,5`-tétrahydroxystilbène. Les chercheurs ont conclu que le bois de *M. pomifera* résiste à la pourriture grâce a sa richesse en 2,3`,4,5`-tétrahydroxystilbène à une teneur de 1%.

Tableau X: Effet antifongique du 2,3`,4,5`-tétrahydroxystilbène extrait du bois de *M. pomifera* **(Barnes et Gerber, 1955)**.

Microorganismes	**Inhibition de la croissance**
Myrothecium verrucaria	Complète
Pullularia pullulans	Complète
Aspergillus fumigatus	/
Aspergillus niger	/
Candida albicans	/
Microsporum audouini	/
Penicillium notatum	/
Rhodotorula glutinis	/
Saccharomyces cerevisiae	/
Ceratostomella ulmi	/
Fusarium bulbigenum	Partielle
Microsporum canis	Complète
Trichophyton mentagrophytes	Complète

/ : Aucune inhibition.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le but de notre travail est d'étudier l'influence de la méthode d'extraction et du type de solvant sur le rendement en polyphénols des fruits de l'oranger des Osages, *Maclura pomifera* appartenant à la famille des *Moraceae*, et d'évaluer quelques activités biologiques.

La modification de la nature de notre travail d'une étude pratique à celle théorique a permis de consulter la majorité des articles publiés sur *M. pomifera* en relation étroite avec les objectifs de cette étude.

Selon les résultats des différents travaux, nous avons constaté que la meilleure méthode d'extraction qui offre le rendement en polyphénols le plus élevé est l'extraction par haute pression hydrostatique couplée à un système de solvant composé de l'acétone, éthanol, méthanol et l'eau, probablement grâce à sa polarité plus élevée.

Les dosages réalisés afin d'estimer la concentration en polyphénols et en flavonoïdes des extraits obtenus ont montré la richesse des fruits de *M. pomifera* en ces composés et qui sont représentés principalement par trois composés: l'osajine, la pomiférine et le macluraxanthone.

L'évaluation de l'activité antioxydante par les méthodes courantes de dosage prouve la grande capacité des extraits de *M. pomifera* à purifier les différents radicaux libres du DPPH, ABTS,… etc. où la pomiférine et le macluraxanthone présentent des activités antioxydantes très similaires à celles de certains standards largement utilisés au cours de ces dosages. Par contre, les résultats aboutis par certains chercheurs ont révélé que l'osajine présente une très faible activité antioxydante qui peut être totalement négligée.

Un nombre limité des travaux ont démontré la capacité des extraits phénoliques issus de différents compartiments de la plante *M. pomifera* a inhibé la croissance de différents germes pathogènes. L'extrait des fruits est s'avéré plus efficace contre les bactéries à Gram$^+$, par contre celui provenant du bois de la plante présente un effet très actif contre le développement de quatre champignons filamenteux. Il est à noter qu'aucun travail, selon notre recherche dans la littérature, n'a été publié sur l'activité antifongique des extraits phénoliques des fruits de *M. pomifera*.

En perspectives, on peut compléter ces résultats par l'étude de plusieurs aspects complémentaires, en plus des objectifs de notre étude, tels que :

- Développement des méthodes d'extraction modernes pour l'extraction spécifique des polyphénols afin d'obtenir des rendements plus élevés et de les comparer à ceux assurés par les méthodes conventionnelles.
- Optimisation des différents paramètres influençant l'extraction des polyphénols (temps, type du solvant, la température).
- Dosage de l'activité antioxydante des extraits par d'autres méthodes telles que TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter) et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).
- Evaluation des autres utilisations possibles des extraits de fruits de *M. pomifera* en tant que des insecticides, agents antiparasitaires, antidépresseurs, anti-inflammatoire et dans le traitement du cancer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Afanas' ev, I. B., Dcrozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology, 38*(11), 1763-1769. https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3.

- Afanas'eva, I. B., Ostrakhovitch, E. A., Mikhal'chik, E. V., Ibragimova, G. A., Korkina, L. G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical pharmacology, 61*(6), 677-684. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00526-3.

- Altuner, E. M., Işlek, C., Çeter, T., Alpas, H. (2012). High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits. *African Journal of Biotechnology, 11*(4), 930-937.https://doi.org/10.5897/AJB11.2506.

