



Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**



N° d'ordre : \_\_\_\_\_

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

LES DIHYDROCHALCONES DE LA POMME : EXTRACTION, SÉPARATION ET  
INTÉRÊT MÉDICAL

Présenté

par

Sébastien GILLARD

Soutenu le 31 octobre 2009 devant le jury constitué de

M. le Professeur Eric MARCHIONI, Président et Directeur de Thèse

M. le Professeur Jean-Marc LESSINGER, Membre enseignant

M. Philippe ROTHGERBER, Membre extérieur

Approuvé par le Doyen en date du  
et par le Président de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG  
FACULTÉ DE PHARMACIE**



**Doyen** : M. Jean-Yves PABST

**Directeurs-adjoints** : Mme. Y.RIVAL (Enseignement Formation commune)  
M. J.M LESSINGER (Enseignement filières)  
M. T. VANDAMME (Recherche)  
M. F. BACHERT (Etudiant)

Mme C. HEITZ, Directeur Masters Sciences du médicament

M. B. VAN OVERLOOP, Directeur Licence professionnelle

Mme C. MAECHLING, Chargée de mission Planification et ressources pédagogiques

**Responsable des Services Administratifs** : Mme Marie-Françoise GREYS

**LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT-CHERCHEUR**

**Professeurs émérites** : M. R. ANTON, M. A. GAIRARD

**Doyen honoraire** : M. G. DIRHEIMER

**Professeurs :**

M.	A. BERETZ	Pharmacologie
M.	P. BOUCHER	Physiologie
Mme	L. BOUREL	Chimie thérapeutique
M.	P. GEORGEL	Bactériologie, Virologie
M.	J.P. GIES	Pharmacologie moléculaire
M.	M. GOELDNER	Chimie organique
Mme	C. HEITZ	Pharmacie clinique
M.	M. HIBERT	Chimie organique
Mme	M.C. KILHOFFER	Biologie moléculaire
M.	Y. LANDRY	Pharmacologie
M.	J.M. LESSINGER	Biochimie
Mme	A. LOBSTEIN	Pharmacognosie
M.	E. MARCHIONI	Chimie analytique
M.	Y. MELY	Physique et Biophysique
M.	J.Y. PABST	Droit Economie pharm.
Mme	N. PAGES	Toxicologie
M.	B. PESSON	Parasitologie
Mme	F. PONS	Toxicologie
Mme	V. SCHINI-KERTH	Pharmacologie
M.	B. SPIESS	Chimie physique et miné.
Mme	G. UBEAUD-SEQUIER	Pharmacocinétique
M.	T. VANDAMME	Biogalénique
Mme	D. WACHSMANN	Immunologie
M.	P. WEHRLE	Pharmacie galénique

**Maîtres de Conférences :**

Mme	K. ALARCON	Chimie bioorganique
M.	P. ANDRE	Bactériologie
M.	N. ANTON	Pharmacie biogalénique
M.	Y. ARNTZ	Biophysique moléculaire
Mme	L. AYOUNI	Chimie analytique
Mme	M. BERGAENTZLE	Chimie analytique
Mme	H. BIETH	Chimie analytique
Mme	F. BINDLER	Chimie analytique
Mme	N. BOULANGER	Parasitologie
M.	A. BOURGUIGNAT	Biochimie
M.	C. BOYMOND	Pharmacie galénique
Mme	V. BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Mme	A.CASSET	Toxicologie
M.	T. CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Mme	G. COUPIN	Virologie et Bactériologie
M.	P. DIDIER	Biophotonique
Mme	A.M. DIEMUNSCH	Pharmacie galénique
M.	S. DUMONT	Biologie cellulaire
M.	S. ENNAHAR	Chimie analytique
Mme	N. ETIENNE-SELLOUM	Pharmacologie
Mme	N. GLASSER	Mathématique et Inform.
Mme	V. GOLDSCHMIDT	Biochimie
Mme	C. HARF-MONTEIL	Parasitologie
Mme	G. HAAN-ARCHIPOFF	Plantes médicinales
Mme	D. HARTMANN	Immunologie
Mme	B. HEURTAULT	Pharmacie galénique
Mme	E. KELLENBERGER	Bio-Informatique
M.	B. KUBALLA	Pharmacognosie
Mme	R. LEVY	Virologie et Bactériologie
Mme	C. MAECHLING	Chimie physique
Mme	R. MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Mme	N. NIEDERHOFFER	Pharmacologie
Mme	F. PERNOT	Physiologie
Mme	S. PERROTEY	Parasitologie
Mme	C. PIGAULT	Physique et Biophysique
Mme	Y. RIVAL	Chimie organique
M.	R.SCHLEIFFER	Physiologie
Mme	P. SOULAS - SPRAUEL	Immunologie
M.	C. SCHNEIDER	Biochimie
Mme	M.V. SPANEDDA	Chimie thérapeutique
M.	J.F. STAMBACH	Chimie thérapeutique
Mme	N. TOUNSI	Chimie analytique
M.	B. VAN OVERLOOP	Physiologie
Mme.	C. VONTHRON	Pharmacognosie
M.	B. WENIGER	Pharmacognosie
Mme	A. WUND	Physique et Biophysique
Mme	M. ZENIOU	Chimiogénomique

**PAST :**

Mme C. WILLER-WEHRLE Pharmacie d'officine

# SERMENT DE GALIEN

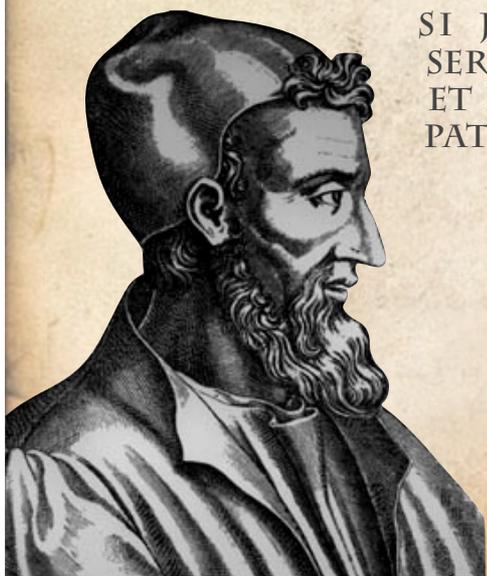
JE JURE EN PRÉSENCE DES MAÎTRES DE CETTE FACULTÉ ET DE MES CONDISCIPLES :

+ D'HONORER CEUX QUI M'ONT INSTRUIT DANS LES PRÉCEPTES DE MON ART ET DE LEUR TÉMOIGNER MA RECONNAISSANCE EN RESTANT FIDÈLE À LEUR ENSEIGNEMENT,

+ D'EXERCER MA PROFESSION AVEC CONSCIENCE ET DE RESPECTER DANS L'EXERCICE DE LA PHARMACIE, NON SEULEMENT LES LOIS EN VIGUEUR MAIS AUSSI LES RÈGLES DE L'HONNEUR, DE LA PROBITÉ ET DU DÉSINTÉRESSEMENT,

+ DE NE DÉVOILER À PERSONNE LES SECRETS QUI M'AURONT ÉTÉ CONFIÉS ET DONT J'AURAI EU CONNAISSANCE DANS LA PRATIQUE DE MON ART.

SI J'OBSERVE SCRUPULEUSEMENT CE SERMENT QUE JE SOIS MOI-MÊME HONORÉ ET ESTIMÉ DE MES CONFRÈRES ET DE MES PATIENTS.



# Remerciements

## **À Monsieur le Docteur Éric Marchioni,**

Pour m'avoir fait l'honneur de présider et diriger cette thèse et m'avoir entraîné dans cette aventure.

## **À Monsieur le Professeur Jean-Marc Lessinger,**

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour votre sympathie et votre soutien tout au long de mon parcours universitaire.

## **À Monsieur Philippe Rothgerber,**

Pour avoir accepté de participer à ce jury et ainsi évaluer mon travail du point de vue d'un professionnel arboricole.

## **À Marylène et Minjie,**

Pour avoir participé à ce tour de la pomme à mes côtés au laboratoire, m'avoir aidé à avancer et avoir rendu ce travail agréable.

## **À Marie,**

La femme de mon futur, je t'aime.

## **À mon parrain : Pdg,**

Pour tout ce que tu m'as apporté durant toutes ces années, pour m'avoir apporté tes valeurs. Plus qu'un parrain, tu es pour moi un ami très cher (trop cher !).

## **À mes soeurette de faluche : Büchner et Minue,**

Sans vous, je n'aurais certainement pas connu cette joie qu'est la faluche. Merci pour ces années de complicité et tous ces moments partagés.

## **A ma fillote Monroe, Pomme de son 3<sup>e</sup> prénom,**

Pour m'avoir procuré la joie d'être parrain.

**À ma fidèle équipe de film : Kara, Bialès, Pdg et Loïc,**

Pour toutes ces soirées de délire qui ont permis de voir naître tant de phrases devenues cultes. Pour m'avoir permis de coucher sur la pellicule numérique tous mes fantasmes.

**A mes amicalistes préférés : Pdg, Lotus, Gini, Ferrero, Chups, Caline, Kara, Bialès, Büchner, Minue, Chouky, Gazou, Sticks, Flunchy, Michelin, DJ Bass, Nasty G, Boobiz, Mikado, Titof,**

Pour ces valeurs et ces moments que nous avons partagés. Ces moments de joie, de vraie vie, d'éthylisme mais aussi de stress post bizutage intégration accueil.

**A mes amis de fac : Polau, Magu, Darwi, Anne, Sophie,**

Pour ces moments passés ensemble sur le banc de la faculté, autour d'une bière ou après le stage à Bâle ou à Saint Louis.

**A mes amis de longue date : Romain, Franz, Fred, Bebe et Sandra,**

Pour votre amitié pérenne, je vous dois beaucoup.

**À mes parents, mes soeurs et mes grands-parents,**

Pour m'avoir toujours soutenu, avoir fait de moi qui je suis.

**À mon chat : Apple,**

Pour avoir rapidement appris à te servir d'un clavier, sans comprendre les conséquences de tes actes sur ce manuscrit, à mon plus grand désespoir...

**À Steve Jobs,**

Pour m'avoir permis de réaliser toutes mes oeuvres et parachever ce dernier travail avec des logiciels et du matériel Apple.

**A mes relecteurs : Maman, Thomas, Marie-Anne, Marylène,**

Pour avoir supporté mes nombreuses fautes d'orthographe et de grammaire, mes tournures et formules repoussantes et mes phrases sans fin.

**Et à ceux que j'ai oublié,**

Pour supporter votre omission alors que j'ai pris la peine de remercier mon chat et un CEO américain, vous avez votre place dans mon coeur.

**MERCI**

# Sommaire

<b>Table des abréviations</b>	<b>10</b>
<b>Introduction</b>	<b>11</b>
<b>I. La pomme</b>	<b>12</b>
<b>A. Historique</b>	<b>12</b>
1. Origines	12
2. Étymologie	12
3. Symbolique	13
4. Miscellanées autour de la pomme	15
<b>B. Description</b>	<b>19</b>
<b>C. Culture</b>	<b>20</b>
<b>D. Production</b>	<b>21</b>
<b>E. Consommation</b>	<b>22</b>
<b>II. Les Polyphénols de la pomme</b>	<b>24</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>24</b>
<b>B. Acides hydroxycinnamiques</b>	<b>25</b>
1. Les acides coumaroylquiniques	25
2. Les acides caféoylquiniques	25
3. Caractéristiques spectrales	26
4. Teneur	26
<b>C. Les Flavonoïdes</b>	<b>28</b>
1. Flavanes (Flavan-3-ol)	31
a) La catéchine	31
b) Les procyanidines	32
c) Caractéristiques spectrales	34
d) Teneur	34
2. Flavonols	35
a) La quercétine	36
b) L'isorhamnétine	37
c) Caractéristiques spectrales	37
d) Teneur	37
3. Les anthocyanines	38
a) La cyanidine	39
b) Caractéristiques spectrales	39
c) Teneur	39
4. Les chalcones et dihydrochalcones	40
a) La Phlorétine et ses glycosides	40
(1) La phlorétine	40
(2) La phlorétine-2'-O-glucoside (phloridzine ou phlorizine)	41
(3) La phlorétine-2'-xyloglucoside	42

b) <i>L'hydroxyphlorétine et ses glycosides</i>	42
(1) L'hydroxyphlorétine	42
(2) L'hydroxyphlorizine	43
(3) L'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside	43
c) <i>Caractéristiques spectrales</i>	44
d) <i>Teneur</i>	44
<b>III. Identification des dihydrochalcones, revue bibliographique</b>	<b>46</b>
<b>A. Méthodes d'analyse</b>	<b>46</b>
1. Préparation des échantillons	46
2. Extraction	46
3. Séparation	47
4. Détection	49
a) <i>Spectroscopie d'absorption UV-visible</i>	49
b) <i>Masse</i>	49
<b>B. Répartition des dihydrochalcones dans la pomme et ses dérivés</b>	<b>50</b>
1. Le fruit	50
a) <i>Différences entre les variétés de pommes</i>	50
b) <i>Différences entre la peau, la chair et les pépins</i>	51
2. Le jus	52
a) <i>Différences entre les jus de pomme frais et les jus commerciaux</i>	52
b) <i>Différences entre les jus clairs et les jus troubles</i>	52
3. Le résidu de pressage (Pomace)	52
<b>C. Paramètres influençant la teneur en polyphénols</b>	<b>53</b>
1. Dans la pomme	53
a) <i>L'activité enzymatique</i>	53
b) <i>Conditions de culture</i>	54
c) <i>Le mûrissement et stockage à froid</i>	54
2. Dans le jus de pomme	55
a) <i>Oxydation des jus de pomme</i>	56
b) <i>Traitements enzymatiques</i>	58
c) <i>Traitements thermiques</i>	59
d) <i>Champs électriques pulsés</i>	60
e) <i>Extraction/diffusion</i>	61
f) <i>Collage</i>	61
g) <i>Filtration</i>	62
(1) Filtration et ultrafiltration	62
(2) La PVPP	63
h) <i>Stockage</i>	64
<b>D. Application industrielle</b>	<b>64</b>
<b>IV. Etude de laboratoire</b>	<b>66</b>
<b>A. Matériel et méthode</b>	<b>66</b>
1. Substances de référence	66
2. Les solvants	66
3. Le matériel	66

4. Protocoles	68
a) <i>Préparation des échantillons</i>	68
b) <i>Extraction</i>	69
(1) La peau, la pulpe et le moût	69
(2) Le jus	69
c) <i>Séparation et concentration des dihydrochalcones</i>	70
5. Conditions chromatographiques	71
a) <i>Conditions chromatographiques UPLC-UV/visible</i>	71
b) <i>Conditions chromatographiques HPLC-UV/visible</i>	73
c) <i>Conditions chromatographiques HPLC-MS-MS</i>	73
6. Calcul du taux de recouvrement	74
<b>B. Résultats et discussion</b>	<b>74</b>
1. Identification des dihydrochalcones	74
a) <i>Par UPLC - UV/visible</i>	74
b) <i>Par HPLC - MS-MS</i>	78
c) <i>Intérêt de l'UPLC par rapport à l'HPLC</i>	78
d) <i>Amélioration de la résolution en UPLC</i>	79
2. Extraction	82
a) <i>La peau, la chair et le moût</i>	82
b) <i>Le jus de pomme</i>	84
(1) Mise au point de colonnes de PVPP	84
(2) Optimisation du solvant d'éluion	85
(3) Optimisation du volume d'éluion	87
(4) Effet de la température	88
3. Étude de la teneur en dihydrochalcones	89
a) <i>Comparaison de différentes variétés communes de pommes</i>	89
b) <i>La pomme Weirouge</i>	91
(1) Peau et chair	92
(2) Jus	95
(3) Résidu de pressage	96
c) <i>Séparation et concentration des dihydrochalcones</i>	99
4. Purification d'une fraction concentrée en dihydrochalcones dans le cadre d'une collaboration franco-allemande	103
a) <i>Le MRI</i>	103
b) <i>Les objectifs</i>	103
c) <i>Résultats</i>	105
<b>V. Intérêt médical</b>	<b>106</b>
<b>A. Biodisponibilité</b>	<b>107</b>
<b>B. Action antioxydante</b>	<b>108</b>
1. Agents piègeurs des espèces réactives de l'oxygène	108
a) <i>Effets généraux des polyphénols de la pomme</i>	109
b) <i>Pharmacophore</i>	110
c) <i>Intérêts</i>	111
2. Peroxydation des lipides	111
3. Effets sur la peau	111

4. Agents piégeurs des espèces réactives des dicarbonyles	112
a) <i>La glycation</i>	112
b) <i>Conséquences de la glycation</i>	113
c) <i>Importance du méthylglyoxal</i>	113
d) <i>Inhibition du méthylglyoxal</i>	114
e) <i>Actions de la phlorétine et la phlorizine</i>	115
f) <i>Pharmacophore</i>	115
<b>C. Action antidiabétique</b>	<b>116</b>
1. Découverte des effets de la phlorizine	116
2. Les transporteurs du glucose (SGLT et GLUT)	117
3. Potentiel des inhibiteurs des SGLT	118
4. Inhibiteurs des SGLT	120
5. Inhibition des GLUT2	121
<b>D. Action antiobésité</b>	<b>122</b>
<b>E. Action anticancéreuse</b>	<b>123</b>
<b>F. Action sur la contractilité des myocytes (canaux calciques et potassiques)</b>	<b>124</b>
<b>G. Action sur la mémoire</b>	<b>125</b>
<b>H. Action sur les poumons</b>	<b>126</b>
<b>I. Action antimalarique</b>	<b>126</b>
<b>J. Application actuelle</b>	<b>127</b>
<b>K. Synthèse</b>	<b>128</b>
<b>Conclusion</b>	<b>129</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>130</b>

# Table des abréviations

$\lambda_{\max}$	Longueur d'onde d'absorption maximale
$\mu\text{m}$	Micromètre
$\mu\text{M}$	Micromole ou micromolaire
$\mu\text{g}/\text{kg}$	Microgramme par kilogramme
A	Ampère
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct</i> (produits de glycation avancés)
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
C18	Chaîne organique à 18 carbones
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Da	Dalton
DPPH	2,2'-diphényle-1-picryle hydrazyle
DP	Degré de Polymérisation
g	Gramme
GLUT	<i>Glucose Transporter</i> (transporteur du glucose)
GO	Glyoxal
h	Heure
H <sub>2</sub> O	Eau
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HCl	Chlorure d'hydrogène (molécule) ou acide chlorhydrique (solution)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (lipoprotéine de haute densité)
hl	Hectolitre
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie Liquide Haute Performance)
Hz	Hertz
IgM	Immunoglobuline M
IgG	Immunoglobuline G
JNK	<i>Jun N-terminal Kinases</i>
kg	Kilogramme
kJ/kg	Kilojoule par kilogramme
kV	Kilovolt
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoprotéine de basse densité)
M	Mole ou molaire
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
mBar	Millibar
MeOH	Méthanol
MGO	Méthylglyoxal
mg/kg	Milligramme par kilogramme
mg/l	Milligramme par litre
min	Minute
m/z	Ration masse sur nombre de charge (spectrométrie de masse)
nm	Nanomètre
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Amplification en Chaîne par Polymérase)
ppm	Partie par million
PET	Polyéthylène téréphtalate (filtres)
PSI	<i>Pound per square inch</i> (unité de mesure de pression)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène (filtres)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotation par minute
SGLT	<i>Sodium-Glucose Linked Transporter</i> (cotransporteur sodium-glucose)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extraction sur Phase Solide)
T°	Température
TTC	Toutes taxes comprises
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie Liquide Ultra Performance)
UV	Ultraviolet
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (lipoprotéine de très basse densité)

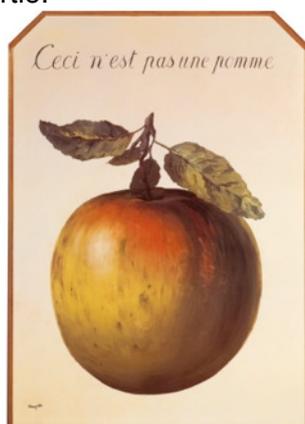
# Introduction

Les dihydrochalcones sont des polyphénols pour la plupart méconnus appartenant à la classe des flavonoïdes. Leurs principaux représentants sont la phlorétine et son glycoside, la phlorizine, présents essentiellement dans la pomme.

La consommation en polyphénols, dont les principales sources, dans les pays occidentaux, sont les fruits et les légumes, est, en moyenne, de 1 g/jour dont les  $\frac{2}{3}$  sont des flavonoïdes. La pomme, *Malus domestica* (*Rosaceae*) peut en contenir entre 0,1 et 5 g/kg de poids humide. Ils jouent un rôle important sur le plan nutritionnel (propriétés antioxydantes), organoleptique (couleur, amertume, astringence), technologique (protection contre l'oxydation, inhibition enzymatique) et commercial (allégations nutritionnelles) pour ce fruit et ses produits dérivés. De plus, on leur attribue de très nombreuses propriétés thérapeutiques. En effet, les polyphénols sont des antioxydants puissants dont de nombreuses études épidémiologiques ont démontré l'effet préventif sur des pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers.

Ce mémoire se propose de réunir les connaissances actuelles sur les dihydrochalcones de la pomme ainsi que de présenter les résultats d'un travail de 9 mois dans le laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, sous la direction de M. Eric Marchioni. Le but de ce travail a été de mettre au point une méthode d'extraction et de séparation des dihydrochalcones dans le but de fournir une fraction enrichie en ces produits afin de réaliser des essais *in vitro* et *in vivo*.

Ainsi, après une courte introduction sur la pomme, seront exposés, dans un premier temps, l'ensemble des composés phénoliques présents dans la pomme avant de s'intéresser, dans un second temps, à la littérature traitant de l'étude des dihydrochalcones. Puis, les résultats obtenus au laboratoire, notamment sur une espèce peu connue de pommes à chair rouge - la *Weirouge* - seront résumés. Enfin, les nombreux effets thérapeutiques et médicaux attribués à ces molécules seront abordés dans une dernière partie.



# I. La pomme

## A. Historique

### 1. Origines

Le pommier serait apparu il y a quatre-vingt millions d'années. L'homme du néolithique des plateaux d'Anatolie est ainsi le premier à apprécier son fruit [1].

Au VI<sup>e</sup> siècle av. J.-C., les Romains connaissaient 37 variétés de pommes, ce qui s'avère être considérable pour l'époque. Ils ont contribué à la propagation de la pomme en Angleterre ainsi qu'à travers le reste de l'Europe. Trois siècles avant notre ère, dans son *Histoire des Plantes*, Théophraste distinguait six variétés de pommes que l'*Odyssée* d'Homère évoque sous le terme flatteur de « beaux fruits » : « les agrestes ou sauvages, les printanières ou précoces, les sérotines ou tardives, les mélimèles ou douces, les épirotiques venues de l'Epire et enfin les urbaines ou cultivées ».

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

Fruit de nombreux croisements et évolutions, la pomme peut aujourd'hui se vanter d'exister sous des milliers de variétés réparties à travers le monde. Ce sont au total 11 324 variétés qui sont recensées aujourd'hui [2], en prenant en compte les anciennes variétés comme les plus récentes qui portent encore des numéros dans des laboratoires expérimentaux. En ne considérant que les types *domestica* qui ont un intérêt pomologique et seulement les variétés qu'il est possible de se procurer auprès d'organismes officiels, ce nombre atteint tout de même 9 541 variétés.

### 2. Étymologie

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

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

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

En dehors de l'Europe romane, la pomme avait un nom indo-européen, *abol*, qui a donné les formes germaniques *apel* en gotique, *appel* en vieux saxon et en néerlandais, *apple* en anglais et en suédois, *apfel* en allemand, *aeble* en danois... En celtique ancien, la pomme se disait *abalo* et le pommier *aballo* qui a donné en gaulois *auallo* ou *avallo* (pommier), en vieil irlandais *aball* (pommier), en vieux gallois *afal* (pomme) et en breton *aval* (pomme).

En Afrique francophone, le mot « pomme » désigne la pomme de terre. La pomme est quant à elle désignée sous le terme de « pomme-fruit » ou « pomme de France ».

Dans l'histoire des mots, la pomme est donc l'archétype du fruit, et c'est ce lexique commun de la pomme et du fruit qui a permis d'attribuer à la pomme un certain nombre d'épisodes bibliques ou de légendes mythologiques.

### 3. Symbolique

D'Ève à Vénus, de Pomone (déesse de l'agriculture) à Atalante en passant par Marie (souvent représentée avec l'enfant tenant une pomme), l'histoire de la pomme est étroitement liée à la femme.



Adam and Eve  
(Albrecht Dürer)

Bien entendu, la pomme reste pour beaucoup le fruit du péché, éternel fruit de la tentation. Mais d'où provient cette légende ? Dans la Bible, plus précisément dans le Livre de la Genèse, c'est après avoir croqué un fruit interdit, qu'Adam et Ève furent chassés du Paradis. Mais pourquoi une pomme ? « *E malo nascitur omne malum* ». Il semblerait que lors de la traduction latine, l'analogie entre les deux mots latins désignant la pomme (*malum*) et le mal (*malus*) soit pour beaucoup dans le choix symbolique de ce fruit. L'arbre « *malus* » désignant l'arbre «mauvais» est, de ce fait, devenu le « pommier » vers le V<sup>e</sup> siècle de notre ère ! C'est ainsi que la pomme peut symboliser aussi bien l'acte sexuel (« croquer la pomme ») que la connaissance interdite.

Dans la mythologie gréco-romaine, la pomme est considérée comme un cadeau amoureux au même titre que la rose par exemple. Selon la mythologie grecque, Dionysos l'aurait créée pour l'offrir à Aphrodite, sa maîtresse. C'est pour cette raison que la pomme serait devenue le symbole de la déesse de l'amour. Par ailleurs, Héra, épouse de Zeus, dieu de la nature dans la mythologie grecque, reçut en cadeau de noces les fruits d'un pommier magique.

Les pommes pouvaient aussi être symbole de prospérité, comme celles du jardin des Hespérides. La cueillette des pommes d'or du jardin des Hespérides, est le onzième des travaux d'Héraclès. Offertes par la Terre en cadeau de nocces à Jupiter et Junon, ces pommes, procurant l'immortalité à ceux qui les croquaient, avaient été plantées dans une contrée à la végétation abondante, dans laquelle vivaient de charmantes jeunes filles nommées les Hespérides. Héraclès parvint à s'emparer des fruits convoités, et les offrit au roi Eurysthée, pour le compte duquel il accomplissait ses exploits. Embarrassé, ce dernier rendit les fruits à Héraclès qui les remit alors à



*The Garden of the Hesperides  
(Frederic Lord Leighton)*

Athéna qui retourna les planter dans le jardin des Hespérides. En effet, ces pommes divines n'avaient pas leur place dans le monde des mortels. La mythologie offre donc également un exemple de pommes dont la consommation aurait été interdite aux humains. Il est tout à fait possible que les rédacteurs de l'Ancien Testament s'en soient souvenus en écrivant l'épisode d'Adam et Ève.

Un autre épisode mythologique, particulièrement célèbre, fit de la pomme un fruit dangereux : c'est celui du jugement de Pâris, ou de la pomme de discorde. Vexée de n'avoir pas été invitée aux nocces de Thétis et Pelée sur l'Olympe, Eris, déesse de la Discorde, décida de se venger en jetant sur la table du banquet une pomme dorée portant l'inscription « À la plus belle ». Trois déesses revendiquèrent le fruit : Héra, Athéna et Aphrodite. Afin de mettre un terme à la dispute, Zeus ordonna à Hermès d'emmener les déesses sur le mont Ida pour consulter le berger Pâris, fils de Priam, roi de Troie. Héra proposa au jeune homme de régner sur le monde. Athéna lui offrit la victoire à tous ses combats. Finalement, le jeune homme accorda le prix



*Le Jugement de Pâris  
(Jean-Antoine Watteau)*

à Aphrodite, qui lui promet la main d'Hélène, la plus belle des femmes. Quelques mois plus tard, il séduisit et enleva Hélène. Pour venger cet affront, Ménélas, époux d'Hélène, demanda l'appui de tous les Grecs au nom du Serment de Tyndare, ce qui provoqua la célèbre guerre de Troie. La ville assiégée fut protégée par Aphrodite, tandis qu'Héra et Athéna protégèrent les troupes grecques, qui remportèrent finalement la victoire.



*Atalante et Hippomène  
(Guido Reni)*

Une dernière apparition des pommes d'or dans la mythologie est la course entre Atalante et Hippomène. Ce dernier défia à la course Atalante : il pourrait l'épouser s'il remporte l'épreuve, mais devrait mourir s'il perdait. La jeune fille était la plus rapide, mais Hippomène disposait de trois pommes que lui avait données Aphrodite, et qu'il jetait derrière lui dès qu'Atalante le dépassait. Celle-ci s'arrêta pour ramasser chacune des pommes, permettant à Hippomène de gagner du temps et de remporter la course et par conséquent sa main.

Ainsi, depuis les prémices de la civilisation, la pomme possède une réputation sulfureuse qu'il faut aussi chercher dans son apparence-même. La pomme devient symbole de beauté, de volupté, d'amour et peut être une référence érotique : sa forme sphérique rappelle la poitrine féminine, tandis que son cœur coupé en deux est censé rappeler la vulve. De la femme, la pomme possède les rondeurs, la plénitude, la carnation douce et lisse... sans parler de la chair, tendre et parfumée. Au Portugal, ce fruit est considéré comme aphrodisiaque.

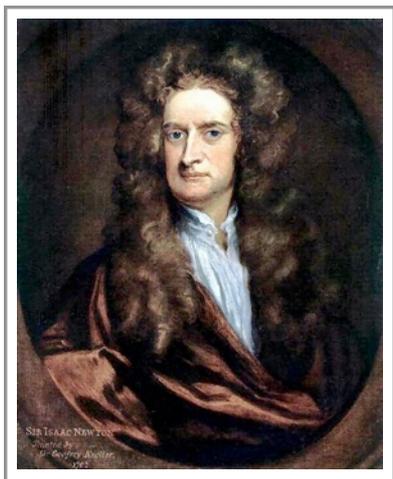
Enfin, la forme sphérique de la pomme faisait aussi d'elle un symbole cosmique. C'est pourquoi les empereurs et les rois étaient représentés tenant à la main, à côté de leur sceptre, un globe impérial en forme de pomme, qui est censé symboliser le monde. La pomme symbolise de cette manière le pouvoir.

#### **4. Miscellanées autour de la pomme**

Comme il a été démontré précédemment, la pomme possède une histoire mythologique et divine qui lui confère une place prépondérante dans la société. Elle est omniprésente ! Dans l'art, la religion, la magie, le folklore, l'histoire ou encore la médecine [3-5].

Chez les Turcs et les Persans il fallait manger 40 pommes pour que les vœux soient exaucés. Avant de les croquer une par une, il fallait souffler dessus et faire son vœux. Mais attention, arrêtez-vous à la 39<sup>ème</sup> pomme et les pires « pépins » risquaient de s'abattre sur votre maison...

L'équivalent du jardin des Hespérides dans la mythologie celtique est l'île d'Avallon, dont le nom signifie « l'île aux pommes ». Terre d'abondance où tout croît naturellement, cette île mythique est le séjour des rois et héros défunts ; elle sert de lien entre le monde des hommes et celui des dieux. Neuf fées y demeurent, et veillent sur le corps du défunt roi Arthur. Merlin l'enchanteur utilisait la pomme comme lien entre le ciel et la terre, entre les dieux et les hommes. Il réalisait ses enseignements sous un pommier.



La légende dit que qu'Isaac Newton aurait compris les lois de l'attraction universelle en étant réveillé par la chute d'une pomme sur sa tête. Il semble en réalité que ce soit en observant la chute d'une pomme que Newton réalisa que ce devait être les mêmes lois qui gouvernaient la trajectoire de la pomme en chute libre et celle de la Lune autour de la Terre. Un calcul relativement simple lui permit alors d'en déduire les principes des lois de l'attraction universelle. De ce fait, nombre d'ouvrages sur le sujet ou à propos de la relativité générale ont leur couverture illustrée par une pomme. L'ouvrage *General Relativity* de Robert M. Wald, par exemple, est illustré d'un tableau de Magritte intitulé *Les Belles Réalités* (1964).

Les pommes sont d'ailleurs présentes dans plusieurs des tableaux de Magritte. Dans la toile « Ceci n'est pas une pomme » (cf. Introduction), il emploie une pomme pour appuyer son travail sur les mots et leurs représentations.



*Les Belles Réalités*  
(Magritte, 1964)



*Le fils de l'homme*  
(Magritte, 1964)



*Prêtre marié*  
(Magritte, 1961)



*La chambre d'écoute*  
(Magritte, 1958)



Ce n'est certainement pas par hasard que Charles Perrault choisit une pomme pour empoisonner Blanche Neige. Les références mythologiques sont très importantes. En effet, cette pomme empoisonnée lui avait été donnée par sa mère jalouse de la beauté de sa fille. Seul un baiser de son Prince charmant put sortir la princesse de son sommeil.

Alan Turing, mathématicien britannique, inventeur du concept de programmation et de programme, à l'origine de l'informatique, mourut en 1954 par empoisonnement en mangeant une pomme contenant du cyanure. Beaucoup de gens pensent que cette mort est intentionnelle et qu'il se serait donné la mort (son film préféré était *Blanche Neige* de Walt Disney).

Au XIII<sup>e</sup> siècle, une autre pomme entra dans la légende, celle de Guillaume Tell. Celui-ci refusa de saluer le chapeau des « Habsbourg », symbole de l'autorité impériale, placé au haut d'une perche par le bailli d'Albert 1<sup>er</sup>, empereur germanique, dans la petite ville d'Altdorf. Le gouverneur le fit arrêter et le condamna à traverser d'une flèche une pomme placée sur la tête de son jeune fils. Épreuve terrible dont Guillaume Tell sortit vainqueur.



Logo initial d'Apple

La société Apple, signifiant « pomme », donna le nom d'une variété de pomme à une gamme de produits (Macintosh). La firme aurait choisi ce symbole car, durant leurs jeunes années, les fondateurs étaient souvent en manque d'argent et mangeaient régulièrement des pommes (qui ont l'intérêt d'être nourrissantes). Certains pensent aussi que c'est en hommage à Alan Turing, ou en référence à la pomme d'Isaac Newton. Fait très peu connu d'ailleurs, le logo initial de la firme représentait la pomme, l'arbre et Newton en train de dormir dessous. Pendant de nombreuses années, lors des expositions Apple, des pommes *Granny Smith* étaient gratuitement mises à disposition des visiteurs.

Sur les ordinateurs Macintosh, la « touche pomme » était la touche modificatrice équivalente à la touche « Control » (remplacée depuis la version 10.5 du système d'exploitation par le signe « cmd »). Le symbole « pomme » (🍏) est obtenu avec la combinaison touche Alt+&.

La pomme sert aussi de logo à la maison de disque des Beatles, Apple Corps en procès avec la société Apple. En effet, les deux sociétés avaient signé un contrat dans lequel Apple s'engageait à ne pas entrer dans le commerce de musique afin de pouvoir garder son nom de marque. Ce contrat a été rompu par l'ouverture de l'iTunes Music Store d'Apple en avril 2003 aux États-Unis, et en juin 2004 en France.





New York est depuis de nombreuses années surnommée « Big Apple » (« la grosse pomme »). De nombreuses histoires proposent une origine à ce nom mais la véritable a été oubliée. Selon certaines, ce nom a été donné par les artistes qui se produisaient à New York dans les années 1930. Pour les artistes, comédiens ou musiciens, jouer à New York représentait une consécration. Un jour l'un d'entre eux a dit à ce sujet : « Il y a beaucoup de pommes dans l'arbre du succès, mais quand tu joues à New York, tu cueilles la grosse pomme ». Une autre version de cette histoire trouve cette origine dans la boule que l'on a dans la gorge ou dans l'estomac quand on a le trac. L'origine de ce surnom est peut-être aussi due à un night-club de Harlem dont le nom était

« The Big Apple ». Les musiciens de jazz qui y jouaient auraient étendu ce nom à toute la ville. Une autre explication serait une campagne publicitaire de 1971 visant à promouvoir le tourisme à New York. Le terme « Big Apple » avait été adopté pour définir la ville et les affiches mettaient en valeur de belles pommes *Golden*. Cependant cette dernière explication, qui a certainement assis ce surnom, n'explique pas son origine qui reste mystérieuse [6].

Aux États-Unis, la pomme est le cadeau traditionnel que l'on offre aux enseignants. Elle est devenue par extension le symbole de la profession.

Le pommier fut un des symboles de la campagne de Jacques Chirac en 1995 pour son élection à la présidence de la République française. La pomme représentait, avec le pommier, les fruits de la France. L'émission satirique *Les Guignols de l'info* avait d'ailleurs modifié son slogan de campagne en « Mangez des pommes » : sa famille est originaire de la Corrèze, région grande productrice de pommes.



Dans le langage populaire, le mot « pomme » s'utilise pour désigner un visage rond... comme une pomme : « il a une bonne pomme ». Il s'utilise aussi par extension pour désigner une personne serviable et naïve : « c'est une bonne pomme ». Au Québec, on dit « chanter la pomme » pour conter fleurette ou faire du gringue. On dit aussi « se sucer la pomme » pour s'embrasser ou se bécoter. L'expression « c'est pour ma pomme » signifie c'est pour moi, ça va être mon tour. Cette expression marque souvent une forme de déception.

L'expression « tomber dans les pommes » serait en fait une déformation de tomber dans les pâmes ou tomber en pâmoison et n'aurait rien à voir avec le fruit.

Cuite avec de la graisse animale, la pomme entrait dans la préparation d'un onguent employé comme crème corporelle visant à hydrater et adoucir les mains et les lèvres gercées. Cette préparation s'appelait « *pomata* » qui donnera par la suite le mot français « pommade ».

## B. Description

La pomme compte parmi les fruits de climat tempéré les plus répandus. C'est du point de vue botanique un piridion (c'est-à-dire un fruit portant une rosette sur le bas, et un pédoncule marqué). C'est un fruit arrondi, de forme quasi sphérique, de 10 à 15 cm de diamètre environ, et de couleur différente selon les variétés et les conditions de végétation. Sa couleur à maturité s'étend du vert « pomme » au rouge plus ou moins foncé en passant par une grande diversité d'intermédiaires vert pâle, jaune, orangé ou de couleurs plus ou moins panachées [7].

Certaines variétés anciennes avaient des formes particulières (Figure 1), comme la pomme d'api, plutôt plate et de forme étoilée pentagonale, ou la pigeonnet de Rouen, au contraire très allongée, tout comme la pomme bougie qui était très prisée à Paris à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle.



Pomme d'api



Pomme pigeonnet



Pomme bougie

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

La pomme peut être divisée en trois zones : la peau, la chair et le cœur. La chair et la peau correspondent aux parties consommées du fruit tandis que le cœur contient les carpelles et les pépins. Sur une coupe transversale (Figure 2), on peut observer au centre, les pépins (les graines) au nombre de deux dans chacune des cinq loges de l'ovaire initial, entourée d'une enveloppe sclérifiée, l'ensemble étant lui-même entouré d'une pulpe mince (le cœur), qui correspond au développement de la paroi de l'ovaire. Puis une mince membrane fibreuse marque la séparation avec le réceptacle qui s'est considérablement épaissi pour former l'essentiel de la chair du fruit.

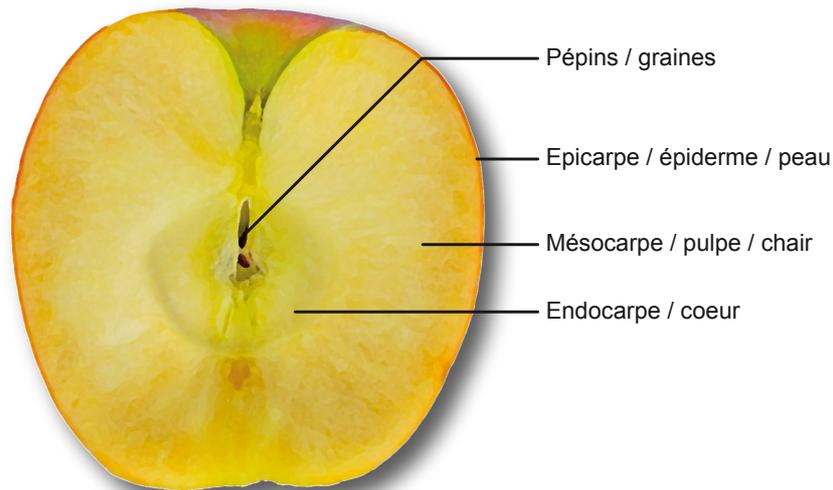


Figure 2 : Coupe transversale de pomme

Il existe deux catégories de pommes : les pommes à cidre et les pommes à table dites aussi à couteau ou à croquer. Cependant ces dernières peuvent aussi être utilisées pour la préparation de jus, de cidre, de pâtes de fruits, de fruits tapés, de fruits séchés en quartiers, etc...

## C. Culture

*Malus communis*, le pommier, est un arbre fruitier de la famille des Rosacées extrêmement répandu dans toutes les zones tempérées du monde. C'est un arbre à feuillage caduc pouvant atteindre plus d'une dizaine de mètres de hauteur, très résistant au froid, et qui a d'ailleurs besoin d'une période de froid hivernal suffisante pour démarrer et fleurir l'année suivante. Cependant, comme beaucoup d'arbres fruitiers des pays tempérés, c'est un arbre dont la floraison printanière de couleur blanche à blanc-rosé reste sensible aux gels printaniers, même légers [7, 8].

Les pommiers apprécient les sols riches et drainants, mais restant frais, voire humides. La proximité de ruches est un facteur important dans les vergers, aussi appelés pommeraies, pour une bonne pollinisation. Le semis de pommier est réalisable, et produit des arbres vigoureux, mais aux fruits de qualité aléatoire. Pour conserver les qualités d'une variété donnée, le greffage est le plus souvent employé.

Il convient de faire la différence entre l'arboriculture fruitière et la pomologie. L'arboriculture consiste à cultiver les fruits alors que la pomologie est l'art de les étudier. Ainsi l'étude de la culture des pommes constitue une partie de la pomologie, la pomologie englobant tous les fruits à pépins.

## D. Production

Il se récolte environ 66 millions de tonnes de pommes annuellement dans le monde, dont 28 millions de tonnes en Chine qui a multiplié par deux sa production en 10 ans (Tableau 1) [9].

Production en milliers de tonnes		
	Chine	27 866
	États-Unis	4 238
	Iran	2 660
	Turquie	2 458
	Russie	2 333
	France	2 144
	Italie	2 076
	Inde	2 001
	Chili	1 390
	Argentine	1 300
	Monde	65 971

Tableau 1 : Production mondiale de pommes par pays en 2007 [9]

L'Europe est un grand continent arboricole avec une production de près de 10 millions de tonnes par an, tirée par 3 principaux pays producteurs : l'Italie, la Pologne et la France [1].

La France présente une production de 1,6 millions de tonnes par an, en moyenne et le marché s'élève à 610,1 millions d'euros. A titre comparatif, le marché des pâtes alimentaires est de 410 millions d'euros et le marché des céréales du petit déjeuner est de près de 477 millions d'euros. Les pommes les plus produites sont la *Golden*, la *Gala* et la *Granny Smith* (Figure 3) [1].

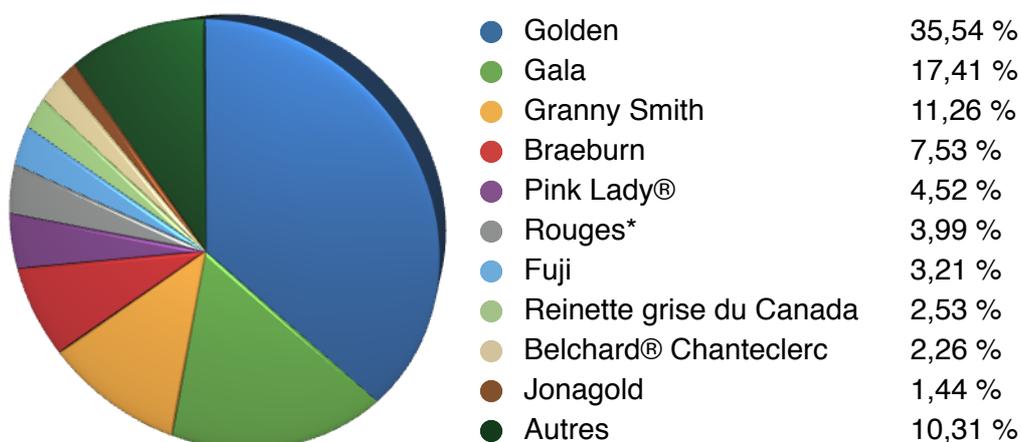


Figure 3 : Pourcentage des variétés de pomme dans la production française en 2008 [1]  
(\*Red Delicious et apparentées)

## E. Consommation

La pomme est le fruit préféré des Français avec 22,6 % de part de marché en volume, loin devant les oranges (12,3 %) et les bananes (12,2 %). Ils en consomment près de 20 kg par an et par ménage sous toutes leurs formes et plus de 88 % des ménages achètent des pommes au moins une fois par an [1, 7].

Cependant cette moyenne de 20 kg/ménage/an cache des disparités : les plus gros consommateurs vont jusqu'à plus de 32 kg en moyenne par an, les consommateurs moyens entre 13 et 32 kg et les petits consommateurs moins de 13 kg. Néanmoins le niveau moyen de consommation reste stable puisqu'en 2004/2005 elle était de 19,3 kg et 19,1 kg en 2001/2002.

Il est par ailleurs intéressant de remarquer que les personnes âgées (+50 ans) en consomment deux fois plus que les moins de 35 ans. D'un point de vue général, la consommation augmente avec l'âge (Figure 4). Est-ce le poids de la sagesse, ou bien une culture alimentaire différente en fonction des générations ?

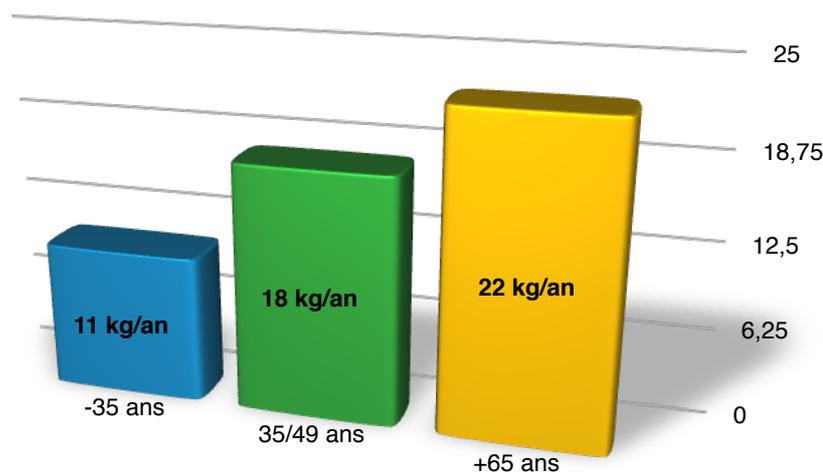


Figure 4 : Consommation de pommes dans la population française [1]

Les modes de consommation de la pomme sont infinis. Même si la consommation à la croque est la plus courante, la pomme s'adapte à toutes les préparations culinaires, qu'elles soient salées ou sucrées, qu'elles soient en entrée, en plat ou en dessert.

Certaines variétés supportent mal la cuisson, d'autres deviennent amères quand elles sont cuites au four. On recherche généralement pour croquer : une pomme ferme, juteuse, savoureuse et croquante ; pour les tartes : une pomme peu juteuse et légèrement acidulée ; pour cuire au four : une pomme sucrée qui se déforme peu ; pour les gelées : une pomme à peine mûre, acidulée, juteuse et riche en pectine ; pour la compote : une pomme qui conserve sa couleur. Les impératifs du marché font en sorte que relativement peu d'espèces sont commercialisées. En effet,

plusieurs variétés de pommes sont en voie de disparition parce qu'elles ne sont pas assez rentables. Ainsi, au Canada, la *McIntosh* a longtemps occupé la part majeure du marché. Elle perd graduellement sa place, plusieurs variétés lui faisant concurrence, notamment la *Grenny Smith*, la *Délicieuse* et la *Cortland*.

Enfin, une étude menée en 2003 sur les habitudes des français montre son importance dans l'alimentation générale (Figure 5).

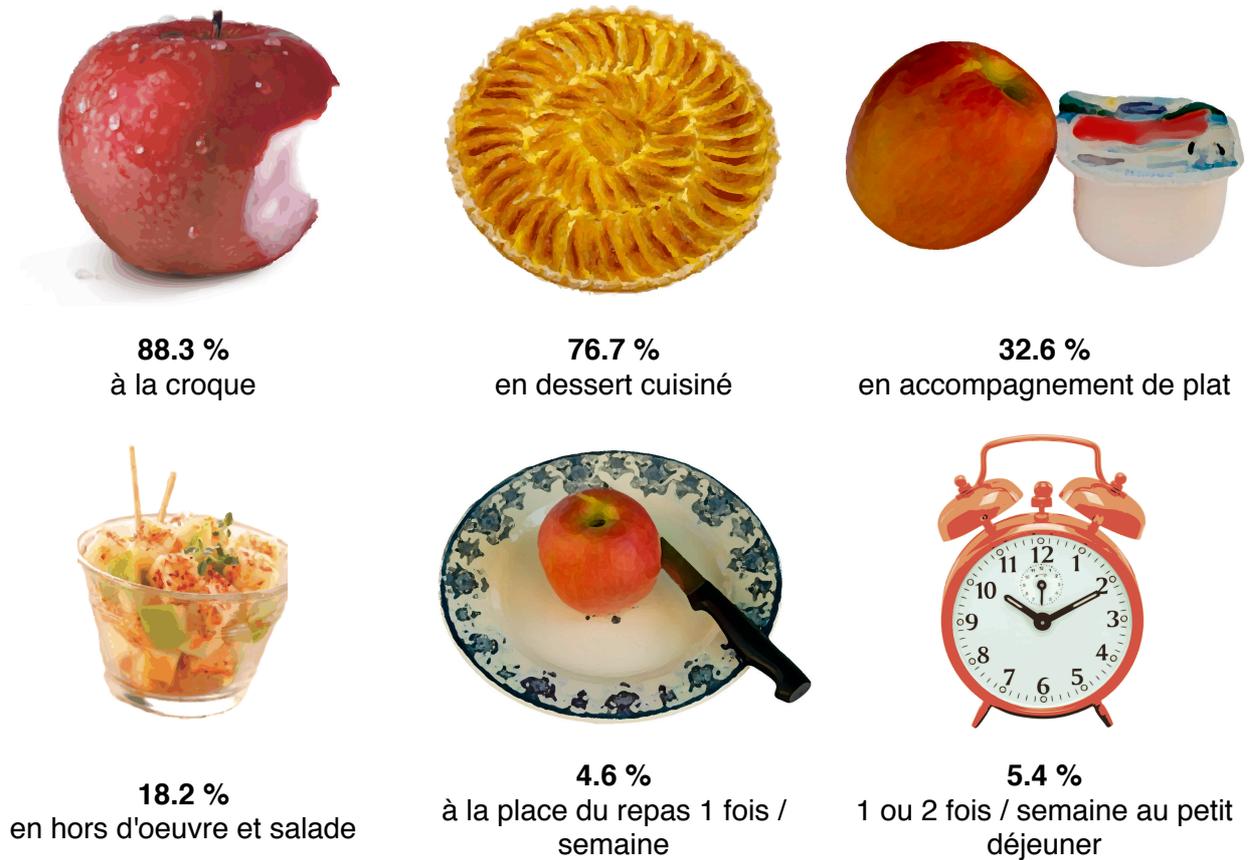


Figure 5 : Baromètre CTIFL 2003 sur les habitudes de consommation des français.