- Arab, R., Majd, A., Tajadod, G., Rezanejad, F., Mirzaei, M. (2019). The morphological and anatomical studies of inflorescence, flower, embryo and fruit development in *Maclura pomifera* (*Moraceae*). *Cogent Biology*, *5*(1), 1663698. https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1663698.

- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, *4*(196), 2167-0412. http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196.

B

- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J. C., Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, *46*(11), 1086-1089.

- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *49*, 96-109. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006.

- Barnes, R. A., Gerber, N. N. (1955). The antifungal agent from Osage orange wood.*Journal of the American Chemical Society*, *77*(12),3259-3262.https://doi.org/10.1021/ja01617a032.

- Barnett, J. P., Burton, J. D. (1997). Osage orange: a pioneering stewardship species. *Tree Planters' Notes 48* (3/4): 81-86.

- Bausch, J. N., Poretz, R. (1977). Purification and properties of the hemagglutinin from *Maclura pomifera* seeds. *Biochemistry*, *16*(26), 5790-5794. https://doi.org/10.1021/bi00645a023.

- Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Baltas, M. (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European journal of medicinal chemistry, 45*(7), 3019-3026. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.031.

- Bertucci, J. I., Liggieri, C. S., Colombo, M. L., Cavalli, S. E. V., Bruno, M. A. (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT-Food Science and Technology, 64*(1), 157-163. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.041.

- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift fur Ernahrungswissenschaft, 37*(2), 147-163. https://doi.org/10.1007/pl00007376.

- Boizot, N., Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*, 79-82.

- Bolou, G. E. K., Attioua, B., N'guessan, A. C., Coulibaly, A., N'guessan, J. D., Djaman, A. J. (2011). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège.* 80. p. 772 – 790.

- Bourdy, G., de Michel, L. C., Roca-Coulthard, A. (2004). Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno-Guaranı (Bolivian Chaco). *Journal of Ethnopharmacology, 91*(2-3), 189-208. https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.013.

- Bozkurt, İ., Dilek, E., Erol, H. S., Çakir, A., Hamzaoğlu, E., Koç, M., ... & Halici, M. B. (2017). Investigation on the effects of pomiferin from *Maclura pomifera* on indomethacin-induced gastric ulcer: An experimental study in rats. *Medicinal Chemistry Research, 26*(9), 2048-2056. https://doi.org/10.1007/s00044-017-1913-y.

- Botta B., Monache G.D. (1995). *Maclura pomifera* (Osage orange): In vitro culture and the formation of flavonoids and other secondary metabolites. In: Bajaj Y.P.S. *(eds) Medicinal and Aromatic Plants VIII. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 33*. ISBN: 978-3-662-08612-4, https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4_15.

- Brown, E. J., Khodr, H., Hider, C. R., Rice-evans, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal, 330*(3), 1173-1178. https://doi.org/10.1042/bj3301173.

- Burns, R. M., Honkala, B. H. tech. coords. (1990). Silvics of North America: 2. Hardwoods. *Agriculture Handbook, 654*, 158-168.

C

- Canli, K., Bozyel, M. E., Altuner, E. M. (2017). In vitro antimicrobial activity screening of *Maclura pomifera* fruits against wide range of microorganisms. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 6*(8), 19-22.

- Chanforan, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate.

- Cherif H.S., Chaouia C., Hamaidi M.S., Rouibi A., Boukhatem M.N., Benouaklil F., Chabane D., Feknous S., Boulaghmen F., Miliani A., Saidi F. (2015). Les sites secreteurs de quelques plantes aromatiques et medicinales d'Algérie, *revue agrobiologia, 7,* 38-42.

- Chir, K., Suh, J.-H., Saucier, C., Teissèdre a, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie, 6*(2), 75-82. https://doi.org/10.1007/s10298-008-0293-3.

- Coder, Kim D. (2016). Osage orange (*Maclura pomifera*): A traveling tree. Warnell School of Forestry & Natural Resources, University of Georgia, Pp.14.

- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews, 12*(4), 564-582.https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564.

- Clopton, J. R. (1953). Antioxidant material from the Osage orange (Bois d'Arc) fruit. *Journal of the American Oil Chemists Society, 30*(4), 156-159. https://doi.org/10.1007/BF02640990.

- Colvin, D.M., (2018). A review on comparison of the extraction methods used in licorice root: their principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* (Los Angeles). https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000323.

- Crozier, A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. *Plants: Diet and Health: The Report of a British Nutrition Foundation Task Force,* 27-48.