## II. Les Polyphénols de la pomme

### A. Introduction

Le terme « polyphénols » est devenu pour un grand nombre de personnes un mot sensationnel auquel sont associés de nombreux pouvoirs thérapeutiques. En effet, ce terme est utilisé à tort et à travers dans le langage courant mais aussi dans le monde scientifique car il s'agit d'un mot qui fait vendre. Cependant, le terme « polyphénols » devrait normalement être réservé aux molécules comportant plusieurs fonctions phénols, ce qui exclut les composés monophénoliques pourtant très abondants chez les végétaux. On préférera donc utiliser le terme « composés phénoliques » qui regroupe toute molécule comportant au moins une fonction phénol.

On connaît actuellement plusieurs milliers de composés phénoliques d'origine végétale. Ils ont des structures très diverses mais présentent toujours au moins un cycle benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. De ce fait, on estime le nombre de composés phénoliques à plus d'un million car en plus de présenter plusieurs familles en fonction du noyau, on les retrouve toujours sous forme de glycosides dont la nature et le nombre de sucres peuvent varier. Les composés phénoliques sont ainsi regroupés en plusieurs classes distinctes selon la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation, méthylation, etc.) et enfin les liaisons possibles de ce squelette de base à des molécules diverses et variées (glucides, lipides, protéines, etc.) [10, 11]. Ce mémoire se concentrera essentiellement sur les composés phénoliques retrouvés dans la pomme.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux. Bien que de nombreuses hypothèses aient été formulées, leur rôle physiologique reste assez obscur. Ils sont impliqués dans les mécanismes luttant contre le stress oxydatif, les radiations ultraviolettes, les infections par des microorganismes, etc. [12]. Dans les cellules, ils sont localisés dans des vacuoles intracellulaires ou les parois cellulaires mais jamais dans le cytoplasme. Cette répartition a des conséquences sur leur analyse et leur extraction [13]. Depuis une vingtaine d'années, l'identification et la quantification des composés phénoliques de la pomme s'est intensifiée suite à l'intérêt croissant que suscitent ces molécules. Par conséquent, la littérature fournit de très nombreuses données mais leur comparaison reste difficile car les techniques de quantification varient énormément. De plus, les paramètres agronomiques (variété, maturité, conditions de culture, etc.) ainsi que le matériel d'étude (fruit frais, pelures, cortex, pépins, jus commercial ou fait maison, trouble ou filtré) contribuent à la diversité des mesures. De ce fait, les données suivantes ne sont destinées qu'à fournir des ordres de grandeur.

## B. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont des composés monophénoliques car ils ne comportent qu'un noyau phénol. Ils dérivent de l'acide cinnamique (Figure 6) et sont constitués d'un noyau phénolique substitué par une chaîne propénoïque (structure en C6-C3). La présence d'une insaturation sur la chaîne latérale conduit à l'existence de deux isomères, *cis* et *trans*, dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. On trouve cependant dans la nature la forme *trans* de manière prépondérante tandis que la forme *cis* correspondrait à des artefacts d'extraction. Ces acides sont très rarement retrouvés à l'état libre et sont en général combinés à des molécules organiques [10].

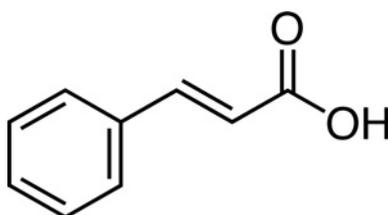


Figure 6 : Acide cinnamique

### 1. Les acides coumaroylquiniques

L'acide coumarique existe sous forme de trois isomères, l'acide *p*-coumarique (Figure 7) et ses isomères *o*- et *m*-coumariques. Ils sont rarement présents à l'état libre et existent sous la forme d'esters ou de glucosides. L'acide *p*-coumarique est le plus abondant des trois isomères dans la nature ; c'est pourquoi il est souvent appelé acide coumarique par abus de langage.

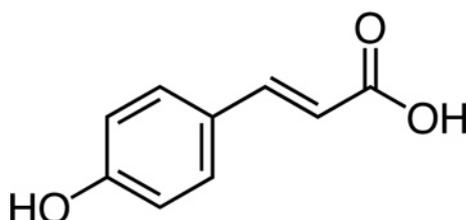
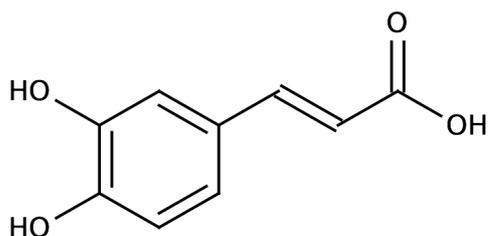


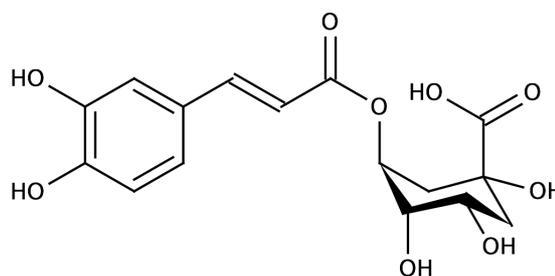
Figure 7 : Acide *p*-coumarique

### 2. Les acides caféoylquiniques

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique (Figure 8) a une répartition universelle chez les végétaux. On le trouve très souvent sous forme d'esters dont l'acide chlorogénique (ou 5-caféoylquinique) qui est le plus fréquemment rencontré (Figure 8) [10].



Acide caféique



Acide chlorogénique

Figure 8 : Acide caféique (à gauche) et acide chlorogénique (à droite)

Comme pour les autres polyphénols, l'acide caféique en tant qu'aglycone, n'est pas considéré comme un produit naturel de la pomme mais comme un produit de dégradation de l'acide chlorogénique et ses dérivés [14].

### 3. Caractéristiques spectrales

Les acides hydroxycinnamiques absorbent entre 310 et 325 nm. Cette absorption est due au noyau aromatique (*cinnamoyl system*) [15]. L'acide chlorogénique possède un spectre UV très caractéristique avec une  $\lambda_{\max}$  supérieure à 325 nm et un épaulement à une longueur d'onde inférieure à 310 nm ainsi qu'une masse moléculaire détectée à 353 m/z [M-H]<sup>-</sup>. L'acide caféique possède une  $\lambda_{\max}$  vers 220 nm et 325 nm et une masse moléculaire détectée à 179 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16-19]. Les acides *p*-coumariques, quant-à-eux, possèdent une  $\lambda_{\max}$  vers 312 nm [16]. Tous ces composés sont responsables (avec les caroténoïdes) de la coloration orange et rouge des végétaux.

### 4. Teneur

Les acides hydroxycinnamiques, avec l'acide chlorogénique comme composant majoritaire (79 à 87 %), sont présents dans les jus de pomme frais à des concentrations comprises entre 57 et 68 mg/l pour des pommes à dessert et entre 134 et 593 mg/l pour des pommes à cidre (respectivement 33-54 mg/l et 81-448 mg/l d'acide chlorogénique) [16, 20]. Ils représentent entre 4 et 18 % des polyphénols totaux de la pomme [21]. Les jus commerciaux ont des concentrations en acides hydroxycinnamiques comprises entre 69 et 259 mg/l [16] ce qui peut représenter de 50 à 70 % des polyphénols totaux du jus. L'acide chlorogénique est majoritairement trouvé dans la chair de toutes les pommes [16, 17, 20]. L'acide *p*-coumarique n'est en général présent qu'à l'état de traces [21].

Variété	Type d'échantillon	Acide chlorogénique		Acide caféique		Ref.
		Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	
<i>Golden Delicious</i>	Chair	40	mg/kg (frais)	/	/	[34]
		29-57	mg/kg (frais)	6-9	mg/kg (frais)	[17]
		153,6	mg/kg (frais)	/	/	[33]
		132	mg/kg (frais)	/	/	[18]
	Peau	40	mg/g (frais)	/	/	[34]
		149,0	mg/kg (frais)	/	/	[33]
		17-37	mg/kg (frais)	-	mg/kg (frais)	[17]
Jus	37,6	mg/l	4,8	mg/l	[16]	
<i>Red Delicious</i>	Chair	63-106	mg/kg (frais)	2	mg/kg (frais)	[17]
		125,0	mg/kg (frais)	/	/	[33]
	Peau	113-157	mg/kg (frais)	-	mg/kg (frais)	[17]
		44,6	mg/kg (frais)	/	/	[33]
	Jus	32,7	mg/l	6,1	mg/l	[16]
<i>Granny Smith</i>	Chair	28-71	mg/kg (frais)	4-5	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	6-60	mg/kg (frais)	10-14	mg/kg (frais)	[17]
	Jus	54,0	mg/l	3,8	mg/l	[16]
<i>Reineta</i>	Chair	266-357	mg/kg (frais)	9-11	mg/kg (frais)	[17]
<i>Reineta</i>	Peau	100-440	mg/kg (frais)	8-38	mg/kg (frais)	[17]
<i>Fuji</i>	Jus	54,1	mg/l	2,5	mg/l	[16]
<i>Brettacher</i>	Jus	448,2	mg/l	4,0	mg/l	[16]
<i>Bohnapfel</i>	Jus	305,3	mg/l	5,5	mg/l	[16]
<i>Douce Coët Ligné (cidre)</i>	Chair	1195	mg/kg (frais)	/	/	[18]
<i>Kermerrien (cidre)</i>	Chair	917	mg/kg (frais)	/	/	[18]
<i>Jonagold</i>	Jus	32	mg/l	-	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	54	mg/kg (sec)	-	mg/kg (sec)	[52]
commercial	Jus	130	mg/l	5,1	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	450	mg/kg (sec)	8,2	mg/kg (sec)	[52]

Tableau 2 : Teneur en acide chlorogénique et acide caféique dans la pomme et ses produits dérivés (- : non détecté ; / : non recherché)

## C. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandue dans le règne végétal. Elle compte à elle seule plusieurs milliers de molécules réparties en plus de 10 classes. En 2000, plus de 6400 structures étaient identifiées [10, 12, 22-24].

Le terme flavonoïde regroupe une large gamme de composés naturels polyphénoliques présentant un squelette carboné commun en C6-C3-C6 (squelette diphenylpropane). Les deux cycles aromatiques définissent les noyaux A et B. L'hétérocycle central, quand il est présent, est nommé C. On distingue différents noyaux qui permettent de les classer (Figure 9) : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, chalcones, etc. [22, 25, 26].

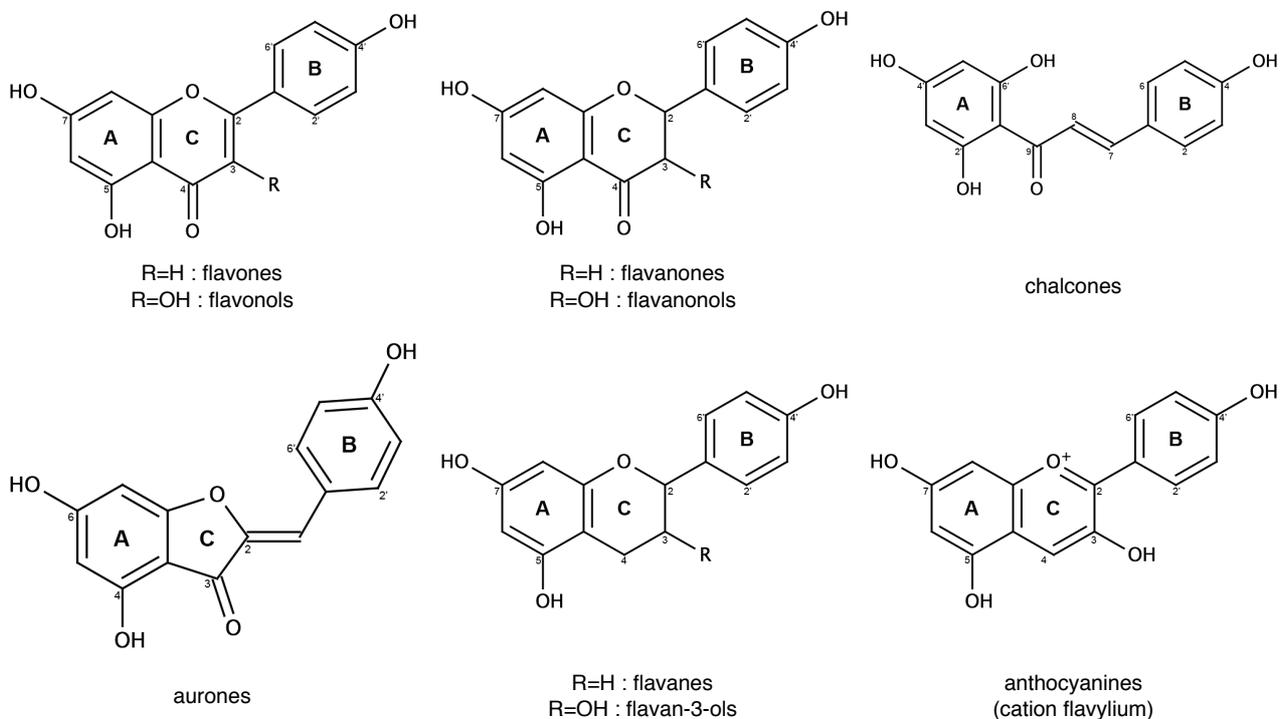


Figure 9 : Différentes structures de noyaux de flavonoïdes [12, 22, 23, 27, 28]

C'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de différencier les sous-classes de flavonoïdes [10]. Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle central correspond aux anthocyanines, toujours présentes en milieu acide sous forme d'un cation flavylum. Au contraire, dans le cas des flavanes (flavan-3-ols), le cycle central est fortement réduit. Exceptionnellement, le noyau central peut ne pas être totalement cyclisé, c'est notamment le cas des chalcones, ou bien se présenter sous forme d'un cycle à 5 sommets dans le cas des aurones.

À l'exception notamment des flavanes, presque tous les flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. Ils appartiennent ainsi à un grand groupe d'hétérosides dont le noyau phénolique représente l'aglycone. D'une manière générale, l'ose est lié au noyau par une liaison glycosidique C-O-C dégradable par hydrolyse acide à chaud (Figure 10) [10].

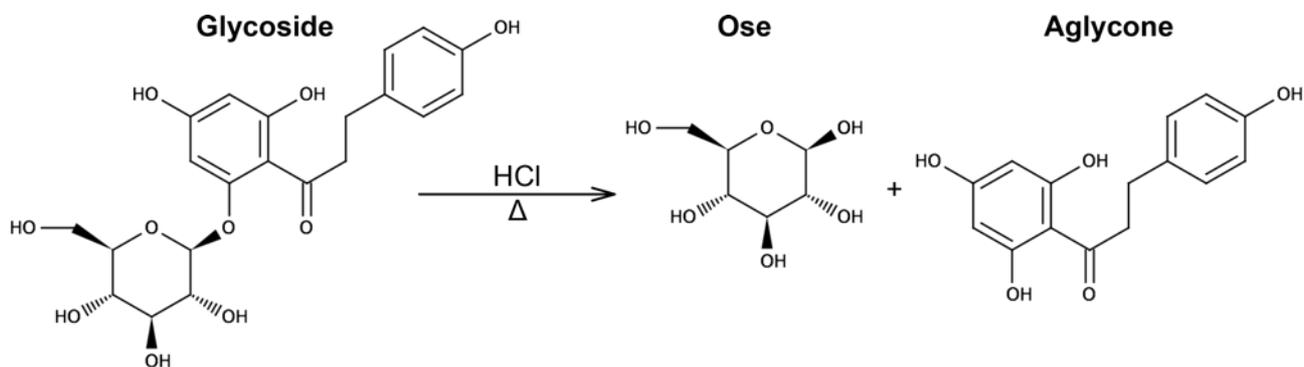


Figure 10 : Hydrolyse acide d'un glycoside

Les grandes différences de structure des flavonoïdes induisent des variations dans leurs propriétés physico-chimiques qui rendent leur étude commune difficile. Par exemple leurs solubilités varient grandement ce qui rend difficile une extraction de l'ensemble des composés phénoliques en une seule étape, mais cela permet leur séparation par HPLC [29].

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune. Leur structure 1,3-diphénylpropane à 15 carbones résulte de la condensation de 3 unités C2 (3 malonyl-CoA), qui forment le noyau A, et d'un acide cinnamique activé, qui forme le noyau B et la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase, enzyme clé de la formation des flavonoïdes qui conduit au précurseur « chalcone » (Figure 11) [22].

Les enzymes participant à la synthèse des flavonoïdes sont classées en trois catégories [30] :

- les enzymes impliquées dans la synthèse des précurseurs telles que la phénylalanine ammonia-lyase (PAL)
- les enzymes impliquées dans la synthèse des différentes classes de flavonoïdes telles que la chalcone isomérase (CHI)
- les enzymes responsables des modifications des flavonoïdes telles que la glycosyltransférase (UGT).

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

L'étape centrale de la synthèse des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec une molécule d'acide *p*-coumaroyl-CoA qui résulte en une chalcone intermédiaire à 15 carbones appelée naringenin-chalcone (retrouvée notamment dans les tomates [31]). Cette réaction est catalysée par la chalcone synthétase (CHS). Une transformation par l'action stéréospécifique de la chalcone isomérase (CHI) produit la (2S)-flavanone (naringenin). Cette réaction est commune à toutes les voies de synthèse des flavonoïdes. Enfin, la glucosyltransférase catalyse la réaction de glycosylation sur le cycle B.

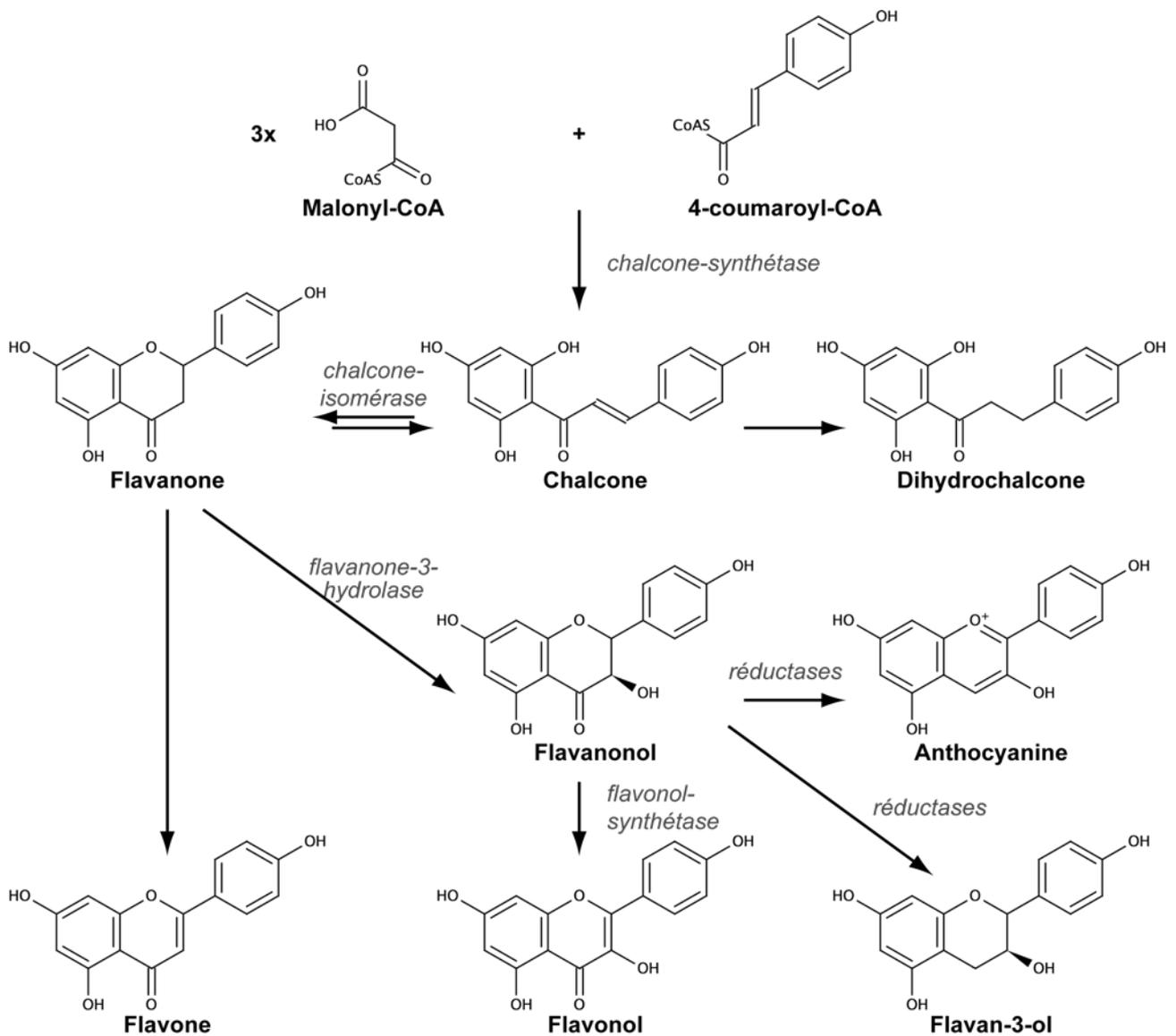


Figure 11 : Biosynthèse des flavonoïdes [22]

## 1. Flavanes (Flavan-3-ol)

Les flavanes possèdent plusieurs terminologies. Ainsi ils sont souvent appelés flavanols ou encore flavan-3-ols car ils possèdent un groupement hydroxyle en position 3 du cycle C (Figure 12). Ils se différencient des flavonols qui possèdent un groupement cétone sur le cycle C en position 4. Les flavanes comprennent les catéchines qui sont des flavan-3-ols monomériques ainsi que les procyanidines qui sont des flavan-3-ols polymériques [15]. Contrairement aux autres composés phénoliques, les flavan-3-ols ne sont pas présents sous forme glycosylée ou estérifiée.

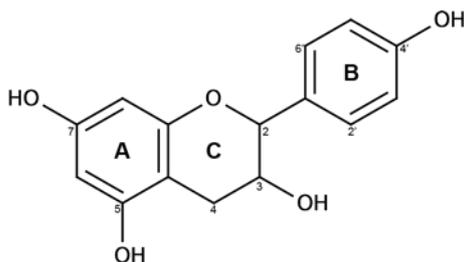


Figure 12 : Noyau des flavan-3-ols

### a) La catéchine

La catéchine existe en fait sous forme de quatre énantiomères (Figure 13) provenant de deux carbones asymétriques. Dans la nature, les isomères les plus fréquents sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine [20, 32]. Les concentrations en (-)-épicatéchine sont plus élevées que celles en (+)-catéchine, que ce soit dans les pommes, les jus ou les cidres. Cependant le rapport (-)-épicatéchine sur (+)-catéchine est très différent suivant les variétés [32].

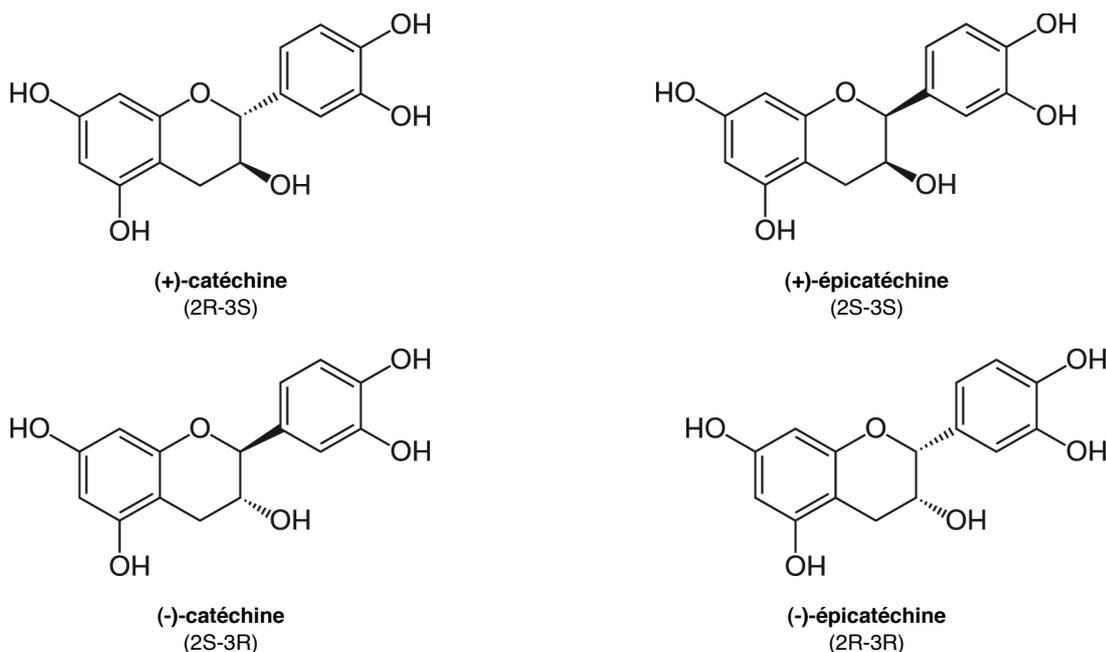


Figure 13 : Les 4 énantiomères de la catéchine

## b) Les procyanidines

Les procyanidines sont des formes oligomériques ou polymériques de monomères de (-)-épicatéchine et de (+)-catéchine. Ces produits de condensation sont aussi parfois appelés tanins condensés. Ils sont résistants à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Par exemple, un traitement acide à chaud les transforme en dimères et oligomères appelés proanthocyanidines. L'enchaînement des différentes sous-unités constitutives, soit de manière linéaire par des liaisons C-C, soit par les ramifications grâce à des liaisons C-O-C conduisent à des structures parfois complexes [10] (Figure 14). Les polymères sont caractérisés par leurs unités constitutives, leur nombre d'unités et le type de liaison entre ces unités [32].

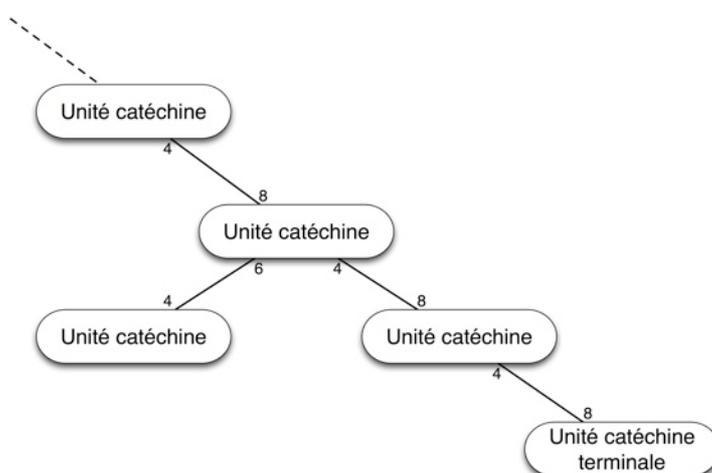
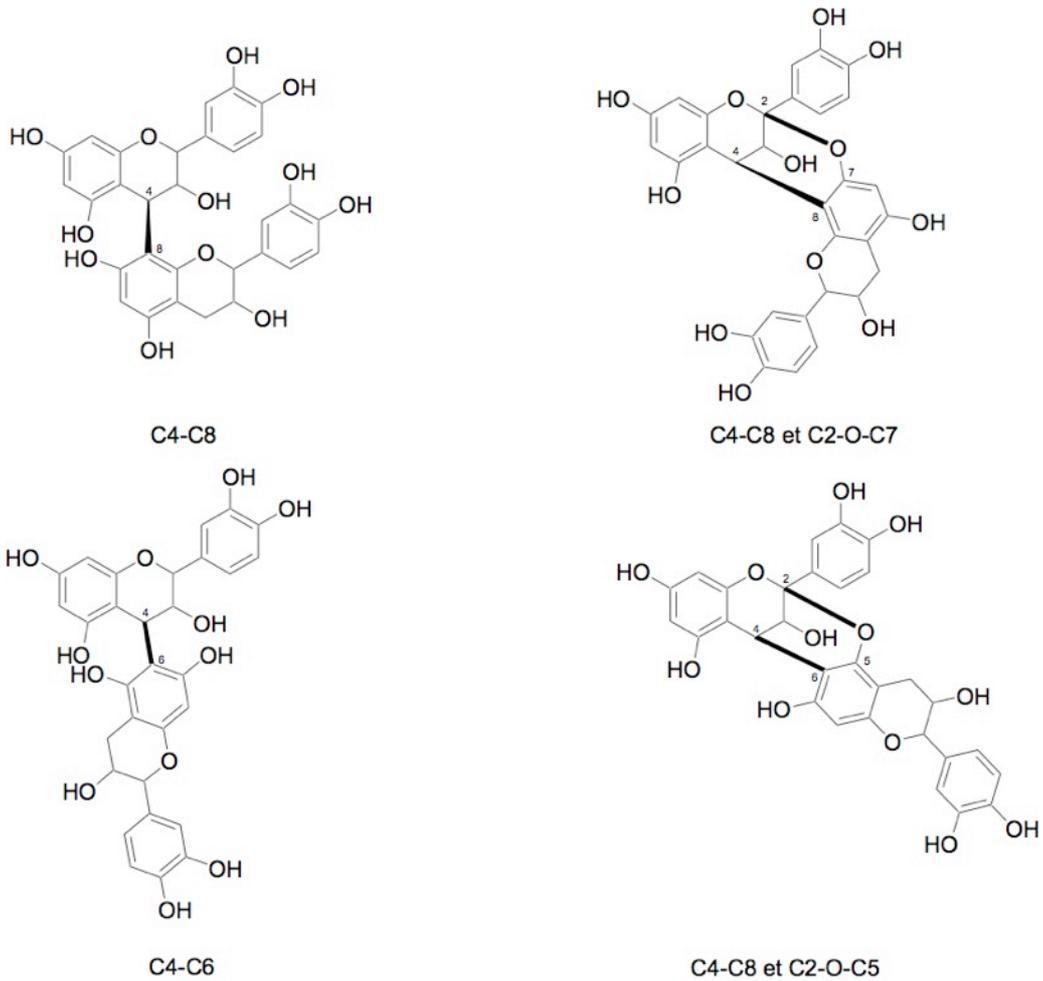


Figure 14 : Structure des tanins [20]

Dans la pomme, les procyanidines sont essentiellement constituées de (-)-épicatéchine, la (+)-catéchine étant généralement présente en tant qu'unité terminale. Le degré de polymérisation (DP) est le nombre d'unités monomères par molécule. Lors des étapes de séparation et de purification, les oligomères peuvent être obtenus sous forme de fractions de DP unique (contenant différents isomères) jusqu'à  $n=5$ . Pour des DP supérieurs, il s'agit de fractions qui contiennent des molécules de DP différents. Le nombre d'unités est alors quantifié en nombre moyen d'unités ou degré moyen de polymérisation en nombre,  $DP_n$ . Celui-ci varie en général de 4,2 à 7,5 mais peut atteindre 40 ou 50 pour certaines variétés de pommes à cidre [18, 20].

Les procyanidines oligomériques (DP 2-5) contribuent au goût amer tandis que les polymérisées (DP 6-10) donnent un goût plus astringent car ils interagissent avec les protéines de la salive de façon proportionnelle à leur degré de polymérisation [18, 20].

Les liaisons entre unités flavan-3-ols peuvent être de type B (liaison carbone-carbone) ou de type A (liaison carbone-carbone et liaison éther ou carbone-oxygène-carbone) (Figure 15).



Liaison interflavanique de type B

Liaison interflavanique de type A

Figure 15 : Différents types de liaisons interflavaniques [25]

Dans la pomme, seules les liaisons de type B ont été décrites [18, 32]. La forme la plus connue et la plus abondante dans la pomme est la procyanidine B2 (Figure 16) qui est un dimère (-)-épicatéchine C4 → C8 (-)-épicatéchine.

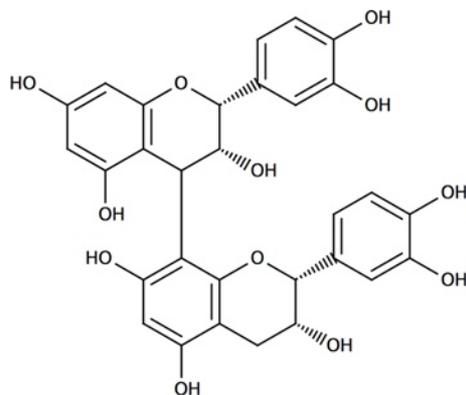


Figure 16 : Procyanidine B2

### c) Caractéristiques spectrales

Les flavanes présentent une bande d'absorption intense entre 275 et 285 nm. Ils se distinguent des flavonols par l'absence de bande d'absorption entre 300 et 380 nm. Cette deuxième bande d'absorption est absente car les molécules ne présentent pas de mésomérie entre le cycle A et le cycle B comme c'est le cas pour les flavonols [15].

La catéchine et l'épicatéchine présentent une  $\lambda_{\max}$  entre 277 et 280 nm et une masse moléculaire de 290 Da détectée à 291 m/z [M+H]<sup>+</sup> et 289 m/z [M-H]<sup>-</sup> [10, 15, 16, 19, 33]. La procyanidine B2 se différencie des autres composés par une masse moléculaire de 577 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16, 17].

### d) Teneur

Selon les études, les flavan-3-ols sont désormais considérés comme les composés phénoliques majeurs dans la peau et la chair de la pomme [20, 33, 34], remplaçant à ce titre les acides hydroxycinnamiques [16, 35]. En effet, une simple extraction au méthanol ne permet pas d'extraire les procyanidines les plus polymérisées et ces études ne mesurent donc pas leur teneur. De plus la concentration en flavan-3-ols est souvent sous-estimée car seuls les dimères et les trimères sont quantifiés car ils donnent des pics bien résolus [36]. Les procyanidines peuvent représenter jusqu'à 75 % des polyphénols dans la peau et la chair et jusqu'à 65 % des polyphénols totaux de la pomme [18, 20]. Ils peuvent même représenter jusqu'à 90 % des polyphénols dans la pomme *Granny Smith* [21]. Dans le cortex, les teneurs en procyanidines sont comprises entre 0,5 et 4,7 g/kg [18]. Les teneurs en flavan-3-ols sont de l'ordre de 50 à 95 mg/l dans les jus de pommes à dessert et de 70 à 393 mg/l dans ceux de pommes à cidre [16]. Les teneurs en flavanes et leur degré de polymérisation suivent un gradient croissant du cortex vers l'épiderme de la pomme. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet anti-fongique protecteur de ces molécules [20]. Dans le jus, les formes polymérisées ne sont pas dosées car elles n'y sont pas dissoutes. En effet, elles s'associent à des composés insolubles pendant le procédé de pressage des jus. Cependant ces formes polymérisées sont solubles dans l'eau à température ambiante quand elles sont purifiées [18].

Variété	Type d'échantillon	(+)-catéchine		(-)-épicatéchine		Procyanidine B2		Ref
		Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	
<i>Golden Delicious</i>	Chair	/	/	40	mg/kg (frais)	60	mg/kg (frais)	[34]
	Chair	1,1	mg/kg (frais)	65,8	mg/kg (frais)	121,4	mg/kg (frais)	[33]
	Chair	28-49	mg/kg (frais)	19-34	mg/kg (frais)	23-32	mg/kg (frais)	[17]
	Chair	14	mg/kg (frais)	88	mg/kg (frais)	761	mg/kg (frais)	[18]
	Peau	/	/	210	mg/kg (frais)	200	mg/kg (frais)	[34]
		66-164	mg/kg (frais)	82-168	mg/kg (frais)	69-166	mg/kg (frais)	[17]
		38,1	mg/kg (frais)	207,2	mg/kg (frais)	276,8	mg/kg (frais)	[33]
Jus	3,8	mg/l	46,6	mg/l	38,7	mg/l	[16]	
<i>Red Delicious</i>	Chair	25,4	mg/kg (frais)	122,5	mg/kg (frais)	122,3	mg/kg (frais)	[33]
		44-70	mg/kg (frais)	36-59	mg/kg (frais)	34-54	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	297-445	mg/kg (frais)	248-481	mg/kg (frais)	433-659	mg/kg (frais)	[17]
		81,9	mg/kg (frais)	591,6	mg/kg (frais)	468,1	mg/kg (frais)	[33]
	Jus	3,2	mg/l	51,4	mg/l	36,9	mg/l	[16]
<i>Granny Smith</i>	Chair	136-182	mg/kg (frais)	71-97	mg/kg (frais)	97-105	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	374-486	mg/kg (frais)	246-312	mg/kg (frais)	558-574	mg/kg (frais)	[17]
	Jus	2,5	mg/l	15,1	mg/l	29,6	mg/l	[16]
<i>Reineta</i>	Chair	113-136	mg/kg (frais)	91-111	mg/kg (frais)	82-94	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	22-460	mg/kg (frais)	238-439	mg/kg (frais)	388-581	mg/kg (frais)	[17]
<i>Douce Coët Ligné (cidre)</i>	Chair	117	mg/kg (frais)	376	mg/kg (frais)	1499	mg/kg (frais)	[18]
<i>Kermerrien (cidre)</i>	Chair	45	mg/kg (frais)	434	mg/kg (frais)	2932	mg/kg (frais)	[18]
<i>Fuji</i>	Jus	7,0	mg/l	36,6	mg/l	42,5	mg/l	[16]
<i>Brettacher</i>	Jus	3,0	mg/l	29,8	mg/l	34,2	mg/l	[16]
<i>Bohnapfel</i>	Jus	12,0	mg/l	66,8	mg/l	36,8	mg/l	[16]
<i>Jonagold</i>	Jus	-	mg/l	5,4	mg/l	0,6	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	9,4	mg/kg (sec)	190	mg/kg (sec)	160	mg/kg (sec)	[52]
commercial	Jus	3,5	mg/l	12	mg/l	9,1	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	14	mg/kg (sec)	77	mg/kg (sec)	47	mg/kg (sec)	[52]

Tableau 3 : Teneur en (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et procyanidine B2 dans la pomme et ses produits dérivés (- : non détecté ; / : non recherché)

## 2. Flavonols

Les flavonols sont des flavonoïdes qui possèdent une double liaison entre les carbones 2 et 3, une fonction hydroxyle en position 3 et une fonction cétone en position 4 (Figure 17). Ils se différencient des flavones qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle. Il ne faut pas non plus les confondre avec les flavanonols qui présentent une liaison saturée entre les carbones 2 et 3 de ce même cycle C.

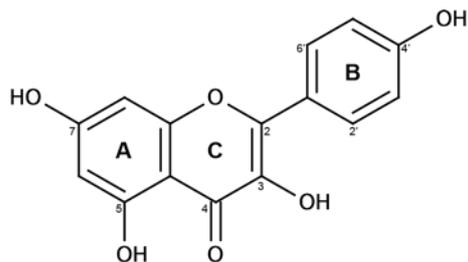


Figure 17 : Noyau des flavonols

Les flavonols sont représentés essentiellement par les dérivés de la quercétine dans la pomme et sont retrouvés exclusivement dans la peau et les pépins [18, 34].

### a) La quercétine

Les glycosides de la quercétine sont les flavonoïdes les plus abondants dans les fruits et légumes de l'alimentation [11, 31]. La quercétine, de formule  $C_{15}H_{10}O_7$  (302,24 g/mol) est une poudre jaune (Figure 18). Sa couleur participe fortement à la coloration des pommes [20].

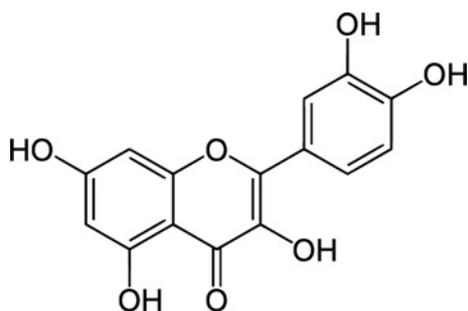


Figure 18 : Quercétine

De nombreux glycosides de la quercétine sont trouvés dans la peau de pomme tels que la quercétine-3-O-galactoside (hyperoside), quercétine-3-O-glucoside (isoquercitrine), quercétine-3-O-rhamnosidglucoside (rutine ou quercétine-3-O-rutinoside), quercétine-3-O-arabinofuranoside (avicularine), quercétine-3-O-rhamnoside (quercitrine) [15] (Figure 19).

Nom	R	Formule
Quercétine	H	
Quercitrine	rhamnosyl	
Hyperoside	galactosyl	
Isoquercitrine	glucosyl	
Rutine	rhamnosyl-glucosyl	
Avicularine	arabinosyl	

Figure 19 : Quelques glycosides de la quercétine

## b) L'isorhamnétine

Des glycosides de l'isorhamnétine (Figure 20) ont été détectés pour la première fois dans les pelures de pomme en 2002 [37]. A cette époque, seuls deux glycosides, l'isorhamnétine-3-O-glucoside et certainement l'isorhamnétine-2-O-galactoside ont été découverts. Depuis, d'autres glycosides ont été mis en évidence tels que l'isorhamnétine-2-O-glucoside et l'isorhamnétine-2-O-rhamnoglucoside [15].

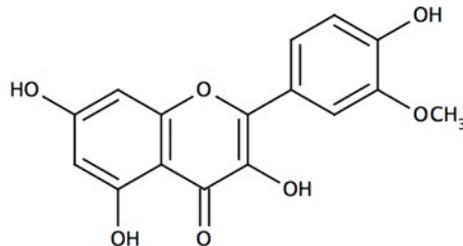


Figure 20 : Isorhamnétine

## c) Caractéristiques spectrales

Les flavonols possèdent deux bandes majeures d'absorption entre 240 et 400 nm. La bande I (300-380 nm) et la bande II (240-280 nm). La première est due au noyau B (*cinnamoyl system*) tandis que la deuxième est due au noyau A (*benzoyl system*) [22]. Les flavonols qui possèdent une substitution sur le 3-hydroxyle du cycle C (méthylation ou glycosylation) voient la bande I déplacée vers les longueurs d'ondes de 328 à 357 nm [15].

La quercétine et tous ses glycosides présentent un même spectre UV avec deux maxima d'absorption à 350 nm et 256 nm [10, 17, 19, 29, 37]. La masse moléculaire de l'aglycone quercétine est de 302 Da détectée à 301 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16] et 303 [M+H]<sup>+</sup> [15]. Les masses moléculaires des glycosides varient entre 433 et 463 Da [16, 37].

## d) Teneur

Les glycosides de la quercétine ne sont présents que dans la peau des pommes [15, 17] et ne sont par conséquent pas retrouvés, ou alors qu'en très faible concentration, dans les jus [16, 38]. Ils représentent 1 à 11 % des polyphénols totaux dans la pomme [21]. Leur présence varie de 0,4 à 4 mg/l dans les jus de pommes à dessert et de 0,4 à 27 mg/l dans ceux issus de pommes à cidre [16].

Variété	Type d'échantillon	galactoside		glucoside		xyloside		arabinoside		rhamnoside		Ref
		Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	
Golden Delicious	Peau	290	mg/kg (frais)	70	mg/kg (frais)	100	mg/kg (frais)	130	mg/kg (frais)	230	mg/kg (frais)	[34]
		72,5	mg/kg (frais)	24,9	mg/kg (frais)	20,3	mg/kg (frais)	43,5	mg/kg (frais)	59,1	mg/kg (frais)	[33]
	Jus	+	mg/l	+	mg/l	+	mg/l	+	mg/l	1,6	mg/l	[16]
Red Delicious	Peau	90,1	mg/kg (frais)	15,2	mg/kg (frais)	37,1	mg/kg (frais)	69,4	mg/kg (frais)	32,3	mg/kg (frais)	[33]
Brettacher	Jus	2,9	mg/l	+	mg/l	4,7	mg/l	0,9	mg/l	2,8	mg/l	[16]
Bohnapfel	Jus	7,1	mg/l	1,9	mg/l	4,1	mg/l	4,9	mg/l	4,6	mg/l	[16]
Jonagold	Jus	0,7	mg/l	0,3	mg/l	0,4	mg/l	/	/	3,5	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	210	mg/kg (sec)	31	mg/kg (sec)	100	mg/kg (sec)	/	/	340	mg/kg (sec)	[52]
commercial	Jus	1,5	mg/l	1,0	mg/l	0,9	mg/l	/	/	3,4	mg/l	[52]
	Résidu de pressage	360	mg/kg (sec)	130	mg/kg (sec)	160	mg/kg (sec)	/	/	230	mg/kg (sec)	[52]

Tableau 4 : Teneur en quercétine-galactoside, -glucoside, -xyloside, -arabinoside et -rhamnoside dans la pomme et ses produits dérivés (+ : détecté mais non quantifiable ; / : non recherché)

### 3. Les anthocyanines

Les anthocyanines, ou anthocyanes, sont des flavonoïdes dont le cycle C est entièrement conjugué et possède une fonction hydroxyle en position 3 (Figure 21).

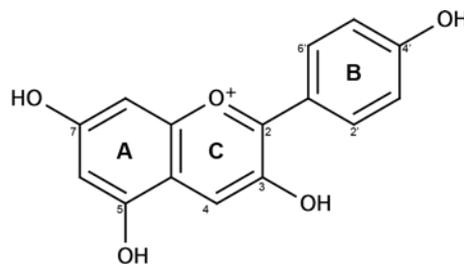


Figure 21 : Noyau des anthocyanines

Le noyau des anthocyanines est responsable de la coloration de la majorité des fruits dans lesquels seuls des glycosides sont présents et sont appelés anthocyanidines. On en trouve de couleur orange, rouge, violet et même bleu. La couleur d'une même molécule peut varier selon le pH qui en modifie la conformation (Figure 22) [10, 39].

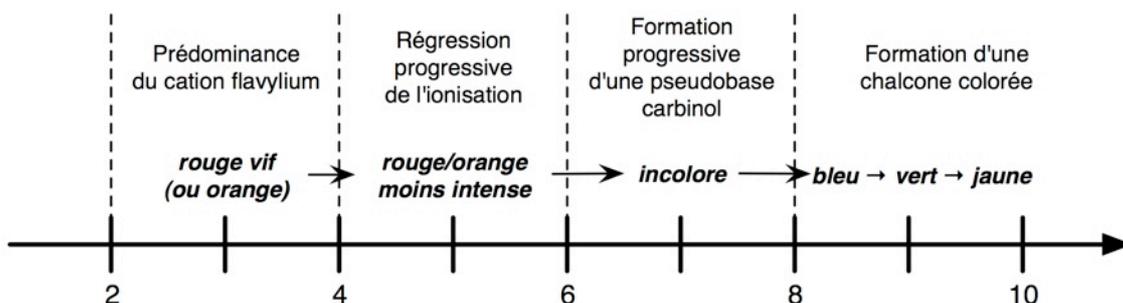


Figure 22 : Variation de la couleur des anthocyanines avec le pH [10]

Les anthocyanes et la cyanidine en particulier sont utilisées comme colorant alimentaire portant les codes E163a à E163f. Elles peuvent apporter une couleur rouge, bleu ou violette. Aucune dose journalière admissible (D.J.A. en mg/kg m.c) n'a été donnée pour ces composés.

### a) La cyanidine

La cyanidine (Figure 23) de formule  $C_{15}H_{11}O_6^+$  (287,24 g/mol) est le polyphénol responsable de la couleur rouge des pommes comme par exemple les *Red Delicious*. La cyanidine est trouvée sous forme de glycosides uniquement dans la peau des pommes [10].

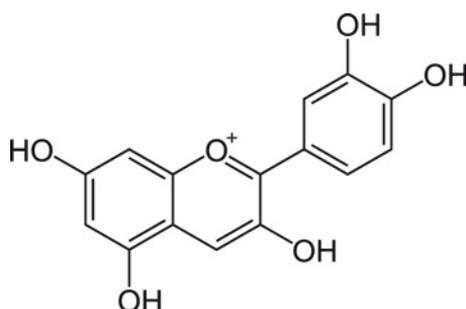


Figure 23 : Cyanidine

### b) Caractéristiques spectrales

Les anthocyanines possèdent deux bandes principales d'absorption. La première entre 275 et 285 nm et la seconde entre 520 et 545 nm [10, 15]. La masse moléculaire de l'aglycone cyanidine est détectée à 287 m/z  $[M+H]^+$  [15].

### c) Teneur

Dans la peau des pommes rouges, les anthocyanines représentent de 1 à 3 % des polyphénols totaux. Cependant, les variations peuvent être très importantes au sein d'une même variété. Le glycoside majoritaire est la cyanidine-3-galactoside tandis que la cyanidine-3-arabinoside et la cyanidine-3-xyloside sont retrouvées à des concentrations beaucoup plus faibles. Enfin, la cyanidine-3-glucoside et la cyanidine-7-arabinoside ont aussi été décrites sans pouvoir être quantifiées [21].

Variété	Type d'échantillon	cyanidine-3-galactoside		Ref
		Moyenne	Unités	
<i>Red Delicious</i>	Peau	148,9	mg/kg (frais)	[33]
<i>Golden Delicious</i>	Peau	-	mg/kg (frais)	[33]

Tableau 5 : Teneur en cyanidine-3-galactoside dans la pomme et ses produits dérivés (- : non détecté)

## 4. Les chalcones et dihydrochalcones

Les chalcones représentent un précurseur de la voie de synthèse des flavonoïdes. Ils résultent de la condensation de 3 malonyl-CoA et d'un acide cinnamique. De ce fait, les chalcones sont les seuls flavonoïdes ne comportant pas de noyau C car la fermeture de ce cycle intervient plus tard dans la voie de synthèse [22].

On distingue les chalcones qui ont une insaturation et les dihydrochalcones dont la chaîne est saturée. Du fait de l'insaturation sur la chaîne des chalcones, on différencie encore les formes *cis* et *trans* respectivement appelées chalcones et rétrochalcones (Figure 24) [22].