D

- Da Costa, C. T., Margolis, S. A., Benner Jr, B. A., Horton, D. (1999). Comparison of methods for extraction of flavanones and xanthones from the root bark of the Osage orange tree using liquid chromatography. *Journal of chromatography A, 831*(2), 167-178. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00937-6.

- Dangles, O., Dufour, C. (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. *Recent advances in polyphenol research, 1,* 67-87.

- De Silva, G. O., Abeysundara, A. T., Aponso, M. M. W. (2017). Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Products, 5*(2), 29-32.

- Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A. (2015). Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products, 74,* 440-449. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.049.

- Dobignard, A., Chatelain, C., Fischer, M., Orso, J., Jeanmonod, D. (2010). *Index synonymique de la flore d'afrique du nord*. conservation et jardin botaniques.

- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 100547. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547.

E

- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. Phytothérapie, 5(5), 264-270.

- Elliot, M., Evelyn, W., Nyree, J. C. (2017). Phylogeny and biogeography of *Maclura* (*Moraceae*) and the origin of an anachronistic fruit. *Molecular phylogenetics and evolution*. *, 117, 49–59.* https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.06.021.

- Eskilsson, C. S., Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography A*, *902*(1), 227-250. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3.

F

- Fatnassi, S., Chatti, S., Nehdi, I. E., Zarrouk, H. (2009). Chemical composition, phenolic profile and antioxidant activity of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seeds oil. *In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM*2009 853 , 383-390. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.853.47.

- Ferro, M. L. (2014). A cultural and entomological review of the Osage orange (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.) (*Moraceae*) and the origin and early spread of “Hedge Apple” folklore. *Southeastern Naturalist, 13*(7), 1-34.

- Fratzl-Zelman, N., Barnes, A. M., Weis, M., Carter, E., Hefferan, T. E., Perino, G., Klaushofer, K. (2016). Non-lethal type VIII osteogenesis imperfecta has elevated bone matrix mineralization. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, 101*(9), 3516-3525. https://doi.org/10.1210/jc.2016-1334.

G

- Garabeth, F., Bouaoun, D., Elyafi-Elzahri, G. (2007). Étude quantitative des coumarines d’une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie, 5*(5), 259-263. https://doi.org/10.1007/s10298-007-0267-x.

- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research, 58*(9), 537-552. https://doi.org/10.1007/s00011-009-0037-3.

- Gardner, E. M., Sarraf, P., Williams, E. W., Zerega, N. J. (2017). Phylogeny and biogeography of *Maclura* (*Moraceae*) and the origin of an anachronistic fruit. *Molecular phylogenetics and evolution, 117*, 49-59. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.06.02

- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie, 3*(4), 162-169. https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8.

- Grover, R. K., Moore, J. D. (1962). Toximetric studies of fungicides against brown rot organisms, sclerotinia-fructicola and s-laxa. *Phytopathology, 52*(9), 876.

- Guignard, J.-L. (2000). Biochimie végétale.

- Guntero, V. A., Mancini, P. M. E., Kneeteman, M. N. (2017). Introducing organic chemistry students to the extraction of natural products found in vegetal species. *World Journal of Chemical Education*. 5(4), 142-147. http://dx.doi.org/10.12691/wjce-5-4-5.

H

- Hamed, S. F., Hussein, A. A. (2005). Effect of *Maclura pomifera* total acetonic extract, pomiferin and osajin on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Grasas y Aceites, 56*(1), 21-24. https://doi.org/10.3989/gya.2005.v56.i1.130.

- Hamel T., Sadou S., Seridi R., Boukhdir S., Boulemtafes A. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (Nord-Est Algérien) *Ethnopharmacologia, 59,* 75-81.

- Handa, S. S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, 1*.

- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine, 16*(6), 845-850. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90202-X.

- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry, 48*(1), 125-129.https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01105-9.

- Harry-O'kuru, R. E., Tisserat, B., Gordon, S. H., Gravett, A. (2015). Osage orange (*Maclura pomifera* L.) seed oil poly (α-hydroxydibutylamine) triglycerides: synthesis and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry, 63*(29), 6588-6595. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01625.

- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products, 59*(2), 205-215. https://doi.org/10.1021/np960040+.

- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology therapeutics, 96*(2-3), 67-202. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X.

- Hemingway, R. W. (1989). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives *Chemistry and significance of condensed tannins* (pp. 83-107): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7511-1_5.

- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie, 2*(1), 3-6. https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8.

- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of internal medicine, 155*(4), 381-386. https://doi.org/10.1001/archinte.1995.00430040053006.

- Hider, R. C., Liu, Z. D.,Khodr, H. H. (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in enzymology*,335, 190-203 : Elsevier.

- Hilliard, J. J., Krause, H. M., Bernstein, J. I., Fernandez, J. A., Nguyen, V., Ohemeng, K. A., Barrett, J. F. (1995). A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *In Antimicrobial resistance,* 59-69. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9203-4_5.

- Hoffmann, D. (2003). *Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine*: Simon and Schuster.

- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*: De Boeck Supérieur.

J

- Jacob, F., Pignal, M. (1972). Interactions levures-tanins. I-croissance et survie de diverses levures dans des solutions tannantes. *Mycopathologia et mycologia applicata, 48*(2-3), 121-142.

- Jauron, R. "Osage orange." *Flickr*. (27 Sep 2010). In Osage orange. Disponible sur : URL://www.flickr.com/photos/buckh/750468556 /sizes/l/in/set-72157600707223468

- Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*: Lavoisier.

- Jiménez-Moreno, N., Volpe, F., Moler, J. A., Esparza, I., Ancín-Azpilicueta, C. (2019). Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants, 8*(12), 597. https://doi.org/10.3390/antiox8120597.

- Jerkovic, I., Mastelic, J., Marijanovic, Z. (2007). Bound volatile compounds and essential oil from the fruit of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Osage orange). *Flavour and fragrance journal, 22*(1), 84-88. https://doi.org/10.1002/ffj.1763.

- Jones, W. P., Kinghorn, A. D. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Natural Products Isolation*, 323–351. https://doi.org/10.1385/1-59259-955-9:323.

- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society, 116*(11), 4846-4851. https://doi.org/10.1021/ja00090a032.

K

- Kansole, M. M. R. (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicansis* (Jacquin) R. *Brown, Hoslundiaopposstavahlet Orthosiphonpallidusroyle ex benth*.

- Kaufmann, B., Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 13*(2), 105-113. https://doi.org/10.1002/pca.631.

- Konya, M. N., Konya, P., Demirtürk N., Kenar, B. (2017). A Comparison of Biomechanical Properties and Antimicrobial Activities of Commonly Used Antibiotics with *Maclura pomifera* Extract Impregnated Bone Cements, An Experimental Study. *EC Orthopaedics, 6,* 63-73.

- Kopjar, M., Piližota, V., Šubarić, D., Babić, J. (2009). Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croatian Journal of Food Science and Technology, 1*(1), 24-30.

- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritima. *Plant Physiology and Biochemistry, 45*(3-4), 244-249. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.02.001.

- Kupeli, E., Orhan, I., Toker, G.,Yesilada, E. (2006). Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin. *Journal of ethnopharmacology, 107*(2), 169-174. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.021.

- Kuti, J. O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia cactus* pear fruit varieties. *Food chemistry, 85*(4), 527-533. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00184-5.

L

- Laouini, S. E. (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de Phoenix dactylifera L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).

- Laura, A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009). *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*: John Wiley Sons.

- Legrand,G. (2015).Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chlcorée:approches biochimique et moléculaire(doctral dissertation ,Lille 1).

- Leong, L., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry, 76*(1), 69-75. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00251-5.

- Liu, Y.-H., You, Y., Song, T., Wu, S.-J., Liu, L.-Y. (2007). Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril. *Journal of cardiovascular pharmacology, 50*(2), 155-161. https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31805c9410.

M

- Maaoui, M., Eloutaya, S. d. B. R. (2014). ATLAS, plantes ornementales des Ziban. *Station de Bio Ressources El Otaya. Edition CRSTRA*.

- Mahmoud, Z. F. (1981). Antimicrobial components from *Maclura pomifera* fruit. *Planta medica, 42*(7), 299-301. http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-971646.

- Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Nature Technology, (9), 35.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition, 79*(5), 727-747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727.

- Mandal, S. C., Mandal, V., Das, A. K. (2015). Classification of extraction methods. *Essentials of Botanical Extraction, 83–136*. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00006-9.

- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews, 52*(4), 673-751.

- Monien, B. H., Apostolova, L. G., Bitan, G. (2006). Early diagnostics and therapeutics for Alzheimer's disease–how early can we get there? *Expert review of Neurotherapeutics, 6*(9), 1293-1306. https://doi.org/10.1586/14737175.6.9.1293.