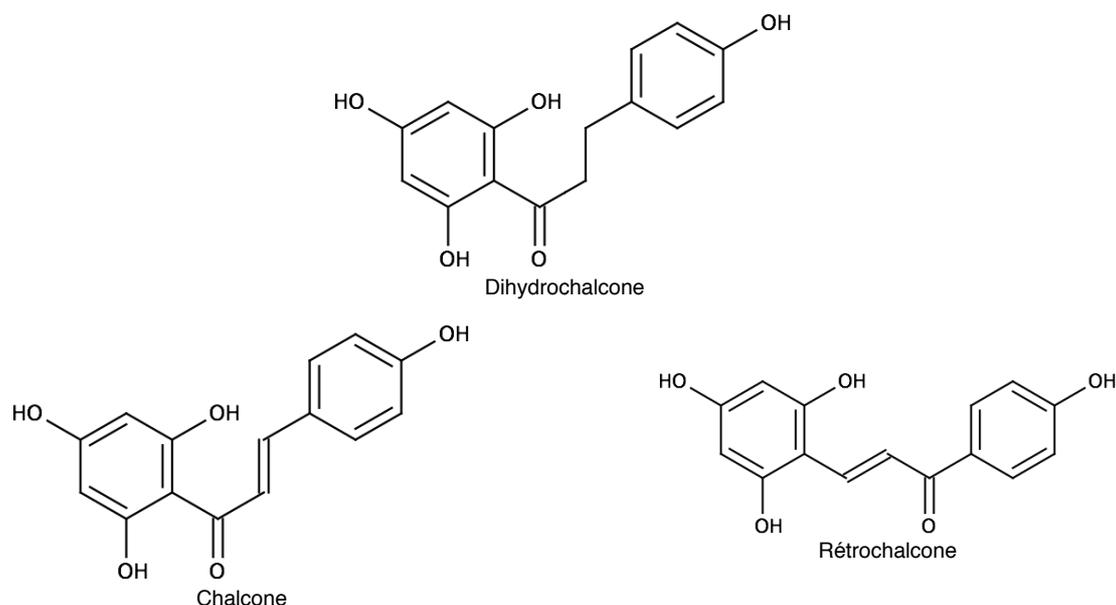


Figure 24 : Structure d'une dihydrochalcone, d'une chalcone et d'une rétrochalcone [22]

### a) La Phlorétine et ses glycosides

#### (1) La phlorétine

De formule  $C_{15}H_{14}O_5$  (274,27 g/mol), la phlorétine ou 2',4',6'-trihydroxy-3-p-hydroxyphénylpropiophénone ou 2',4',6',4-tétrahydroxydihydrochalcone est une molécule connue depuis de nombreuses années (Figure 25). Elle a été identifiée dans la pomme, et sa structure a été caractérisée, dès les années 1970-80 [14, 40]. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol et l'éthanol. La phlorétine aurait une action fongicide protectrice pour l'arbre fruitier [41].

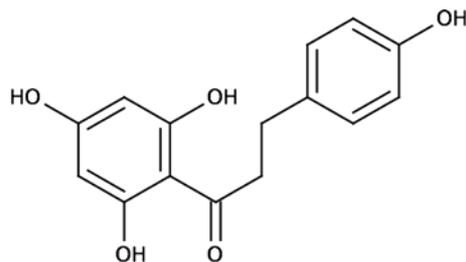


Figure 25 : Phlorétine

Comme les autres composés phénoliques, la phlorétine n'est pas trouvée sous cette forme dans la pomme mais seulement sous la forme de glycosides.

## (2) La phlorétine-2'-O-glucoside (phloridzine ou phlorizine)

De formule  $C_{21}H_{24}O_{10}$  (436,42 g/mol), la phlorizine, ou phlorétine-2'-O- $\beta$ -D-glucopyranose ou 2'-O-glucosyl-4',6',4-trihydroxydihydrochalcone, est le glycoside de la phlorétine le plus connu (Figure 26). En effet, il s'agit du noyau phlorétine auquel est lié un glucose par une liaison glycosidique sur la fonction hydroxyle de carbone 2' du noyau A. Bien qu'isolée depuis 1835 par des chimistes français à partir d'écorces de pommier et décrite dans des ouvrages de chimie donnant des méthodes de purification et dans l'indice Merck dès 1887 [42-44], sa structure n'a été définitivement établie qu'en 1993 par spectroscopie de RMN [45].

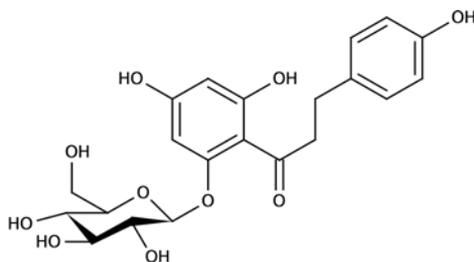


Figure 26 : Phlorizine

Jusqu'à récemment, on la croyait spécifique des pommes [46] et on a cru que l'on pouvait utiliser la phlorizine comme marqueur de la pomme dans les aliments. Cependant une étude a démontré leur présence, en faible quantité, dans la fraise (*Fragaria cananassa Duch., Rosaceae*) [47]. De plus, il semblerait qu'elle soit aussi présente dans les cynorrhodons (fruits de l'églantier, *Rosa canina L., Rosaceae*) [48]. Enfin, sa présence a aussi été mise en évidence dans une plante taïwanaise, *Malus doumeri* var. *formosana* (*Rosaceae*) [49].

### (3) La phlorétine-2'-xyloglucoside

De formule  $C_{26}H_{32}O_{14}$  (568 g/mol), la phlorétine-2'-xyloglucoside, ou phlorétine-2'-*O*-( $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranose) est un autre glycoside de la phlorétine (Figure 27). Il s'agit du noyau phlorétine auquel est lié un disaccharide xylose-glucose [14, 15]. Le disaccharide est lié à l'aglycone par le glucose [33, 50].

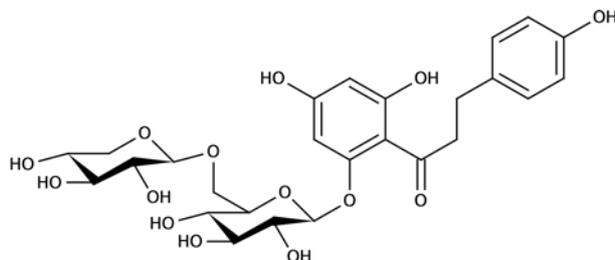


Figure 27 : Phlorétine-2'-xyloglucoside

## b) L'hydroxyphlorétine et ses glycosides

### (1) L'hydroxyphlorétine

Le noyau 3-hydroxyphlorétine a été découvert et identifié plus récemment, en 1996 [14]. Il est identique au noyau phlorétine mais comporte une fonction hydroxyle supplémentaire en position 3 sur le cycle B (Figure 28) . Il a été isolé à partir de résidu de pressage (pomace) qui a des teneurs très importantes en polyphénols. Par la suite, la même équipe de chercheurs l'a aussi détecté dans les pépins de pomme [51]. Il a désormais été identifié dans les pépins, le résidu de pressage et la peau de pomme [14, 15, 21, 33, 36, 51].

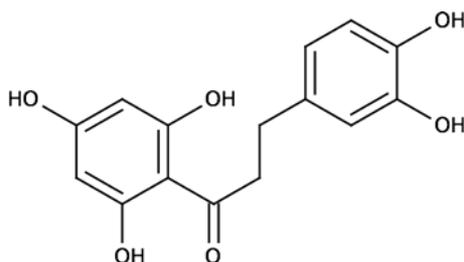


Figure 28 : Hydroxyphlorétine



### **c) Caractéristiques spectrales**

La phlorétine possède un maximum d'absorption en UV à 286 nm et une masse moléculaire de 273 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16].

Le spectre UV de la phlorizine présente un maximum d'absorption UV vers 283 nm et 220 nm [16, 17, 19, 29]. Par spectrométrie de masse, l'ion moléculaire est retrouvé à 435 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16, 18] (437 m/z [M+H]<sup>+</sup> [15, 21]) et un pic majoritaire à 273 m/z [M-H]<sup>-</sup> correspondant à l'aglycone phlorétine par la perte du sucre [16, 18].

La phlorétine-2'-xyloglucoside possède un maximum d'absorption en UV à 282 nm [17]. Par spectrométrie de masse, l'ion moléculaire est retrouvé à 567 m/z [M-H]<sup>-</sup> [16, 18] (569 m/z [M+H]<sup>+</sup> [15, 21]) et un pic majoritaire à 273 m/z [16, 18, 33, 50] correspondant à l'aglycone phlorétine par la perte des sucres.

L'hydroxyphlorizine est identifiée par spectroscopie de masse par son ion moléculaire détecté à 451 m/z [M-H]<sup>-</sup> et 453 m/z [M+H]<sup>+</sup> et un ion majoritaire à 289 m/z [M-H]<sup>-</sup> 291 m/z [M+H]<sup>+</sup> [14, 21, 33].

L'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside est identifiée par spectroscopie de masse par son ion moléculaire à 583 m/z [M-H]<sup>-</sup> [33] et 585 m/z [M+H]<sup>+</sup> [21] et un ion majoritaire à 289 m/z [M-H-xyloglucose]<sup>-</sup> et 291 m/z [M+H-xyloglucose]<sup>+</sup> ainsi qu'un ion à 289 m/z [M-H-xylose]<sup>-</sup> .

Dans certains cas, les échantillons sont soumis à une hydrolyse des fonctions thiols (thiolysis) afin de déterminer le degré de polymérisation des procyanidines. Cette étape provoque la transformation de la phlorizine et de la phlorétine-2'-xyloglucoside en phlorétine. C'est à dire à la perte des sucres [18].

### **d) Teneur**

Les dihydrochalcones sont une classe mineure puisqu'ils représentent 1 à 5 % des polyphénols totaux de la pomme [18, 27]. Les glycosides de la phlorétine et l'hydroxyphlorétine ont été identifiés dans toutes les variétés de pomme à cidre Basque (31 variétés) [36]

Les pommes Kermerrien ont une teneur de 169 mg/kg qui se répartit de la manière suivante : 30 mg/kg dans les graines, 67 mg/kg dans le cortex, 46 mg/kg dans le parenchyme, 24 mg/kg dans l'épiderme. Dans les pépins, ils peuvent représenter jusqu'à 66 % des polyphénols alors qu'ils ne représentent que 3 % des polyphénols du parenchyme et de l'épiderme et entre 2 et 6 % des polyphénols totaux de la pomme [20, 21]. Dans les jus de pomme à dessert, ils sont trouvés à des teneurs de 10 à 35 mg/l pour les pommes à dessert et 34 à 171 mg/l pour les pommes à

cidre [16]. L'hydroxyphlorizine, dont aucun standard n'est commercialisé, est de ce fait très rarement dosée même si elle a été identifiée dans de nombreuses études récentes [33, 47]. Sa concentration, beaucoup plus faible que les glycosides de la phlorétine, est de 40 mg/kg de matière sèche dans la pomme *Gala* pelée et de 270 mg/kg dans le pomace frais de ces mêmes pommes [14]. Dans la pulpe, l'hydroxyphlorizine et l'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside ne sont pas détectées mais elles sont retrouvées à des concentrations de 6,4 et 7,7 mg/kg dans la peau de *Golden* [33]. Les dihydrochalcones sont donc réparties de façon non homogène dans le fruit et les teneurs sont très variables selon le type de pomme.

Variété	Type d'échantillon	Phlorizine		Phlorétine-2'-xyloglucoside		Ref
		Moyenne	Unités	Moyenne	Unités	
<i>Golden Delicious</i>	Chair	10	mg/kg (frais)	20	mg/kg (frais)	[34]
		17,9	mg/kg (frais)	7,5	mg/kg (frais)	[33]
		4-8	mg/kg (frais)	5-8	mg/kg (frais)	[17]
		15	mg/kg (frais)	11	mg/kg (frais)	[18]
	Peau	150	mg/kg (frais)	130	mg/kg (frais)	[34]
		67,5	mg/kg (frais)	79,4	mg/kg (frais)	[33]
		31-71	mg/kg (frais)	58-71	mg/kg (frais)	[17]
Jus	4,1	mg/l	7,6	mg/l	[16]	
<i>Red Delicious</i>	Chair	24,6	mg/kg (frais)	3,3	mg/kg (frais)	[33]
		13-14	mg/kg (frais)	2-4	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	172,0	mg/kg (frais)	51,2	mg/kg (frais)	[33]
		104-159	mg/kg (frais)	61-122	mg/kg (frais)	[17]
	Jus	7,1	mg/l	2,7	mg/l	[16]
<i>Granny Smith</i>	Chair	5	mg/kg (frais)	7	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	12	mg/kg (frais)	29-31	mg/kg (frais)	[17]
	Jus	9,3	mg/l	25,9	mg/l	[16]
<i>Reineta</i>	Chair	16-20	mg/kg (frais)	19-21	mg/kg (frais)	[17]
	Peau	83-418	mg/kg (frais)	53-100	mg/kg (frais)	[17]
<i>Douce Coët Ligné</i> (cidre)	Chair	68	mg/kg (frais)	98	mg/kg (frais)	[18]
<i>Kermerrien</i> (cidre)	Chair	48	mg/kg (frais)	35	mg/kg (frais)	[18]
<i>Fuji</i>	Jus	8,5	mg/l	7,2	mg/l	[16]
<i>Brettacher</i>	Jus	93,6	mg/l	63,2	mg/l	[16]
<i>Bohnapfel</i>	Jus	35,1	mg/l	135,9	mg/l	[16]
<i>Jonagold</i>	Jus	4,9	mg/l	/	/	[52]
	Résidu de pressage	350	mg/kg (sec)	/	/	[52]
commercial	Jus	24	mg/l	/	/	[52]
	Résidu de pressage	910	mg/kg (sec)	/	/	[52]
industriel	Résidu de pressage	1420	mg/kg (frais)	170	mg/kg (frais)	[14]

Tableau 6 : Teneur en phlorizine et phlorétine-2'-xyloglucoside dans la pomme et ses produits dérivés (- : non détecté ; / : non recherché)

### **III. Identification des dihydrochalcones, revue bibliographique**

La littérature est très prolifique concernant les composés phénoliques de la pomme, leur identification, leur dosage, leur évolution au cours de la maturation du fruit, etc. Dans le but de faire un tour de l'état des connaissances, cette partie s'attardera le plus possible aux études et aux résultats concernant les dihydrochalcones afin d'être plus accessible et synthétique.

#### **A. Méthodes d'analyse**

Les composés phénoliques de la pomme sont des composés très sensibles. Ils sont facilement hydrolysés et oxydés. Leur analyse nécessite de prendre des précautions afin de limiter les artefacts lors de l'analyse des résultats [13]. Comme le fait justement remarquer Escarpa [19], il existe tant de variations dans les méthodes d'analyse utilisées par les différents auteurs travaillant sur les polyphénols que les recouvrements des résultats sont très difficiles. Bien que le procédé de préparation soit assez homogène, les méthodes d'extraction et de séparation peuvent varier très fortement. Cette partie tentera de donner une vue d'ensemble des méthodes d'analyse utilisées le plus couramment.

##### **1. Préparation des échantillons**

Etant donnée la sensibilité des composés phénoliques, l'utilisation d'antioxydants tel que l'acide ascorbique (vitamine C) ou le travail sous atmosphère inerte peut permettre de limiter l'oxydation des composés [13]. Les échantillons de pomme sont le plus souvent lyophilisés, afin d'éliminer l'eau, puis broyés, ce qui améliore sensiblement l'extraction par des solvants organiques [11, 14, 15]. Quand il s'agit de jus ou de cidre, aucun prétraitement ni extraction ne sont nécessaires. En effet, il suffit de filtrer ces échantillons avant de les injecter directement en HPLC.

##### **2. Extraction**

Afin d'extraire les composés phénoliques d'échantillons préalablement lyophilisés, beaucoup de mélanges de solvants organiques sont décrits dans la littérature. Dans tous les cas, l'extraction se fait au bain à ultrasons mais encore une fois, la durée d'extraction peut varier de 10 à 60 minutes selon les publications. On ne retrouve jamais d'étude comparative des rendements d'extraction en fonction des temps d'extraction.

Le mélange de solvants le plus courant est un mélange méthanol/eau (entre 60:40 et 80:20) [15, 29, 31, 33, 52] mais ce rapport peut varier grandement selon les études. Souvent, un acide faible est ajouté en petite quantité, tel que l'acide acétique entre 0,5 et 1 % [11, 15, 31]. Les conclusions quant à l'effet des variations de composition du solvant sur le rendement d'extraction des composés phénoliques sont très incohérentes. Il semble que la méthode d'analyse consécutive à l'extraction influe en grande part sur la qualité des résultats et des conclusions qui en sont tirées. En effet, de nombreuses publications dosent les composés phénoliques à partir de chromatogrammes qui ne sont pas exploitables quantitativement, tant les pics ne sont pas résolus.

Le choix du solvant est évidemment une étape cruciale dans l'analyse des composés phénoliques. Il influe sur le rendement d'extraction mais aussi sur le protocole analytique. En effet, l'utilisation d'eau induit une seconde étape de lyophilisation ou d'évaporation à sec afin de pouvoir concentrer au mieux les composés phénoliques présents en petite quantité. Certains auteurs préfèrent des solutions à 50 % de méthanol [26] et d'autres utilisent uniquement du méthanol pour leurs extractions [20]. Enfin, il arrive parfois que l'acétone soit préférée au méthanol [14, 21].

Durant les études d'optimisation de l'extraction des dihydrochalcones, il a été démontré que les quantités de phlorétine-2'-xyloglucoside et phlorizine extraites de la chair étaient supérieures en utilisant une solution de méthanol acidifiée plutôt qu'une solution méthanol/eau. L'inverse se passe avec l'hydroxyphlorizine et l'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside [15]. De plus, il semblerait que le méthanol ait une action inhibitrice sur la polyphénoloxydase (PPO), enzyme dégradant certains composés phénoliques, tandis que les solutions contenant peu de méthanol n'inactiveraient pas complètement l'enzyme [13, 53].

Parfois, une première extraction à l'hexane est effectuée. Elle permet d'éliminer la chlorophylle, les lipides et les caroténoïdes [13, 23].

Au final, aucune conclusion ne peut être tirée et malheureusement le choix du solvant devra se faire soit de manière empirique soit en se conformant à la majorité de la communauté scientifique qui préfère un mélange méthanol/eau (70:30 ou 80:20).

### **3. Séparation**

Du fait des différences de structure du squelette apolaire des différents polyphénols, de la présence plus ou moins importante de sucres hydrophiles et des fonctions hydroxyles hydrophiles, les polyphénols peuvent être séparés par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse. Le type de colonne, le temps de rétention, les solvants et les gradients varient très fortement d'une publication à une autre car le matériel utilisé et les intérêts scientifiques peuvent

être très différents. Les solvants les plus utilisés dans la littérature sont des gradients eau/acétonitrile, ou eau/méthanol, contenant parfois de l'acide formique à 0,1 % ou de l'acide acétique [11, 15, 16, 29, 31, 33, 50, 54, 55]. L'ajout d'acide acétique permet notamment d'augmenter l'intensité des pics d'absorption mais surtout de maintenir les fonctions hydroxyles non ionisées [29]. L'ionisation partielle des fonctions hydroxyles entraîne l'apparition de doubles pics. La colonne la plus utilisée pour séparer les polyphénols est une colonne apolaire C18, c'est à dire une colonne en silice sur laquelle sont greffées des chaînes à 18 carbones. Certains auteurs cherchent désespérément à séparer l'ensemble des polyphénols d'un extrait (séparation en 2 heures de 30 à 50 composés par HPLC [12]) tandis que d'autres se concentrent sur certaines classes et optimisent ainsi leur méthode et leurs prétraitements.

Parmi ces prétraitements, on rencontre l'hydrolyse acide (par HCl) qui permet de rompre la liaison entre l'aglycone et les sucres, ce qui permet d'analyser uniquement la fraction aglycone. Cependant l'hydrolyse peut entraîner la décomposition de certains polyphénols tels que les anthocyanines instables et ainsi tendre à sous-estimer la concentration en polyphénols de près de 50 % en fonction du temps d'hydrolyse et de la concentration en acide [26]. En fait, l'hydrolyse acide est avant tout une technique utilisée pour élucider la structure et caractériser les glycosides [13]. Elle peut aussi servir à simplifier un chromatogramme et minimiser les interférences puisqu'elle réduit à un seul pic tous les glycosides d'un même aglycone. La quantification d'un aglycone est de ce fait beaucoup plus aisée [20].

Très souvent, des cartouches de SPE C18 sont utilisées dans le but de séparer les composants les plus polaires tels que les sucres qui sont élués par l'eau [31, 52]. Les polyphénols sont ensuite élués par une solution de méthanol pur. L'extraction par ce type de cartouche est beaucoup plus efficace et plus rapide que l'extraction liquide/liquide qui était utilisée auparavant. Parfois cette cartouche sert aussi à fractionner les extraits polyphénoliques afin d'améliorer la séparation par HPLC en éluant la cartouche avec différents solvants ou avec différents gradients d'un mélange de solvants [13]. D'autres auteurs fractionnent aussi leurs extraits grâce à des colonnes de Sephadex LH-20 éluées par un gradient méthanol/eau qui permet une séparation basée sur la taille des molécules et non sur leur polarité [14].

Avec une colonne C18, l'éluion des polyphénols se fait en général dans l'ordre suivant : polyphénols simples, catéchines, anthocyanines, flavones, flavonols, isoflavone, flavanones, anthraquinones, chalcones. L'amélioration constante des techniques de séparation, aussi bien des colonnes que des instruments d'HPLC et des techniques de détection permet sans cesse la découverte de nouveaux composés tels que les glycosides de l'hydroxyphlorétine dont les concentrations très faibles n'étaient pas détectables par le passé.

## 4. Détection

### a) Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les composés phénoliques naturels sont très facilement identifiables et quantifiables par absorption UV-visible. En effet, ils possèdent des cycles benzéniques conjugués et des fonctions hydroxyles qui induisent une forte mésomérie [15].

Les détecteurs à barrettes de diode (DAD) associés à la chromatographie liquide ont permis une avancée considérable dans l'identification des différents polyphénols car ils permettent de visualiser les spectres UV-visible sur l'ensemble d'une plage de 200 à 800 nm à n'importe quel moment du chromatogramme.

Certains auteurs utilisent tout de même des réactions de dérivation post-colonne afin d'augmenter la sensibilité de détection [15, 37]. Ces réactifs induisent un déplacement des maxima d'absorption. Les réactifs suivants ont été décrits : des bases faibles telles qu'une solution à 0,5 M d'acétate de sodium (ajustée à pH 8 par une solution à 0,01M NaOH) (NaOAc) ; une solution à 0,3 M de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) ; une solution à 0,3 M de chlorure d'aluminium acidifiée par 0,1 % d'acide trifluoroacétique ( $AlCl_3$ , 0,1 % TFA).

La base faible déprotone uniquement les groupements phénoliques les plus acides, c'est à dire les groupements hydroxyles en position 3, 7 et 4'. Le chlorure d'aluminium forme des complexes avec les groupements *ortho*-dihydroxyles ou les fonctions cétones ayant un groupe hydroxyle en position *alpha* ou *para*. Les modifications des maxima apportées ayant été décrites, l'identification des composés post-colonne reste possible d'autant plus que les temps de rétention sont inchangés. De plus, les modifications chimiques permettent d'obtenir des informations sur la configuration des molécules en comparant les données avec et sans dérivation [15].

### b) Masse

Il n'est cependant pas possible par détection UV-visible de différencier les différents glycosides d'un même noyau polyphénolique car les sucres n'ont pas d'absorption en UV [15]. Il est donc nécessaire d'utiliser en parallèle un spectromètre de masse qui permet de déterminer le poids moléculaire des composés ainsi que leurs produits de fragmentation. De plus, les spectres d'absorption des dihydrochalcones retrouvés dans la pomme, à savoir le noyau phlorétine ou hydroxyphlorétine, ne présentent pas de différence notable entre eux. Ainsi seule la spectrométrie de masse permet de les différencier. Selon la littérature [15, 16, 33, 38, 52], le mode de détection d'ions négatifs permettrait d'obtenir des intensités plus importantes que le mode positif. Cependant au laboratoire, de meilleurs résultats ont été obtenus en mode de détection d'ions positifs.

## **B. Répartition des dihydrochalcones dans la pomme et ses dérivés**

Les composés phénoliques sont responsables du goût amer et astringent ainsi que de la couleur des différentes espèces de pommes. De plus ils sont à l'origine du trouble et de la formation de sédiments dans les jus de pomme et les cidres ainsi que du phénomène de brunissement. Leur oxydation par la polyphénoloxydase (PPO) est considérée comme la principale cause du brunissement des pommes [14, 15, 18, 55]. Les implications notamment dans l'industrie du jus et du cidre font des polyphénols des composés très étudiés. On trouve de nombreuses études [14-18, 20, 21, 26, 32-34, 36, 40, 50-52, 56-62] qui comparent les profils polyphénoliques des différentes espèces de pommes ainsi que leur répartition dans le fruit et les produits qui en sont dérivés.

Cependant, il est très difficile de pouvoir comparer les études entre elles et ainsi de recouper les résultats car, en général, elles ne traitent pas des mêmes variétés de pommes et ne se concentrent que sur une partie de la pomme : le jus, la peau, la chair, etc.

### **1. Le fruit**

#### **a) Différences entre les variétés de pommes**

On détermine de grandes variations des profils polyphénoliques entre différentes variétés de pommes [16, 17, 18, 34]. En effet, la variété est le principal facteur de variabilité pour le fruit à maturité.

Les espèces les plus cultivées dans le monde sont les *Red Delicious*, les *Golden Delicious*, les *Granny Smith* et les *Fuji*. Elles sont communément appelées pommes à dessert. On remarque pourtant que ces espèces sont celles qui contiennent le moins de polyphénols (154-178 mg/l de jus fraîchement pressé) [16, 17] et moins de 1 g/kg de cortex frais [18]. La *Boskoop*, que l'on trouve assez facilement dans le commerce, est une des pommes contenant le plus de polyphénols (970 mg/l) [16].

D'une manière générale, les pommes les plus amères comportent le plus de polyphénols et particulièrement de dihydrochalcones ; tandis que les pommes acidulées en comportent le moins. Les pommes à dessert (pommes sucrées) contiennent jusqu'à 10 fois moins de polyphénols et par conséquent de dihydrochalcones que les pommes à cidres, soit 10-35 mg/l de dihydrochalcones pour les premières et 34-171 mg/l pour les secondes [16-18].