- Morris, C. J., Earl, J. R., Trenam, C. W., Blake, D. R. (1995). Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology, 27*(2), 109-122. https://doi.org/10.1016/1357-2725(94)00084-O.

- Moser, B. R., Eller, F. J., Tisserat, B. H., Gravett, A. (2011). Preparation of fatty acid methyl esters from Osage orange (*Maclura pomifera*) oil and evaluation as biodiesel. *Energy & fuels, 25*(4), 1869-1877. https://doi.org/10.1021/ef200195v.

- Mukhtar, H., Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American journal of clinical nutrition, 71*(6), 1698S-1702S. https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1698S.

- Murota, K., Mitsukuni, Y., Ichikawa, M., Tsushida, T., Miyamoto, S., Terao, J. (2004). Quercetin-4‘-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *Journal of agricultural and food chemistry, 52*(7), 1907-1912. https://doi.org/10.1021/jf035151a.

- Mwangi, S. W. (2018). Development, validation and application of high performance liquid chromatography method for the determination of artemisinin content in *Artemisia annua* l. extracts.

N

- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition, 74*(4), 418-425. https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418.

O

- Orazbekov, Y., Ibrahim, M. A., Mombekov, S., Srivedavyasasri, R., Datkhayev, U., Makhatov, B. Ross, S. A. (2018). Isolation and biological evaluation of prenylated flavonoids from *Maclura pomifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. https://doi.org/10.1155/2018/1370368.

- Oren-Shamir, M. (2009). Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science, 177*(4), 310-316. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.015.

- OMS-organisation mondiale de la santé, 2003.

- Orhan, I. E., Senol, F. S., Demirci, B., Dvorska, M., Smejkal, K., & Zemlicka, M. (2016). Antioxidant potential of some natural and semi-synthetic flavonoid derivatives and the extracts from *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider (Osage orange) and its essential oil composition. *Turkish Journal of Biochemistry, 41*(6), 403-411.https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0125.

P

- Parage, C. (2013). Génomique fonctionnelle de la biosynthèse des stilbènes chez la vigne (Vitis vinifera). Strasbourg.

- Peattie, D. C. (1953). A Natural History of Western. *Trees. Houghton Mifflin Company. Boston*.

- Peterson, C., Fristad, A., Tsao, R., & Coats, J. R. (2000). Osajin and pomiferin, two isoflavones purified from Osage orange fruits, tested for repellency to the maize weevil (*Coleoptera*: *Curculionidae*). *Environmental entomology, 29*(6), 1133-1137.https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.6.1133.

- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition reviews, 68*(10), 571-603. https://doi.org/10.1111/j.1753-

4887.2010.00319.x.

- Pincemail, J., Degrune, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J.-O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme, 21*(2), 66-75. https://doi.org/10.1016/j.nupar.2007.04.005.

- Pleše, N., Miličić, D. (1973). Two viruses isolated from *Maclura pomifera*. *Journal of Phytopathology, 77*(2), 178-183. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1973.tb04123.x.

- Pool, R. J. (1919). Handbook of Nebraska trees.

R

- Raffeneau-Delile, A. (2008). Le voyage des plantes : Les jardins acteurs culturels de la biodiversité.

- Ribaudo, G., Pagano, M. A., Pavan, V., Redaelli, M., Zorzan, M., Pezzani, R., Zagotto, G. (2015). Semi-synthetic derivatives of natural isoflavones from *Maclura pomifera* as a novel class of PDE-5A inhibitors. *Fitoterapia, 105,* 132-138. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.020.

- Rocchetti, G., Blasi, F., Montesano, D., Ghisoni, S., Marcotullio, M. C., Sabatini, S. Lucini, L. (2019). Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food research international, 115,* 319-327. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.046

S

- Salem, M. Z., Mohamed, N. H. (2013). Physico-chemical characterization of wood from *Maclura pomifera* (Raf.) CK Schneid. adapted to the Egyptian environmental conditions. *J. For. Prod. Ind, 2*(2), 53-57.

- Saloua, F., Eddine, N. I., Hedi, Z. (2009). Chemical composition and profile characteristics of Osage orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Industrial crops and products, 29*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.013.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition, 45*(4), 287-306. https://doi.org/10.1080/1040869059096.

- Schall, E. D., Quackenbush, F. W. (1956). The antioxidants of the Osage orange fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 33*(2), 80-82. https://doi.org/10.1007/BF02612556.

- Sdasivam, S., Thayumanayan, B. (2003). *Molecular host plant resistance to pests,* 96: CRC Press.

- Sfahlan, A. J., Mahmoodzadeh, A., Hasanzadeh, A., Heidari, R., Jamei, R. (2009). Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis* L.) as a function of genotype. *Food Chemistry, 115*(2), 529-533.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.049.

- Silanikove, N., Perevolotsky, A., Provenza, F. D. (2001). Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology, 91*(1-2), 69-81.

- Small, E., Catling, P. M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. NRC Research Press.

- Smith, J. L.,Perino, J. V. (1981). Osage orange (*Maclura pomifera*): history and economic uses. *Economic Botany, 35*(1), 24-41.

- Sofowora, A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. KARTHALA Editions.

- Spencer, J. P., Schroeter, H., Rechner, A. R., Rice-Evans, C. (2001). Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidants and redox signaling, 3*(6), 1023-1039. https://doi.org /10.1089/152308601317203558.

- Starr, F., Starr, K., Loope, L. (2003). *Maclura pomifera. Osage orange, Moraceae. http://www. hear. org/starr/hiplants/reports/pdf/maclura_pomifera. pdf, accessed, 4,* 2011.

- Stephens, H. (1969). Trees, shrubs and woody vines of Kansas, The University Press of Kansas, Lawrence, Kan-sas, USA. StephensTrees ….

- Stojiljković, M. S., Petrović, S. M., Stojilković, S. T., Savić, S. R., & Todorović, B. Ž. (2018). Macro and micro element composition of Osage orange *Maclura pomifera* L. (Moraceae). *Journal of Elementology, 23*(4), 1399-1411. https://doi.org/10.5601/jelem.2018.23.1.1484.

- Su, Z., Wang, P., Yuan, W., Grant, G., Li, S. (2017). Phenolics from the fruits of *Maclura pomifera. Natural Product Communications, 12*(11), 1743-1745. https://doi.org/10.1177/1934578x1701201122.

- Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P., Spranger, M. I. (2006). Stilbenes: quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica chimica acta, 563*(1-2), 382-390. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.002.

T

- Tabart, J., Kevers, C., Evers, D., Dommes, J. (2011). Ascorbic acid, phenolic acid, flavonoid, and carotenoid profiles of selected extracts from *Ribes nigrum. Journal of agricultural and food chemistry, 59*(9), 4763-4770. https://doi.org/10.1021/jf104445c.

- Tapas, A. R., Sakarkar, D., Kakde, R. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research, 7*(3), 1089-1099. https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693.

- Teixeira, D. M., Canelas, V. C., do Canto, A. M., Teixeira, J. M. G., Dias, C. B. (2009). HPLC-DAD quantification of phenolic compounds contributing to the antioxidant activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* extracts. *Analytical letters, 42*(18), 2986-3003.https://doi.org/10.1080/00032710903276646.

- Thompsen, J. C., Mottola, H. A. (1984). Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical chemistry, 56*(4), 755-757. https://doi.org/10.1021/ac00268a037.

- Tisserat, B.,Harry-O'kuru, R. (2019). Osage orange, honey locust and black locust seed meal adhesives employed to fabricate composite wood panels. *Fibers, 7*(10), 91. https://doi.org/10.3390/fib7100091.

- Tsao, R., Yang, R.,Young, J. C. (2003). Antioxidant isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Journal of agricultural and food chemistry, 51*(22), 6445-6451. https://doi.org/10.1021/jf0342369.

- Tsuchiya, H.,Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine, 7*(2), 161-165.https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80089-6.

V

- Van, C. N. (2010). Maîtrise de l'aptitude technologique des oléagineux par modification structurelle: applications aux opérations d'extraction et de transestérification in-situ (Doctoral dissertation).

- Veselá, D., Kubínová, R., Muselík, J., Žemlička, M., Suchý, V. (2004). Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin. *Fitoterapia, 75*(2), 209-211.https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.12.005.

- Vines, R. A. (1960). *Trees, shrubs and woody vines of the southwest*: University of Texas at Austin.

- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of herbal medicine, 3*(3), 104-111. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.004.

- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(22), 8492-8497.https://doi.org/10.1021/jf050995a.