Ainsi, la variété est un facteur majeur dans l'étude des composés phénoliques de la pomme mais des variations à l'intérieur d'une même variété peuvent aussi influencer sur les résultats. L'année de récolte a aussi une influence sur la composition phénolique [63] selon certains auteurs tandis qu'elle peut être négligée selon d'autres [64]. Une variation de 10 à 30 % de la teneur en polyphénols entre différentes pommes d'une même variété récoltée la même année a aussi été démontrée [64]. Différentes pommes d'une même variété cueillies simultanément dans un même verger peuvent aussi présenter des variations parfois très importantes (2 à 4 fois) de la teneur en certains polyphénols. [17]. Ainsi il est important de prendre plusieurs échantillons lors d'une étude afin de ne pas obtenir des résultats biaisés.

## **b) Différences entre la peau, la chair et les pépins**

On constate une répartition des composés phénoliques semblable pour toutes les espèces de pommes. Généralement, on trouve une teneur plus importante en composés phénoliques dans la peau que dans la pulpe [17, 34]. Ainsi, il y a environ 5 à 10 fois plus de dihydrochalcones dans la peau que dans la chair [27]. On trouve des concentrations de 12-159 mg/kg de phlorizine dans la peau des pommes *Golden*, *Red Delicious* ou *Granny Smith* et 83-418 mg/kg pour les pommes Reinettes contre seulement 4-14 mg/kg de phlorizine dans la pulpe des pommes *Golden*, *Red Delicious* ou *Granny Smith* et 16-20 mg/kg pour les pommes Reinettes [17]. Certaines pommes présentent tout de même des concentrations intéressantes dans le cortex, comme la Douce Coët (espèce française) avec 166 mg/kg (comparée à 26 mg/kg pour la *Golden*) [18].

On trouve les dihydrochalcones principalement dans les pépins de pommes où ils peuvent représenter 60 à 75 % des polyphénols totaux présents dans cette partie [27, 51] comparés aux 1 à 5 % présents dans le reste de la pomme. De ce fait un brevet a été déposé présentant l'obtention de dihydrochalcones pures à partir de pépins car la purification est beaucoup plus aisée et la teneur plus forte [65]. Néanmoins, il faut pouvoir trouver une source de pépins de pommes car ils représentent une minorité en poids dans une pomme. La solution avancée est de récupérer les pépins dans le résidu de pressage (pomace) car ils y représentent une part significative.

Ces connaissances sur la répartition des polyphénols dans la pomme sont importantes d'un point de vue analytique, industriel mais aussi dans l'évaluation de leur impact sur la santé. En effet, quand la pomme est mangée, elle est souvent pelée et on prend garde à ne pas manger les pépins. Dans ce cas, une grande partie des dihydrochalcones, et des polyphénols dans leur globalité, ne sont pas consommés.

## **2. Le jus**

Bien que les dihydrochalcones soient présents en très faible quantité dans le jus de fruit et le cidre, ils semblent jouer un rôle important dans leur qualité. En effet, quand la phlorizine est associée aux épicatechines, elle est impliquée dans la formation d'un produit d'oxydation orange qui compte pour la moitié de la coloration.

### **a) Différences entre les jus de pomme frais et les jus commerciaux**

La teneur en dihydrochalcones peut être 5 à 10 fois supérieure dans un jus de pomme trouble ou clair commercial que dans un jus obtenu avec une centrifugeuse domestique. Ceci est dû au fait que les procédés industriels utilisent toute la pomme, y compris la peau et les pépins, et utilisent des traitements thermiques qui inactivent certaines enzymes telles que la polyphénoloxydase qui dégradent les dihydrochalcones dans les jus préparés maison. Ainsi, les jus pressés en laboratoire à partir d'une seule variété de pomme contiennent entre 3 et 20 mg/l de phlorizine contre environ 26 mg/l pour un jus commercial [27, 46].

### **b) Différences entre les jus clairs et les jus troubles**

Lors de la production de jus de pomme, les pommes sont pressées, afin d'obtenir un jus brut trouble. On trouve cependant dans le commerce beaucoup plus souvent des jus de pomme clairs qui ont été filtrés car les jus troubles sont beaucoup plus instables et délicats d'un point de vue chimique et microbiologique. Il est par conséquent intéressant de déterminer les effets de la filtration sur la composition phénolique des jus de pomme [54, 55].

Une nette différence est constatée entre les jus de pomme troubles et les jus clairs trouvés dans le commerce. Les jus troubles contiennent beaucoup plus de polyphénols (152-459 mg/l) que les jus clairs (110-173 mg/l) [16]. La technique conventionnelle de clarification inclut une hydrolyse de la pectine par la pectinase qui induit une perte de près de 50 % des dihydrochalcones [27, 61]. Cette étape est cependant longue et coûteuse [54]. Le principe et l'influence des différentes techniques de clarification utilisées seront développés par la suite.

## **3. Le résidu de pressage (Pomace)**

Le résidu de pressage des pommes, lors de l'extraction du jus de pomme, est un déchet industriel. Des milliers de tonnes de résidu de pressage sont produits chaque année [51]. En France, on dénombre plusieurs régions productrices de pommes, notamment l'Alsace, la Normandie et la Bretagne. Des quantités très importantes de résidu de pressage sont produites

chaque année et il serait intéressant de trouver un moyen de traitement adapté et utile à ce produit. De nombreuses études ont été menées afin de trouver un intérêt à ce déchet industriel [32]. Les différentes idées vont de la fabrication d'aliments pour animaux, de compost ou de fuel, à la production d'éthanol par fermentation, d'acide citrique ou de pectine. Le résidu de pressage est aussi considéré comme un ingrédient alimentaire potentiel [66]. C'est un ingrédient riche en fibres (environ 36 % à 62 %) qui peut être utilisé dans la préparation de cookies ou de tartes à la pomme afin de les enrichir en fibres diététiques. De plus, le résidu de pressage augmente la capacité d'adsorption en eau de la farine (entre 60 et 70 %) quand il y est ajouté en quantité inférieure à 15 %. Enfin, le résidu de pressage, de part les flavonoïdes qu'il contient, apporte les saveurs et les arômes de la pomme.

Le résidu de pressage a une composition très hétérogène car il regroupe toutes les parties de la pomme, à savoir la chair et la peau mais aussi les pépins et la tige. Bien évidemment, on retrouve dans le résidu de pressage les mêmes composés polyphénoliques que dans le jus de pomme avec une teneur en polyphénols de 7,23 g/kg dont 1,9 g/kg de dihydrochalcones glycoside ce qui fait du résidu de pressage une source potentielle de dihydrochalcones. Enfin, la majorité des polyphénols présents sont des dérivés de la quercétine avec une teneur de 4,46 g/kg.

## **C. Paramètres influençant la teneur en polyphénols**

### **1. Dans la pomme**

#### **a) L'activité enzymatique**

La teneur en polyphénols peut-être expliquée simplement par l'activité des enzymes entrant en jeu dans leur synthèse. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la chalcone isomérase (CHI) et la glycosyltransférase (UFGT) présentent une activité maximale quand la pomme est immature, puis celle-ci diminue à la mi-saison avant de ré-augmenter au moment du mûrissement du fruit. Ce schéma n'est pas influencé par le type de pomme, à savoir pomme rouge ou verte. L'activité de la CHI reste à tout moment plus importante que celle des autres enzymes certainement du fait qu'elle joue sur la configuration 2S des flavanones, étape clé de la synthèse des flavonoïdes. Cette forte activité de la CHI a d'ailleurs été démontrée dans des travaux cités dans de nombreuses publications concernant d'autres plantes. L'activité de l'UFGT qui catalyse la glycosylation des flavonoïdes est suffisante pour expliquer le fait qu'on ne retrouve pas d'aglycone dans la pomme car ils sont tous glycosylés. Par ailleurs, il a été démontré que la PAL et la CHI étaient induites par une exposition aux radiations UV [30].

L'activité de la PAL ne peut pas être corrélée aux teneurs en flavonoïdes et cela confirme qu'elle entre en jeu dans la synthèse d'autres composés tels que l'acide chlorogénique. De plus, l'activité de la PAL est la plus faible comparée aux autres enzymes ce qui a pendant longtemps laissé penser qu'elle représentait le facteur limitant de la synthèse des flavonoïdes. Cependant son activité permettrait de synthétiser beaucoup plus de flavonoïdes que ne le font les pommes durant leur mûrissement. Certains auteurs ont proposé la CHS comme facteur limitant, la phénylalanine ou encore le malonyl-CoA qui intervient aussi dans la biosynthèse des acides gras [30].

## **b) Conditions de culture**

De nombreux facteurs environnementaux comme la technique d'éclaircissement, les engrais ou encore l'exposition au soleil pourraient influencer la teneur en composés phénoliques.

**L'éclaircissement** consiste en une réduction du nombre de fruits par arbre. Cette technique affecte certaines caractéristiques des pommes de table comme la concentration en sucres mais pas celle en polyphénols [25].

**L'utilisation d'un engrais azoté** pour la culture des pommiers à cidre entraîne une réduction de 17 % de la concentration en composés phénoliques des jus. Les concentrations en polyphénols dans la peau de la pomme de table sont également réduites par une supplémentation en azote. D'autres éléments minéraux (calcium, phosphore, potassium) influencent aussi les concentrations en polyphénols dans la peau des fruits [25, 67].

**Une meilleure exposition au soleil** dans l'arbre provoque l'augmentation de la concentration en anthocyanes et en glycosides de la quercétine dans la peau du fruit alors que d'autres polyphénols (catéchines, acide 5-caféoylquinique, phlorizine) ne sont pas ou peu affectés. De plus, différents stress peuvent être à l'origine de l'accumulation de polyphénols, comme une blessure ou une attaque par des organismes pathogènes [25].

## **c) Le mûrissement et stockage à froid**

Les résultats concernant la teneur en flavonoïdes au cours du mûrissement et du stockage sont assez divergents mais dans l'ensemble, les études s'accordent sur le fait que la teneur en composés phénoliques croît rapidement pendant les stades précoces du développement du fruit puis diminue pendant le mûrissement du fruit pour atteindre un niveau qui restera plus ou moins stable pendant le stockage [34, 57, 68]. Certains auteurs ont observé une diminution de la teneur en catéchine et acide chlorogénique pendant plusieurs mois de stockage mais cette diminution est assez faible et dépend des variétés de pommes [64]. Finalement, le stockage des fruits entiers en

atmosphère contrôlée ou à 4°C n'entraîne que de minimes variations pour chacune des classes de polyphénols [64]. Le stockage a par contre un effet sur les teneurs en polyphénols dans le moût qui sont 20 à 30 % supérieures après une période de maturation post-récolte. Cette augmentation ne peut pas être uniquement expliquée par la déshydratation des fruits mais peut-être par une modification de la constitution des membranes cellulaires [69].

En allant plus loin et en considérant plusieurs facteurs tels que la teneur en certains polyphénols et le degré de polymérisation de la procyanidine, il est possible de différencier une pomme mûre d'une pomme non mûre et de prédire l'état de mûrissement du fruit grâce à une analyse multivariée [57]. Ces modèles se basent essentiellement sur les teneurs en polyphénols dans la chair de la pomme car la composition de la peau d'un même fruit est sujette à de grandes variations selon la position par rapport au tronc et l'ensoleillement.

## **2. Dans le jus de pomme**

Dans le passé, les technologies mises en place dans la production de jus de pomme avaient pour but de diminuer la teneur en polyphénols. En effet, les polyphénols contribuent au trouble du jus (brunissement, dépôts) ainsi qu'à son goût astringent. De nos jours, la teneur en polyphénols est devenue un gage de qualité et un argument commercial dû à leurs bénéfices pour la santé. Des concentrations plus élevées sont ainsi recherchées [70].

Le procédé de fabrication des jus à partir des pommes a une grande influence sur la teneur finale en composés phénoliques. La conséquence majeure est l'oxydation des polyphénols, qui intervient dès les premières étapes de la production, et qui forme un pigment brun insoluble. Certains traitements enzymatiques visent à augmenter le rendement de production de jus et peuvent aussi avoir des conséquences sur la composition en polyphénols. Enfin, d'un point de vue commercial ou culturel, les jus sont majoritairement clairs et donc filtrés afin d'ôter toutes molécules en suspension ou composés colorés tels que certains polyphénols. Par exemple, les jus à destination du marché japonais doivent être très peu colorés [38]. L'industrie du jus de pomme présente donc de nombreux schémas de production pour augmenter au maximum les rendements et éliminer le brunissement et le trouble (Figure 31).

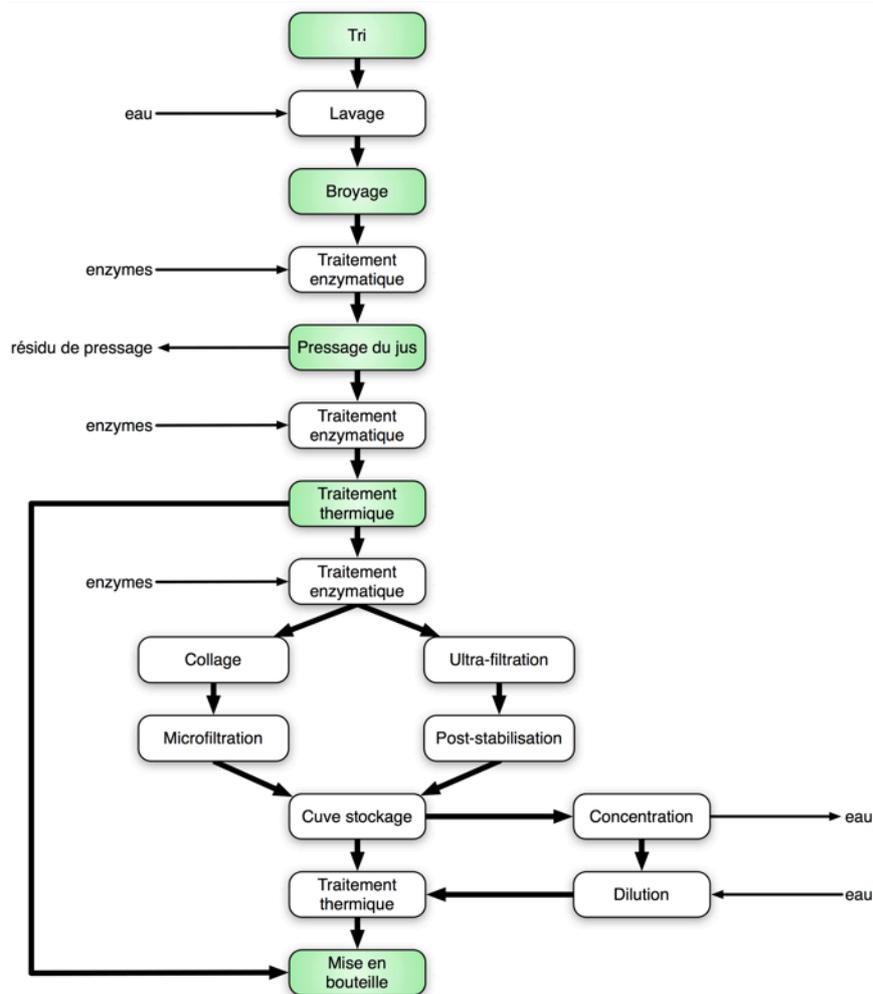


Figure 31 : Représentation schématique des procédés possibles de production de jus de fruit (étapes indispensables en vert) [35, 71]

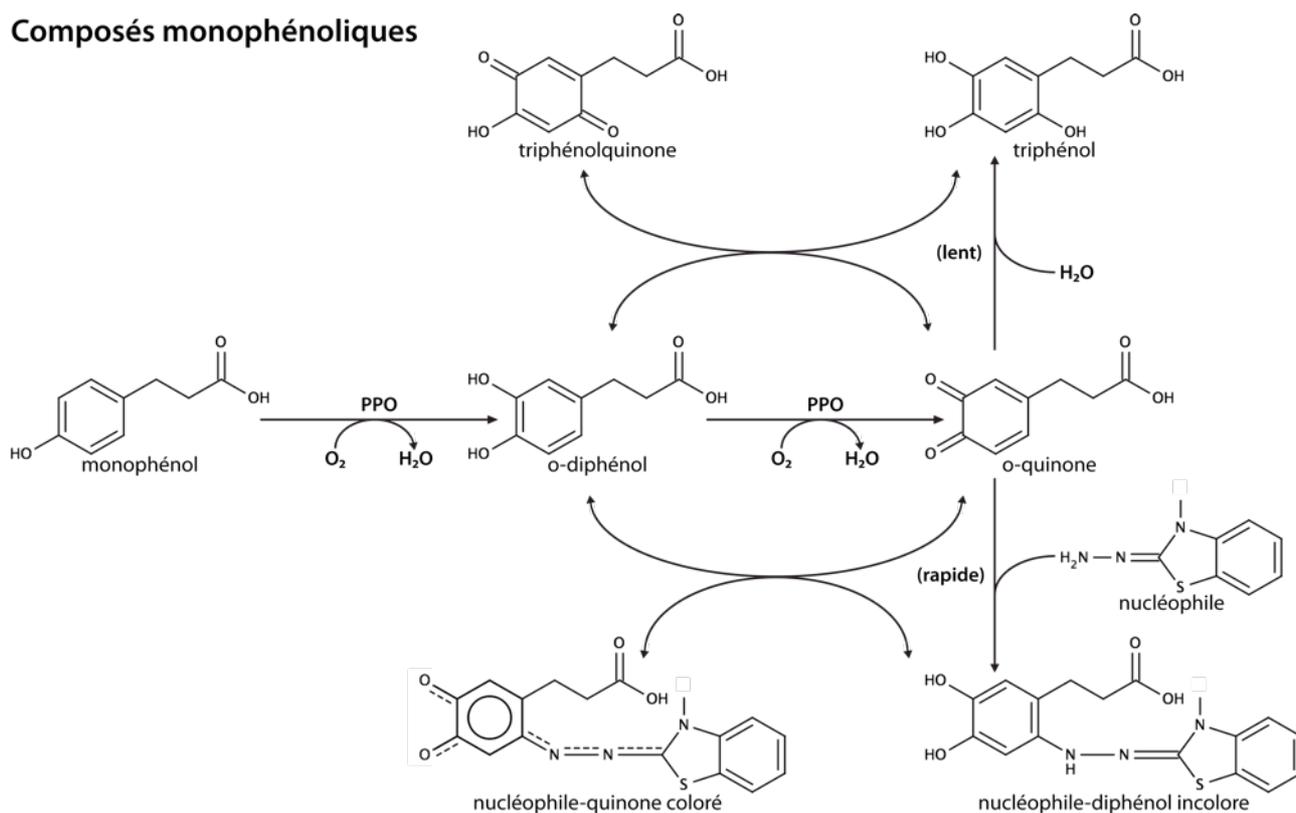
Deux voies sont possibles, soit en empêchant la formation de pigments bruns en inhibant les enzymes catalysant cette oxydation, soit en les éliminant par filtration en fin de procédé. Lors de la production de jus de pomme troubles, afin d'éviter l'oxydation des polyphénols et de stabiliser la turbidité, de l'acide ascorbique (vitamine C) est ajouté à la purée de pomme [38].

### a) Oxydation des jus de pomme

Au cours de la transformation des fruits, lors du broyage et du pressage, la cellule végétale est détruite. Les polyphénols, alors au contact de l'air, subissent une oxydation qui se traduit par une coloration brune. De ce fait, cette oxydation est souvent désignée sous le terme de brunissement enzymatique. On admet que ce sont principalement les composés phénoliques de faible poids moléculaire qui sont responsables de ces détériorations physico-chimiques [71].

La première étape de ce phénomène est bien comprise : la polyphénoloxydase (PPO), une enzyme membranaire, catalyse l'oxydation par l'oxygène moléculaire de phénols et d'*o*-diphénols en *o*-quinones (Figure 32). Dans un second temps, cette quinone évolue vers des produits d'oxydation par des réactions enzymatiques ou non notamment avec les acides aminés et les protéines. Contrairement aux polyphénols natifs, ces polyphénols néoformés sont bien moins connus. Pourtant, ils contribuent aux propriétés organoleptiques et technologiques du jus de pomme et méritent donc une attention particulière [25, 71].

### Composés monophénoliques



### Composés diphénoliques

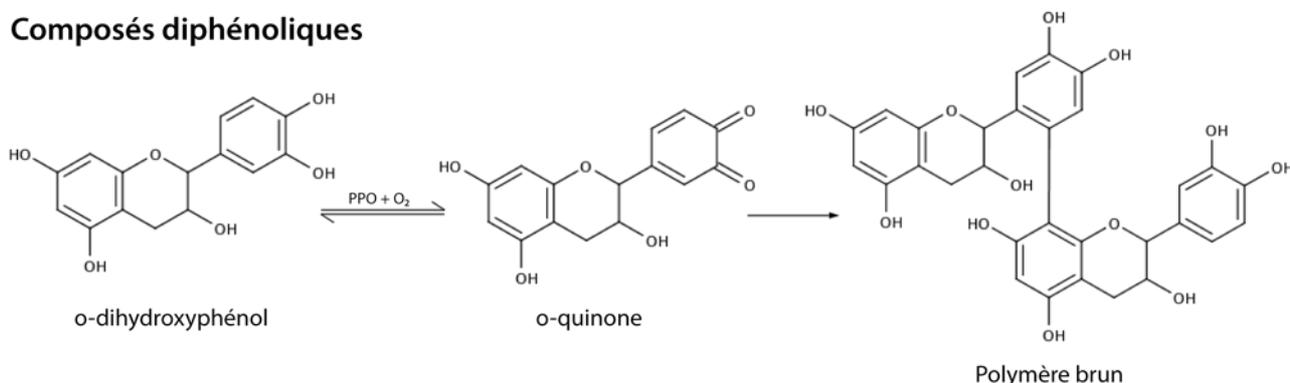


Figure 32 : Réaction enzymatique responsable du brunissement sur des molécules mono- ou diphénoliques [71, 72]

Ainsi tout prétraitement tel que le broyage et le traitement enzymatique enclenche la réaction d'oxydation enzymatique et augmente de ce fait la perte de composés phénoliques dans le jus. En tant normale, elle n'a lieu qu'au moment du pressage. Cette oxydation se prolonge ensuite lors de la conservation des jus. L'oxydation des polyphénols est donc un marqueur de vieillissement du jus. Cependant ce sont ces mêmes polyphénols qui assurent leur conservation. En effet, les polyphénols ont une forte activité antioxydante. L'acide chlorogénique représente 32 % de l'activité antioxydante totale d'un jus de pomme tandis que les glycosides de la phlorétine représentent 11 % de cette activité [56]. L'acide ascorbique (vitamine C), présent naturellement dans les pommes à des concentrations de l'ordre de 100 ppm, n'est pas retrouvé dans les jus de pomme [56]. De plus, l'ajout d'acide ascorbique qui est un fort antioxydant n'apporte rien à long terme car il est oxydé en une dizaine de jour tandis que les polyphénols de la pomme maintiennent leur action beaucoup plus longtemps. Afin de prévenir l'oxydation des polyphénols pendant le procédé de fabrication, l'addition d'acide ascorbique ou de dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) s'avère très efficace surtout lors de la production de jus troubles qui ne seront pas filtrés. L'intérêt d'inhiber cette réaction d'oxydation a motivé la recherche de composés naturels inhibant la PPO. Ainsi, le miel, la cystéine, un mélange de sucres et de composés thiols ou des produits issus de la réaction de Maillard sont capables d'inhiber partiellement la réaction [73]. Enfin, les pommes non mûres sont plus sensibles au brunissement car elles présentent à la fois une plus faible teneur en acide ascorbique et une plus forte activité de la PPO [38, 68].

L'oxydation a un effet principalement sur la teneur en flavanes (catéchines et procyanidines) et en acide chlorogénique qui diminuent respectivement de 28 % (catéchines) et 25 % en 30 minutes. Les catéchines et l'acide chlorogénique sont en effet des substrats principaux de la PPO mais ils sont aussi impliqués, pour certains, dans un phénomène d'oxydation non enzymatique qui ne sera pas détaillé dans ce travail [38]. Les dihydrochalcones ainsi que les flavanes sont moins affectées par l'oxydation car ils ne sont pas des substrats directs de la PPO [20, 38, 64]. Le fait que les pommes les plus produites et les plus commercialisées contiennent le moins de flavan-3-ols très sensibles à l'oxydation n'est donc pas un hasard. C'est le cas inverse pour les pommes à cidre que l'on veut très coloré [18].

## **b) Traitements enzymatiques**

Les traitements enzymatiques par des pectinases sont utilisés pour faciliter le pressage de la purée de pomme (moût ou marc) et ainsi augmenter le rendement des jus en déstructurant la matrice. De plus, ce traitement participe à la clarification des jus [25, 54].

Le traitement pectolytique revenant à hydrolyser la pectine par une pectinase est une technique utilisée conventionnellement dans l'industrie du jus de pomme. Ses conséquences sont

très variées. Il permet d'augmenter le rendement en jus sans augmenter la concentration en tanins, mais il peut aussi entraîner une diminution des concentrations en polyphénols par rapport à un pressage simple. La diminution des polyphénols peut être expliquée par l'augmentation de la surface de contact du marc, due à la déstructuration de la matrice, mais aussi et surtout par la réaction d'oxydation enclenchée simultanément [25]. Une manière de diminuer l'effet de l'oxydation lors de la macération du marc avec les enzymes est d'effectuer cette étape dans des conditions non oxydatives en ajoutant de l'acide ascorbique [38].

Les traitements enzymatiques pour la clarification seraient à l'origine de l'hydrolyse des esters d'acide hydroxycinnamique, conduisant à l'apparition d'acide caféique et coumarique (acides libres) dans les jus [35].

Depuis quelques années, un procédé dit de liquéfaction permet d'augmenter encore le rendement de production et la teneur en polyphénols de manière significative. Cette technique consiste à ajouter de la cellulase à la pectinase. De ce fait, les parois cellulaires sont littéralement dissoutes. Lors d'un pressage simple, seuls les composés phénoliques présents dans les vacuoles sont extraits. L'addition de cellulase permet d'extraire les polyphénols présents dans les parois cellulaires [13]. Ainsi, la teneur en phlorizine et phlorétine-2'-xyloglucoside est 4 à 5 fois plus importante. De plus, la teneur en dérivés de la quercétine est aussi augmentée, les poly-, oligo- et mono-saccharides des parois sont libérés dans le jus et les teneurs en calcium et magnésium (ions intracellulaires) est aussi augmentée. Le poids sec des jus est ainsi augmenté d'environ 15 %.

Mais cette méthode peut présenter des désavantages. En effet, cette augmentation de polyphénols peut entraîner des modifications de la qualité gustative mais aussi accentuer le brunissement du jus. De plus, l'ajout d'enzymes entraîne un coût supplémentaire et des restrictions légales. En effet, l'utilisation d'enzymes cellulolytiques dans la production de jus de fruit est interdite par l'Union Européenne qui attend un complément d'information sur les conséquences nutritionnelles de ce procédé [74].

### **c) Traitements thermiques**

Théoriquement, les traitements thermiques devraient préserver les polyphénols en détruisant les enzymes responsables de leur dégradation. En effet, un traitement à 89°C pendant 90 secondes permet d'inactiver la PPO [35]. Néanmoins, certains composés phénoliques tels que les flavan-3-ols monomères ou les procyanidols oligomères sont complètement dégradés par un traitement thermique du jus de pomme à 105°C pendant 45 secondes correspondant à une pasteurisation industrielle ou par un traitement à 120°C pendant 20 minutes correspondant à une

stérilisation. Les glycosides de la quercétine ou la phlorizine sont seulement partiellement dégradés par les traitements thermiques. Cette dégradation est accentuée par l'utilisation d'un traitement enzymatique préalable [61] (Figure 33).

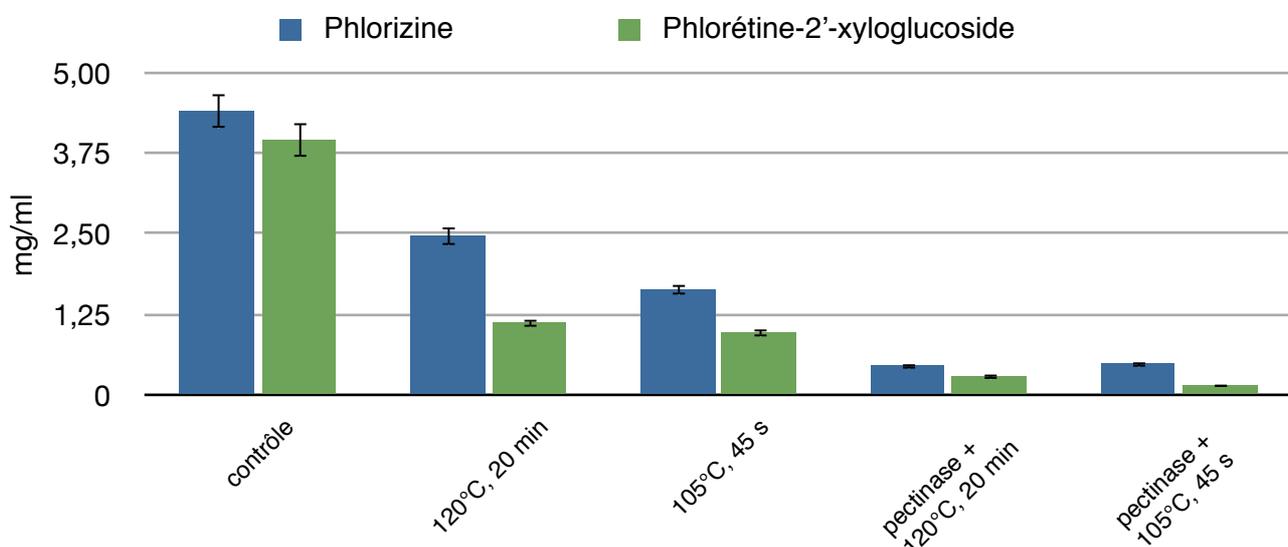


Figure 33 : Effet de traitements thermiques sur la teneur en phlorizine et phlorétine-2'-xyloglucoside [61]

Étrangement, la pasteurisation (105°C pendant 45 secondes) induit une perte des dihydrochalcones plus importante que la stérilisation (120°C pendant 20 minutes). Ceci peut s'expliquer par la plus forte inactivation des enzymes à une température élevée et la bonne stabilité des dihydrochalcones à une forte température pendant un temps court [27, 61].

Il a été démontré qu'il était très intéressant d'effectuer un traitement thermique de courte durée juste après le pressage car cela permet d'inactiver la PPO. De ce fait, la réaction est arrêtée juste après avoir été déclenchée [67].

#### d) Champs électriques pulsés

Depuis quelques années, la méthode des champs électriques pulsés (Pulsed Electric Fields, PEF) est proposée comme une alternative au traitement par température telle que la pasteurisation. Une méthode alternative a été recherchée car le traitement par température peut entraîner une dégradation des vitamines et un changement de couleur et de goût. Cette nouvelle méthode consiste à effectuer des décharges électriques (ex. : énergie : 10 kJ/kg, intensité : 2 A à 40 kV, fréquence : 40 Hz) grâce à deux électrodes mises au contact de la purée de pomme, avant le pressage. Cette méthode ne modifie pas la composition des jus du point de vue du pH, de l'acidité, de la densité ou de la teneur en sucres. De plus les variations de teneur en polyphénols ou d'activité antioxydante ne sont pas significatives. Cependant, quand cette méthode est associée à des températures modérées de 40 à 65°C, elle permet d'inactiver partiellement ou

totallement de nombreuses enzymes telles que la polyphénoloxydase ou la peroxydase. Le traitement adapté doit être trouvé en jouant sur la température et l'énergie déchargée. Enfin, les potentiels électriques induits entraînent des modifications des parois des cellules, notamment par la formation de pores, ce qui permet un effet anti-microbien efficace. Cette technique a aussi pour conséquence d'augmenter de 1,7 à 7,7 % le rendement de la production de jus car elle déstructure la matrice alimentaire. Cette technique est actuellement autorisée dans l'alimentation aux Etats-Unis mais n'est pas encore admise dans l'Union Européenne [70, 75, 76].

### **e) Extraction/diffusion**

Lors d'un pressage simple, les polyphénols de la peau ne sont pas retrouvés dans la composition du jus. La technique de liquéfaction permet certes de remédier à ce problème mais elle n'est pas autorisée en Europe. Le procédé d'extraction/diffusion consiste à faire diffuser de l'eau chauffée à travers la purée de pomme. Il permet aussi d'obtenir une teneur en polyphénols environ 5 fois plus élevée que lors d'un pressage simple. Les flavonols, présents dans la peau et les dihydrochalcones, présents dans la peau et les pépins sont bien mieux extraits. L'utilisation de ce procédé avec des températures élevées (40-50°C) permet aussi d'augmenter la teneur en acides hydroxycinnamiques en inhibant la PPO. En augmentant la température de l'extraction de 12 à 40°C, et en présence de 250 ppm de SO<sub>2</sub>, l'extraction des polyphénols est augmentée en moyenne de 28 % mais l'augmentation atteint 50 % pour les procyanidols oligomères et polymères [77]. Cette technique pourrait aussi expliquer la grande différence de teneur qui existe entre les jus préparés au laboratoire et les jus commerciaux. Elle est très utilisée pour la confection de concentrés de jus de pomme [35, 67, 74].

### **f) Collage**

Le collage consiste à ajouter au jus de la gélatine, de la bentonite, du charbon actif, de la PVPP (polyvinylpolypyrrolidone), ou du gel de silice qui vont se combiner à certaines molécules présentes et former des précipités. La gélatine qui est très utilisée se combine par exemple avec les procyanidols. Les traitements de collage impliquent ainsi une réduction discriminante des concentrations en composés phénoliques. Pour un ajout de 300 mg de gélatine par litre de cidre, la teneur du jus clarifié en acides hydroxycinnamiques est réduite de 7 %, celle de la phlorizine de 15 %, celle de l'épicatéchine de 4 % et celle des procyanidols de 20 % [78]. Le charbon activé est non spécifique et très utilisé comme agent décolorateur, tandis que la bentonite et la silice permettent d'éliminer les protéines instables [25, 67]

## g) Filtration

L'industrie du jus de pomme présente plusieurs schémas de production en utilisant soit une étape de collage suivie d'une microfiltration ou bien une ultrafiltration suivie d'une stabilisation par des résines (Figure F6b1-2).

### (1) Filtration et ultrafiltration

Le traitement pectolytique étant assez cher et long, d'autres techniques ont été mises au point telles que la filtration par des membranes. Cette technique est simple à mettre en place dans le procédé de fabrication et présente une faible consommation d'énergie et des coûts d'opération réduits [54, 55, 71].

La microfiltration et l'ultrafiltration se font grâce à des membranes inorganiques résistantes aux agents corrosifs de lavage et de stérilisation, telles que des membranes  $\gamma$ -aluminium/ $\alpha$ -aluminium ou zirconium/carbone (tubulure en oxyde de zirconium avec un support en graphite) dont un schéma est présenté en Figure 34. Selon la taille des pores des membranes, on parle de microfiltration (0,14 microns) ou d'ultrafiltration (0,0047 microns). Cette dernière permet de retenir des composés ayant un poids moléculaire supérieur à 50 kDa.

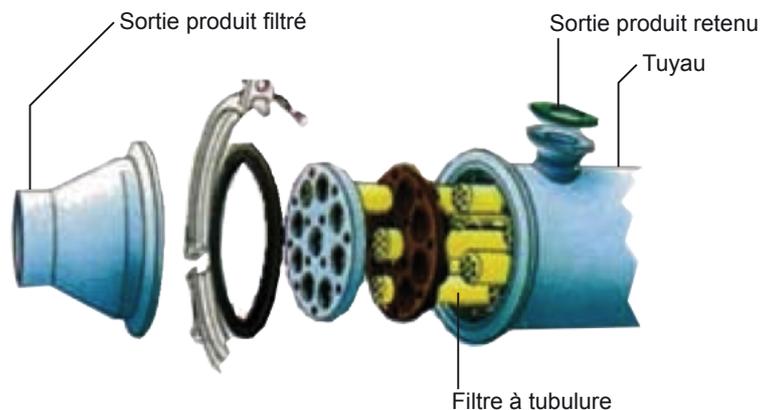


Figure 34 : Schéma de filtre à tubulure permettant la filtration de jus [79]

Les techniques d'ultrafiltration actuellement utilisées dans l'industrie du jus de pomme utilisent souvent des filtres en acétate de cellulose qui entraînent une diminution de 12 à 18 % des polyphénols totaux [80]. D'un point de vue général, l'ultrafiltration entraîne une diminution moins importante des composés phénoliques que la microfiltration. La température (20 ou 50°C) ne semble avoir aucun effet sur la teneur en dihydrochalcones tandis que l'augmentation du temps de filtration entraîne une diminution moins importante. En conclusion, il transparaît que l'ultrafiltration à 20°C produit un jus très stable.

## (2) La PVPP

La polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) est une résine qui possède une forte affinité pour les polyphénols. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche très fine insoluble dans l'eau et les solvants organiques majeurs. La PVPP, de formule  $(C_6H_9NO)_n$  (Figure 35) est un polymère synthétisé à partir de la pyrrolidone en présence de base forte.

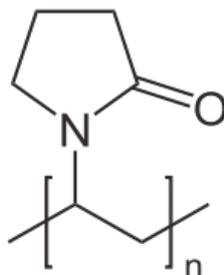


Figure 35 : Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

La PVPP est très utilisée par les viticulteurs (surtout pour les vins blancs et rosés) et l'industrie de la bière (sur le moût) car elle permet d'ôter une partie des composés phénoliques oxydables à l'origine du jaunissement ou brunissement, d'éliminer une partie des tanins astringents et des molécules responsables de l'amertume et d'augmenter la stabilité du goût, sans affecter les arômes. Les doses d'utilisation de la PVPP varient de 10 à 30 g/hL pour les vins blancs et de 20 à 50 g/hL pour les vins rouges. La dose maximale autorisée par la réglementation (CE N°1493/99) est de 80 g/hL [81]. La PVPP est considérée dans la vinification comme un additif cher avec un coût d'achat de 50-150 € TTC/kg selon la qualité. Cependant en chimie analytique, c'est un prix tout à fait acceptable comparé à celui de certaines phases chromatographiques apolaires.

La PVPP peut-être régénérée en milieu alcalin ce qui présente un avantage énorme pour l'industrie. La régénération se fait par un lavage intensif avec une solution caustique à 1-2 % à une température de 60 à 85°C. Le traitement alcalin libère les composés sous forme d'anions qui retrouvent une meilleure affinité pour l'eau. On rince enfin avec de l'eau à 50-70°C pour nettoyer la résine.

Une simple étape de clarification par ultrafiltration utilisée dans l'industrie diminue la teneur en polyphénols d'environ 12 à 18 %. Quand on combine cette étape à une stabilisation par la PVPP, ou une autre résine d'adsorption, la réduction atteint 20 à 40 % [71]. En effet, la PVPP a la capacité d'adsorber les polyphénols plus spécifiquement, ce qui a, toutefois, le désavantage de diminuer le flux au cours de la filtration en colmatant le filtre. Cependant, une régénération du filtre de PVPP par une solution alcaline à 0,1 M de soude permet de nettoyer la PVPP des polyphénols attachés et ainsi retrouver une PVPP blanche et propre et par conséquent un flux identique à celui de départ. C'est dans cette optique qu'ont été expérimentés des filtres d'ultrafiltration composés

d'un alliage de polyethersulfone (PES) et de polyvinylpyrrolidone (PVP) qui permettent de réaliser l'ultrafiltration et la stabilisation en une seule étape avec un filtre régénérable [71]. Ces filtres permettent de surcroît de travailler avec des flux supérieurs aux filtres en acétate de cellulose tout en obtenant une baisse de la teneur en polyphénols totaux de 30 à 35 %.

## **h) Stockage**

Une fois pressés, stabilisés et éventuellement filtrés, les jus sont stockés. Les concentrations des jus de pomme de table en glycosides de la quercétine, en catéchines ou en phlorizine ne sont pas significativement modifiées par une conservation à 4°C ou à 20°C pendant 1 mois. Une étude a démontré qu'en 9 mois à 25°C, 36 % des acides hydroxycinnamiques, 60 % des glycosides de la quercétine et de la phlorétine et la totalité des procyanidines étaient dégradés dans un jus concentré. Cependant, cette étude ne précise pas si le stockage s'est effectué à l'abri de la lumière et ne compare pas ces résultats à un stockage au frais comme c'est habituellement le cas [35]. L'oxydation entraîne ainsi une coloration plus importante du jus lors du stockage.

## **D. Application industrielle**

Les polyphénols sont considérés comme des marqueurs chémométriques et permettent d'établir des critères d'authenticité de certains aliments. Ils permettent de détecter une détérioration de l'aliment ou bien l'ajout frauduleux d'autres fruits [60]. À l'origine, les profils polyphénoliques des différents fruits étaient considérés comme suffisants pour identifier le fruit [13]. Pourtant quand il s'agit de mélanges de fruits, l'identification en analysant le profil est impossible. C'est pourquoi des composés phénoliques spécifiques de chaque espèce ont été recherchés. Cependant, il apparaît au fur et à mesure des avancées technologiques que les composés phénoliques spécifiques d'une espèce soient rares.

Les dérivés de la phlorétine, par exemple, ont longtemps été considérés comme spécifiques de la pomme mais des études récentes ont mis en évidence la présence de phlorizine dans les fraises et les cynorrhodons [47, 48]. En effet, il a été démontré que la fraise contenait entre 1,9 à 4,9 mg/100 mg de phlorizine, ce qui en fait un constituant très mineur. La phlorétine-2'-xyloglucoside n'a en revanche pas pu être identifiée. Bien que la phlorizine ait déjà été recherchée dans de nombreux fruits, jamais elle n'avait été détectée ailleurs que dans la pomme [46]. Ceci peut être expliqué par le fait que ce composé est détecté à des temps de rétention proches de certains flavonols (glycosides de la quercétine) et peut donc être co-élué d'autant plus que sa concentration est très faible.

Pourtant, les dérivés de la phlorétine n'ayant jamais été détectés dans la poire, ils peuvent servir dans la détection d'adultération de jus de poire par des jus de pomme. Ce cas est fréquemment rencontré car le jus de pomme est beaucoup moins onéreux que le jus de poire. Or, par injection directe du jus en HPLC et en recherchant la présence de phlorizine et de phlorétine-2'-xyloglucoside, une addition de 50 ml de jus de pomme par litre de jus de poire peut être mise en évidence.

Ainsi, même si à terme les glycosides de la phlorétine risquent de ne plus permettre la garantie de l'ajout de pomme à tout produit alimentaire, ils restent actuellement de très bons marqueurs de ce fruit. Par ailleurs, certains chercheurs explorent de nouvelles pistes pour faire face au frelatage de produits dérivés de fruits. Ainsi, une piste originale est l'étude des constituants polysacchariques des membranes intercellulaires qui peuvent être des marqueurs de qualité et d'authenticité [82].

## IV. Etude de laboratoire

Cette partie reprend les résultats obtenus au laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien - UMB7178), sous la direction de M. Eric Marchioni. En se basant sur la littérature, des techniques innovantes de séparation et purification des dihydrochalcones ont été développées. De plus les composés phénoliques d'une variété peu connue de pomme - la *Weirouge* - ont été analysés.

### A. Matériel et méthode

#### 1. Substances de référence

Les seules dihydrochalcones de la pomme disponibles dans le commerce sont la phlorizine et son aglycone, la phlorétine. Elles ont été achetées auprès d'Extrasynthèse (références : 1044 et 1046, Lyon, France).

#### 2. Les solvants

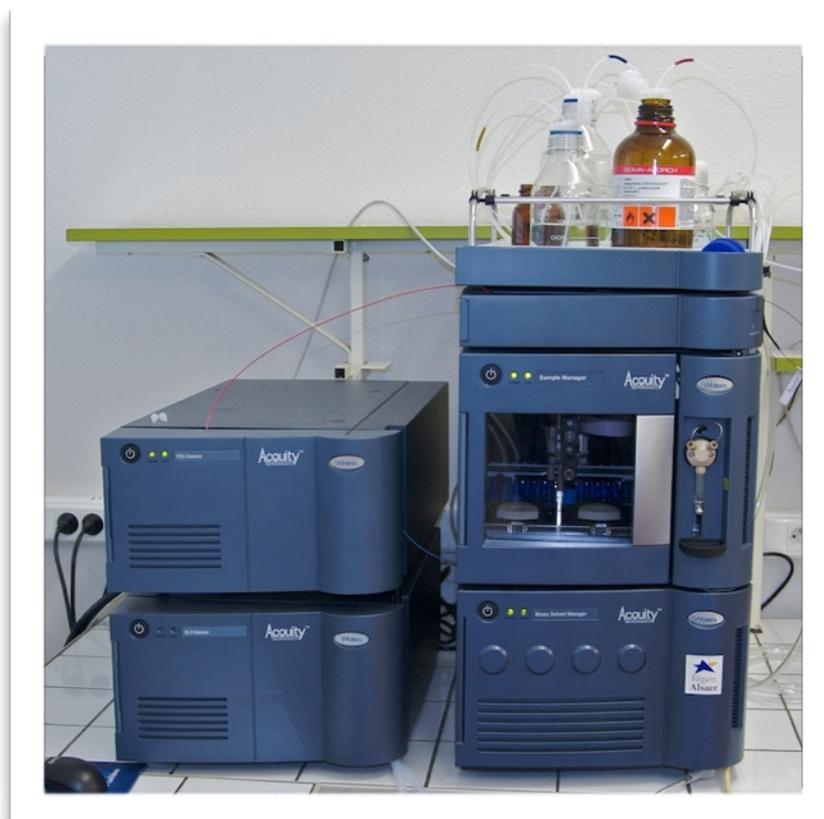
L'eau milliQ a été produite au laboratoire à l'aide du générateur Synergy® UV S. kit (Millipore, Molsheim, France). Les solvants organiques proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) : acétonitrile 99,9 %, chloroforme 99,9 %, acide ortho-phosphorique 85 % (Fluka) et de Carlo Erba (Val de Reuil, France) : méthanol 99,9 %, acide acétique glacial 99,9 %.

#### 3. Le matériel

Ont été utilisés : une étuve (Memmert, Schwabach, Allemagne) ; un four Thermolyne 1300 Furnace (Sybron Corporation, Dubuque, Iowa, USA) ; un Ultraturrax T25 Janke & Kunkel IKA® Labortechnik (VWR, Strasbourg, France) ; un cryobroyeur Freezer/Mill® 6870 Spex SamplePrep (Spex CertiPrep, Stanmore, Grande Bretagne) ; une centrifugeuse de cuisine Magimix® Cuisine Système 5000 (Magimix, Vincennes, France) ; un évaporateur rotatif Laborota 4000 efficient (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Allemagne) ; un speedvac GeneVac DD-4X (Genevac, Ipswich, Royaume-Uni) ; un bain à ultrasons Bandelin Sonorex RK100 (Bandelin electronic, Berlin, Allemagne) ; un lyophilisateur Christ® Alpha 2-4 LSC (Christ, Osterode, Allemagne) ; des colonnes en verre Sigma C5419, volume 8ml, Dlx : 1 cm x 10 cm (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ; des filtres Chromafil Xtra PET 20/25 et PTFE 45/25 (Macherey-Nagel, Hoerdt, France).

Pour l'analyse chromatographique différentes chaînes analytiques ont été utilisées :

- une chaîne de Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC) Waters Acquity™ (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) (Figure 36) composée d'une pompe binaire (Binary Solvent Manager), d'un injecteur automatique (Sample Manager) et d'un détecteur à barrette de diode (PDA Detector) avec une colonne Acquity UPLC® BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  2,1x50 mm (Waters) ou Acquity UPLC® BEH C18 1,7 $\mu\text{m}$  2,1x150 mm (Waters) avec le logiciel Empower 2 (Waters).



*Figure 36 : Chaîne UPLC Waters Acquity™*

- une chaîne HPLC modèle Beckman (Villepinte, France) composée d'une pompe LC-126, un injecteur LC-502, un détecteur LC-168 avec une colonne CC 250/4 Lichrospher 100 RP 18, 5  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Hoerd, France) avec le logiciel 32 Karat.

- une chaîne HPLC-MS-MS Varian (Les Ulis, France) composée de deux pompes Prostar 210, un autosamplereur Prostar 410, un spectromètre de masse Varian 1200L triple quadripolaire avec une colonne Macherey-Nagel CC 250/4 Lichrospher 100 RP 18, 5  $\mu\text{m}$  avec le logiciel Star-1200 (version 6.8).

## 4. Protocoles

Au cours des manipulations présentées dans la suite de ce mémoire, différents types d'échantillons tels que des jus, des pelures ou la chair des pommes ont été utilisés. Ces échantillons ont dû être préparés avant extraction et éventuellement séparation sur colonne. Tous les protocoles sont détaillés ci-après.

### a) Préparation des échantillons

#### ● **Protocole P.01 : préparation des pommes**

Les pommes entières sont rincées à l'eau puis pelées avec un économe vendu dans le commerce. Les pelures ainsi que des morceaux de chair sont ensuite cryobroyés et lyophilisés selon les protocoles P.03 et P.04 puis conservés au congélateur, en attendant l'analyse, puis au réfrigérateur le temps des analyses.

#### ● **Protocole P.02 : préparation des jus bruts de sortie de pressoir**

Les jus bruts de sortie de pressoir sont des jus troubles non filtrés. Ainsi, ils ont été filtrés sur un verre fritté (porosité 4) et conservés au congélateur, en attendant l'analyse, puis au réfrigérateur le temps des analyses.

#### ● **Protocole P.03 : cryobroyage**

Les peaux de pommes sont broyées sous azote liquide avec un cryobroyeur en suivant trois cycles comportant une minute de refroidissement et cinq minutes de broyage.

#### ● **Protocole P.04 : lyophilisation**

Les échantillons de pelures cryobroyées toujours congelés sont lyophilisés en suivant deux cycles de lyophilisation. Un premier (lyophilisation primaire) permet d'ôter toute l'eau libre dans l'échantillon et un second (lyophilisation secondaire) extrait l'eau liée. Les paramètres utilisés pour la lyophilisation sont les suivants :

- lyophilisation primaire : 24 h à 0,2 mBar (T° condensateur : -80°C, échantillon à T° ambiante)
- lyophilisation secondaire : 4 h à 0,09 mBar (T° condensateur : -80°C, échantillon à T° ambiante)

## **b) Extraction**

### **(1) La peau, la pulpe et le moût**

#### **● Protocole E.01 : comparaison de solvants d'extraction**

100 mg de peau de *Golden* cryobroyée et lyophilisée selon les protocoles P.01, P.03 et P.04 sont extraits sous ultrasons pendant 10 minutes avec différents solvants. Trois répétitions sont effectuées pour chaque solvant. Ont été testés : 20 ml d'eau distillée ; 20 ml d'eau contenant 1 % d'acide acétique ; 5 ml, 7,5 ml, 10 ml et 2x10 ml de méthanol pur ; et enfin 10 ml de méthanol contenant 1 % d'acide acétique. Après filtration avec un filtre PTFE à 0,5 µm, chaque extrait est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mBar, pour les extraits méthanoliques) ou au speedvac (pour les extraits aqueux) puis repris dans 1,0 ml de méthanol. Après filtration avec un filtre PET à 0,20 µm l'extrait est injecté en UPLC.

#### **● Protocole E.02 : optimisation de l'extraction**

5 g de peau de pomme *Golden* cryobroyée et lyophilisée (selon les protocoles P.01, P.03 et P.04) sont extraits successivement par 500 ml puis 200 ml de méthanol sous ultrasons pendant 15 minutes. Chaque extrait est concentré à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mBar) dans respectivement 12,5 ml et 5 ml en complétant avec du méthanol. Les deux extraits sont filtrés avec un filtre PET à 0,20 µm puis injectés en UPLC.

#### **● Protocole E.03 : extraction d'échantillons non cryobroyés**

100 mg d'échantillon lyophilisé selon le protocole P.04 mais non cryobroyé sont placés dans un Falcon avec 20 ml de méthanol. Après un broyage à l'ultraturax, le Falcon est laissé 10 minutes dans un bain à ultrasons. Une centrifugation à 9000 rpm pendant 5 minutes permet de recueillir le surnageant. L'extrait est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mBar) puis repris dans 5 ml de méthanol. Après filtration avec un filtre PET à 0,20 µm, il est injecté en UPLC.

### **(2) Le jus**

#### **● Protocole E.04 : comparaison de différents solvants d'élution**

Des colonnes contenant 100 mg de PVPP (polyvinylpyrrolidone) et 2 g de sable de Fontainebleau calciné sont réalisées en mélangeant les deux composés et en les versant « à sec » dans une colonne en verre Sigma. 10 ml de jus de pomme de *Golden* sont déposés sur la colonne. Puis trois éluions successives avec 10 ml de méthanol sont effectuées. Après ces trois éluions, un autre solvant tel que l'acétonitrile, l'éthanol ou l'isopropanol est testé. Les trois fractions de méthanol sont réunies d'une part et celles de l'autre solvant d'autre part. Chaque solvant est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mbar) puis les extraits sont repris dans 5 ml de méthanol. Après filtration avec un filtre PET à 0,20 µm, ils sont injectés en UPLC.

● **Protocole E.05 : optimisation du solvant d'élution**

7 ml de jus de pomme *Golden* sont déposés sur des colonnes contenant 200 mg de PVPP et 3 g de sable de Fontainebleau calciné (selon le protocole E.04). Une élution avec soit 50 ml de méthanol, soit 50 ml de méthanol contenant 1 % de solution ammoniacale à 25 %, soit 50 ml de méthanol contenant 8 % de solution ammoniacale à 25 % est effectuée. Pour chaque solvant, la manipulation est effectuée trois fois. Les extraits sont évaporés à sec à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mbar) puis repris dans 5 ml de méthanol et injectés en UPLC après avoir été filtrés avec un filtre PET à 0,20 µm.

● **Protocole E.06 : effet de la température**

7 ml de jus de pomme *Golden* sont déposés sur des colonnes contenant 200 mg de PVPP et 3 g de sable de Fontainebleau calciné (selon le protocole E.04). Une élution avec 50 ml de méthanol contenant 1 % de solution ammoniacale à 25 % soit à température ambiante, soit préchauffé à 50°C dans une étuve. Trois répétitions sont réalisées pour chaque condition. Après filtration avec un filtre PET à 0,20 µm, chaque élution est injectée en UPLC.

● **Protocole E.07 : passage successif d'un même éluant**

7 ml de jus de pomme *Golden* sont déposés sur des colonnes contenant 200 mg de PVPP et 3 g de sable de Fontainebleau calciné (selon le protocole E.04). Une première fraction de 20 ml de méthanol contenant 1 % de solution ammoniacale à 25 % est recueillie. Après en avoir prélevé 500 µl, les 19,5 ml restants servent à nouveau à éluer la même colonne. Cette dernière étape est répétée une troisième fois. Les 3 fractions d'élution sont injectées en UPLC après avoir été filtrées avec un filtre PET à 0,20 µm.

### **c) Séparation et concentration des dihydrochalcones**

Les cartouches d'extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction, SPE) sont vendues sèches. Il est nécessaire, dans un premier temps, de les conditionner avec du méthanol puis de les équilibrer avec de l'eau. Le dépôt de la solution à séparer est alors effectué puis l'élution de la colonne avec plusieurs solvants permet de récupérer différentes fractions. Le volume des colonnes varie selon la taille des cartouches. De ce fait, les volumes de solvant et les protocoles utilisés sont résumés ci-après :

● **Cartouche Chromabond C18ec 200 mg (Macherey-Nagel, France)**

- conditionnement : 5 ml méthanol
- équilibrage : 5 ml eau
- dépôt : jusqu'à 30 ml d'extrait de peau de pomme *Golden*
- éluions : 2x10 ml eau/méthanol (85:15)  
1x5 ml eau/méthanol (80:20)  
1x5 ml méthanol 100 %

● **Cartouche Chromabond C18ec 5 g (Macherey-Nagel, France)**

- conditionnement : 30 ml méthanol
- équilibrage : 30 ml eau
- dépôt : jusqu'à 100 ml d'extrait de peau de pomme *Golden*
- éluions : 1x50 ml eau/méthanol (75:25)  
2x25 ml eau/méthanol (75:25)  
1x25 ml méthanol 100 %

● **Cartouche Chromabond C18ec 100 g (Macherey-Nagel, France)**

- conditionnement : 50 ml méthanol
- équilibrage : 50 ml eau
- dépôt : 1 g d'échantillon WT06 mis en solution dans 20 ml d'eau distillée
- éluions : 200 ml eau/méthanol (75:25)  
300 ml eau/méthanol (70:30)  
50 ml méthanol 100 %
- rinçage : 200 ml méthanol 100 %

## 5. Conditions chromatographiques

### a) Conditions chromatographiques UPLC-UV/visible

Plusieurs gradients ont été mis au point au fur et à mesure de l'avancement des manipulations. Au départ, une colonne de 50 mm avec un gradient dit « rapide » (condition UPLC 1) était utilisée afin de pouvoir étudier le profil général des solutions. Le gradient a ensuite été optimisé (condition UPLC 2) afin d'améliorer la séparation des composés. Finalement une colonne de 150 mm (condition UPLC 3) a été retenue car elle permet une meilleure résolution et une quantification plus spécifique des différentes dihydrochalcones. Enfin un gradient optimisé pour la séparation des dihydrochalcones a été mis au point (condition UPLC 4).

● **Condition UPLC 1 :**

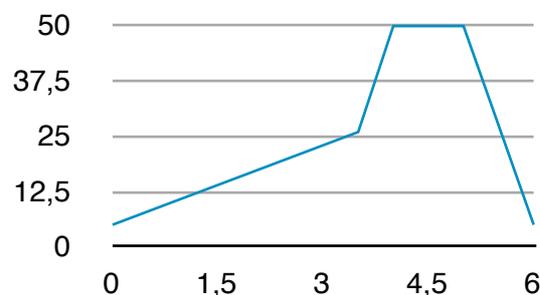
Colonne : Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x50 mm

- Phases mobiles :
  - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide phosphorique R (v/v)
  - phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

5-26-50-50-5 %B (0-3,5-4-5-6 min)

- débit : 0,6 ml/min
- injection : 0,80 µl
- température de la colonne : 40°C
- spectrophotomètre à 285 nm



● **Condition UPLC 2 :**

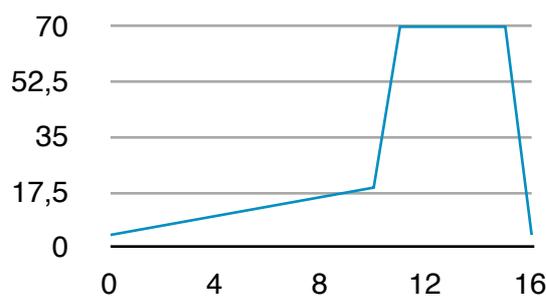
Colonne : Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x50 mm

- Phases mobiles :
  - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide phosphorique R (v/v)
  - phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

4-19-70-70-4 %B (0-10-11-15-16 min)

- débit : 0,6 ml/min
- injection : 0,80 µl
- température de la colonne : 40°C
- spectrophotomètre à 285 nm



● **Condition UPLC 3 :**

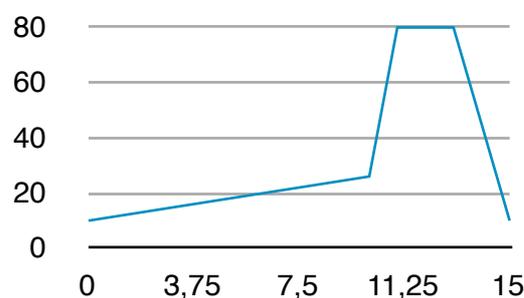
Colonne : Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x150 mm

- Phases mobiles :
  - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide phosphorique R (v/v)
  - phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

10-26-80-80-10 %B (0-10-11-13-15 min)

- débit : 0,40 ml/min
- injection : 2,5 µl
- température de la colonne : 40°C
- spectrophotomètre à 285 nm



### ● **Condition UPLC 4 :**

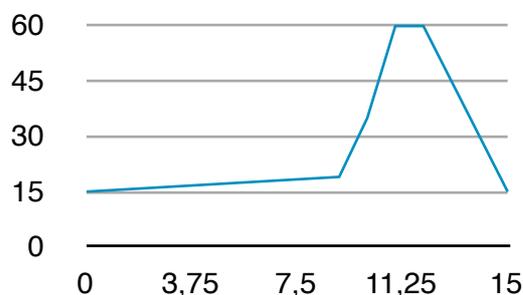
Colonne : Acquity UPLC® BEH C18 1,7 µm 2,1x150 mm

- Phases mobiles :
  - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide phosphorique R (v/v)
  - phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

15-19-35-60-60-15 %B (0-9-10-11-12-15 min)

- débit : 0,425 ml/min
- injection : 2,5 µl
- température de la colonne : 40°C
- spectrophotomètre à 285 nm



### **b) Conditions chromatographiques HPLC-UV/visible**

Phase mobile : - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide phosphorique R (v/v)

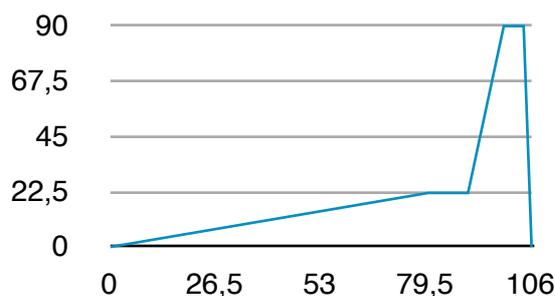
Sur la chaîne HPLC-MS-MS, on remplace l'acide phosphorique R par l'acide acétique.

- phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

0-22-22-90-90-0 %B (0-80-90-99-104-106 min)

- débit : 1 ml/min en split
- injection : 20 µl
- spectrophotomètre à 285 nm



### **c) Conditions chromatographiques HPLC-MS-MS**

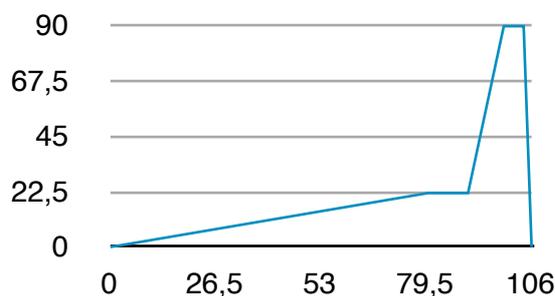
Phase mobile : - phase mobile A : eau milliQ à 0,1 % d'acide acétique (v/v)

- phase mobile B : acétonitrile

- sous forme de gradient :

0-22-22-90-90-0 %B (0-80-90-99-104-106 min)

- débit : 1 ml/min en split
- injection : 20 µl
- mode d'ionisation : électrospray positif
- tension de l'aiguille de nébulisation : 5000 V
- pression et température du gaz séchant 20 PSI à 350°C
- pression du gaz de nébulisation : 47 PSI
- température de la source : 50°C
- détecteur : 1100 V
- masses détectées : 100-800 m/z



## 6. Calcul du taux de recouvrement

Le taux de recouvrement aussi appelé rendement de récupération dans la suite de ce mémoire a été calculé par la formule :

$$R = 100 \times \text{Quantité finale} / \text{Quantité initiale}$$

en considérant la *quantité initiale* comme la quantité de produit déposée sur la cartouche et la *quantité finale* comme celle récupérée.

## B. Résultats et discussion

### 1. Identification des dihydrochalcones

#### a) Par UPLC - UV/visible

Les deux seules dihydrochalcones de référence disponibles dans le commerce, la phlorizine et la phlorétine, ont été injectées en UPLC (condition UPLC 4) (Figure 37). Leurs temps de rétention sur cette colonne sont respectivement de 10,1 min et de 11,5 min. Leurs spectres UV sont très semblables avec un maximum d'absorption à 285 nm et un épaulement vers 220 nm (Figure 38).

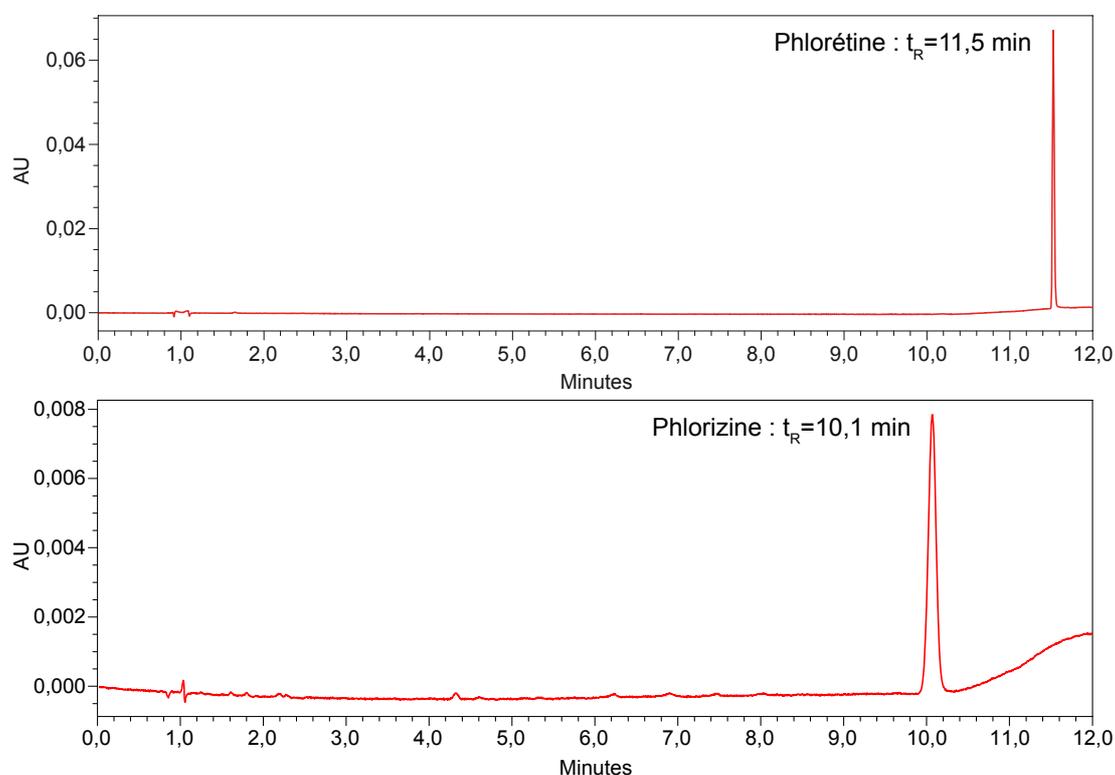


Figure 37 : Chromatogrammes de la phlorétine (en haut) et de la phlorizine (en bas) obtenus par UPLC (condition UPLC 4)

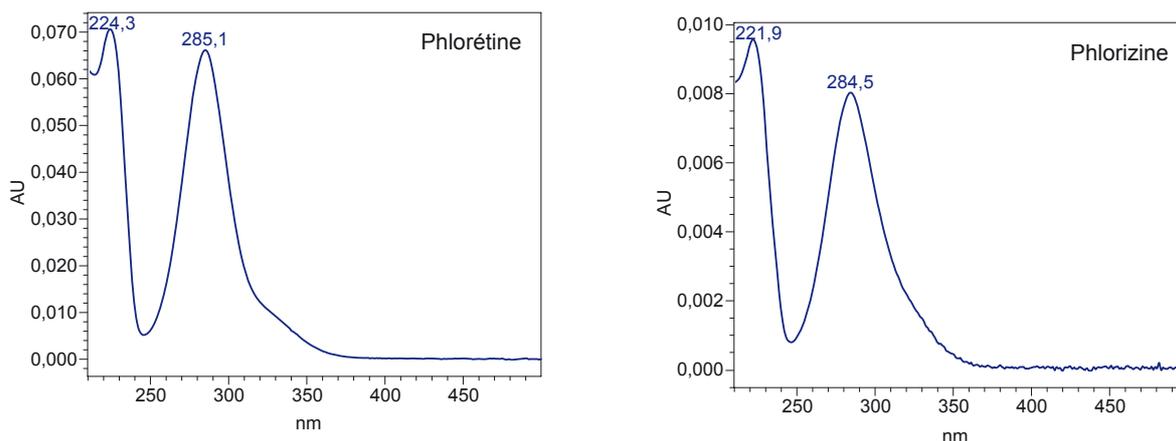


Figure 38 : Spectres UV de la phlorétine (à gauche) et de la phlorizine (à droite)

D'après le temps de rétention ( $t_R$ ) et le spectre d'absorption UV, la présence de la phlorizine a été mise en évidence dans tous les échantillons de pomme analysés (Figure 40). Par ailleurs, la littérature a permis d'identifier trois autres dihydrochalcones connues : la phlorétine-2'-xyloglucoside, l'hydroxyphlorizine et l'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside. En l'absence de substance de référence, l'identification s'est faite en se basant sur les  $t_R$  relatifs des pics, dépendant de leur polarité, et les spectres UV (Figure 39). Ainsi, la phlorétine-2'-xyloglucoside possède un temps de rétention  $t_R = 7,7$  min, l'hydroxyphlorizine un  $t_R = 6,9$  min et l'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside un  $t_R = 5,0$  min.

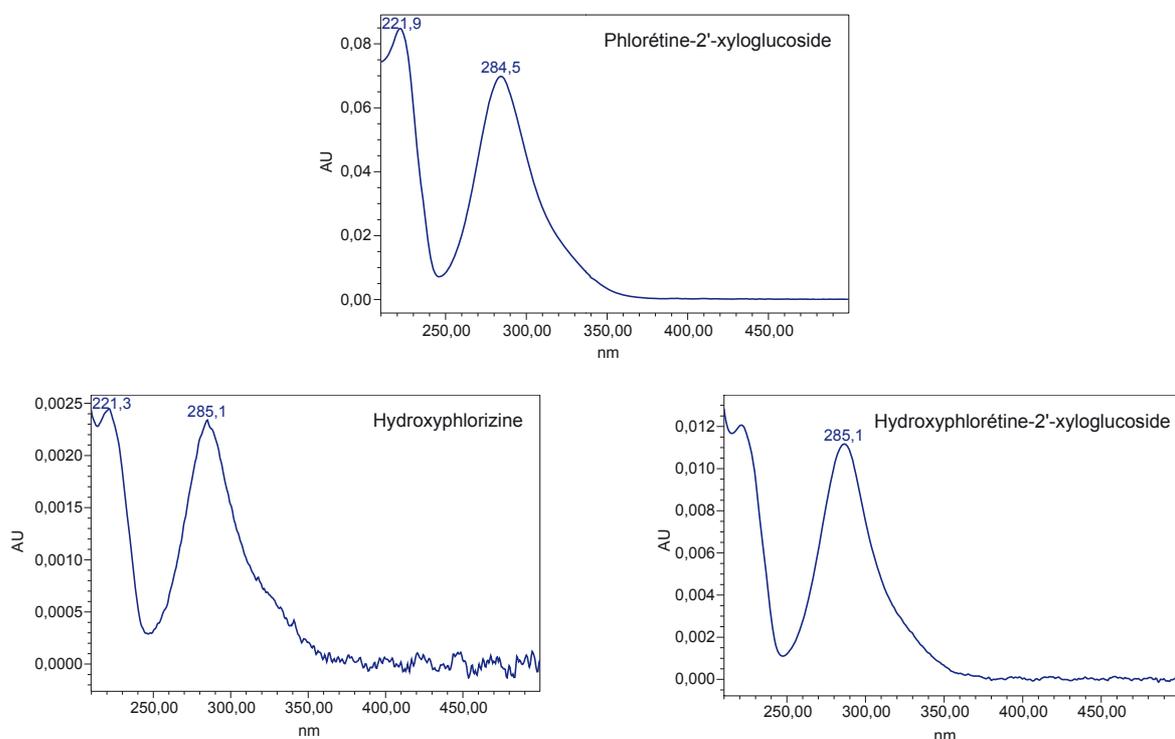


Figure 39 : Spectres UV de la phlorétine-2'-xyloglucoside ( $t_R = 7,7$  min), l'hydroxyphlorizine ( $t_R = 7,0$  min) et l'hydroxyphlorétine-2'-xyloglucoside ( $t_R = 5,0$  min)

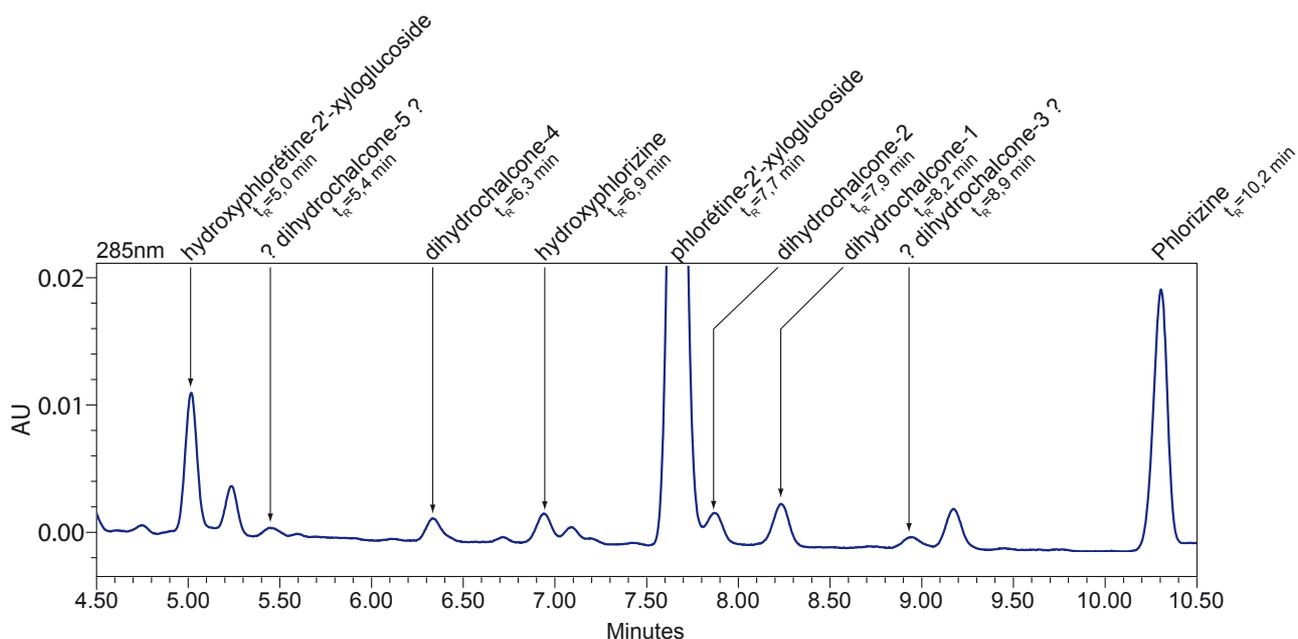


Figure 40 : Détail d'un chromatogramme de jus de pomme Weirouge (condition UPLC 4)

D'autre part, les pics à  $t_R = 7,9$  min et  $t_R = 8,2$  min, présents dans tous les échantillons de pomme analysés dans les conditions 4 d'UPLC, semblent être des dihydrochalcones d'après leurs spectres UV très semblables aux autres dihydrochalcones (Figures 40 et 41). Ils ont été nommés respectivement dihydrochalcone-2 et dihydrochalcone-1. Seules des analyses de masse et de RMN pourraient confirmer leur structure de dihydrochalcone.

De plus, un pic à  $t_R = 6,3$  min, nommé dihydrochalcone-4 a été mis en évidence dans les jus de *Weirouge* et de *Boskoop* bruts de sortie de pressoir. Par ailleurs, deux autres pics, un à  $t_R = 5,4$  min, nommé dihydrochalcone-5 et l'autre à  $t_R = 8,9$  min, nommé dihydrochalcone-3 pourraient aussi être des dihydrochalcones. Cependant ces composés étant présents à des concentrations si faibles, proches de la limite de détection, leurs spectres UV ne sont pas réellement interprétables. De plus ils n'ont été mis en évidence que dans un seul jus de pomme. Il se pourrait, tout comme pour le composé dihydrochalcone-4 qu'ils soient des produits de dégradation d'autres dihydrochalcones issues du pressage du jus.

Ces trois derniers composés ont pu être mis en évidence dans le jus de pomme car les dérivés de la quercétine élués à des temps de rétentions voisins des dihydrochalcones en sont absents, ou y présents en très faibles concentrations. Ils n'ont cependant pas pu être détectés dans la pulpe. Bien que des pics correspondant à leurs temps de rétention soient présents, leurs spectres UV ne sont pas interprétables du fait de la faible concentration des composés. Il serait nécessaire de purifier et concentrer grandement les extraits de pulpe pour confirmer ces résultats et démontrer que ces produits sont présents naturellement dans la pomme.