W

- Wagner, J. G., Harris, L. E. (1952). A phytochemical investigation of the fruit of *Maclura pomifera* (Rafinesque) schneider. *Journal of the American Pharmaceutical Association, 41*(9), 497-499. https://doi.org/10.1002/jps.3030410912.

- Watson, E. F. G. a. D. G. (1993). *Maclura pomifera*: Osage orange. *UF/IFAS Extension*.

- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops–A review. *Ultrasonics sonochemistry*, *48*, 538-549. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018.

- Weniger, d. (1996). *Catalpa* ("*Catalpa bignonioides*," *bignoniaceae*) and bois d'arc ("*Maclura pomifera," Moraceae*) in early texas records. *SIDA, Contributions to Botany*, 231-242.

Z

- Zhang, L.-L., Lin, Y.-M., Zhou, H.-C., Wei, S.-D., Chen, J.-H. (2010). Condensed tannins from mangrove species *Kandelia* candel and *Rhizophora* mangle and their antioxidant activity. *Molecules*, *15*(1), 420-431. https://doi.org/10.3390/molecules15010420.

Résumé

Cette étude a pour but de déterminer l'influence des techniques d'extraction et du solvant utilisé sur le rendement en polyphénols des fruits de *M. Pomifera*, plante médicinale de la famille des *Moraceae* caractérisée par plusieurs composants bioactifs aux propriétés thérapeutiques. La meilleure méthode d'extraction assurant des rendements importants en polyphénols est la haute pression hydrostatique combinée à un cocktail de solvants polaires. Le dosage des extraits par les méthodes de Folin-Ciocalteu et le chlorure d'aluminium ont démontré la richesse de l'écorce et des fruits de *M. pomifera* en polyphénols et flavonoïdes. L'activité antioxydante évaluée par les différents tests de DPPH, ABTS, FRAP…, prouve que les composés actifs de *M. Pomifera* sont dotés d'une grande capacité à inhiber les radicaux libres. L'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé que l'extrait du fruit du *M. Pomifera* est actif contre plusieurs souches bactériennes Gram^{+}, par contre l'extrait phénolique du bois a une activité inhibitrice très efficace contre certains champignons.

Mots clés: *Maclura Pomifera*, extraction, polyphénols, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Summary

The aim of the present study is to determine the effect of extraction techniques and the solvent used on the yield of polyphenols in the fruits of *M. Pomifera*, a medicinal plant from the *Moraceae* family characterized by several bioactive components with therapeutic properties. The best extraction method ensuring high yields of polyphenols is high hydrostatic pressure combined with a cocktail of polar solvents. The dosage of extracts by the methods of Folin-Ciocalteu and aluminum chloride has demonstrated the richness of the bark and fruit of *M. pomifera* on polyphenols and flavonoids. The antioxidant activity evaluated by the various tests of DPPH, ABTS, FRAP, etc., proves that the active compounds of *M. Pomifera* have a great capacity to inhibit free radicals. The evaluation of the antibacterial activity revealed that the extract of *M. Pomifera* fruit is active against several strains of bacteria Gram+, whereas the phenolic extract of the wood has a very effective inhibitory activity against some fungi.

Keywords: *Maclura pomifera*, extraction, polyphenols, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير تقنيات الاستخلاص والمذيب المستخدم على محصول البوليفينول في ثمار *M. Pomifera* وهو نبات طبي من عائلة *Moraceae* يتميز بالعديد من المكونات النشطة بيولوجيا ذات الخصائص العلاجية. أفضل طريقة استخلاص تضمن إنتاجية عالية من البوليفينول هي الضغط الهيدروستاتيكي المرتفع مع مزيج من المذيبات القطبية. وقد أظهرت معايرة المستخلصات بطرق Folin-Ciocalteu وكلوريد الألمنيوم غزارة لحاء وثمار *M. pomifera* بالبوليفينول والفلافونويد. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال الاختبارات المختلفة لـ DPPH و ABTS و FRAP وما إلى ذلك، الى أن المركبات النشطة لـ *M. Pomifera* لها قدرة كبيرة على تثبيط الجذور الحرة. أظهر تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا أن مستخلص فاكهة *M. Pomifera* فعال ضد العديد من سلالات البكتيريا Gram + ، بينما المستخلص الفينولي للخشب له تأثير مثبط فعال للغاية ضد بعض الفطريات.

الكلمات المفتاحية: *Maclura pomifera* ، الاستخلاص ، البوليفينول ، نشاط مضادات الأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات.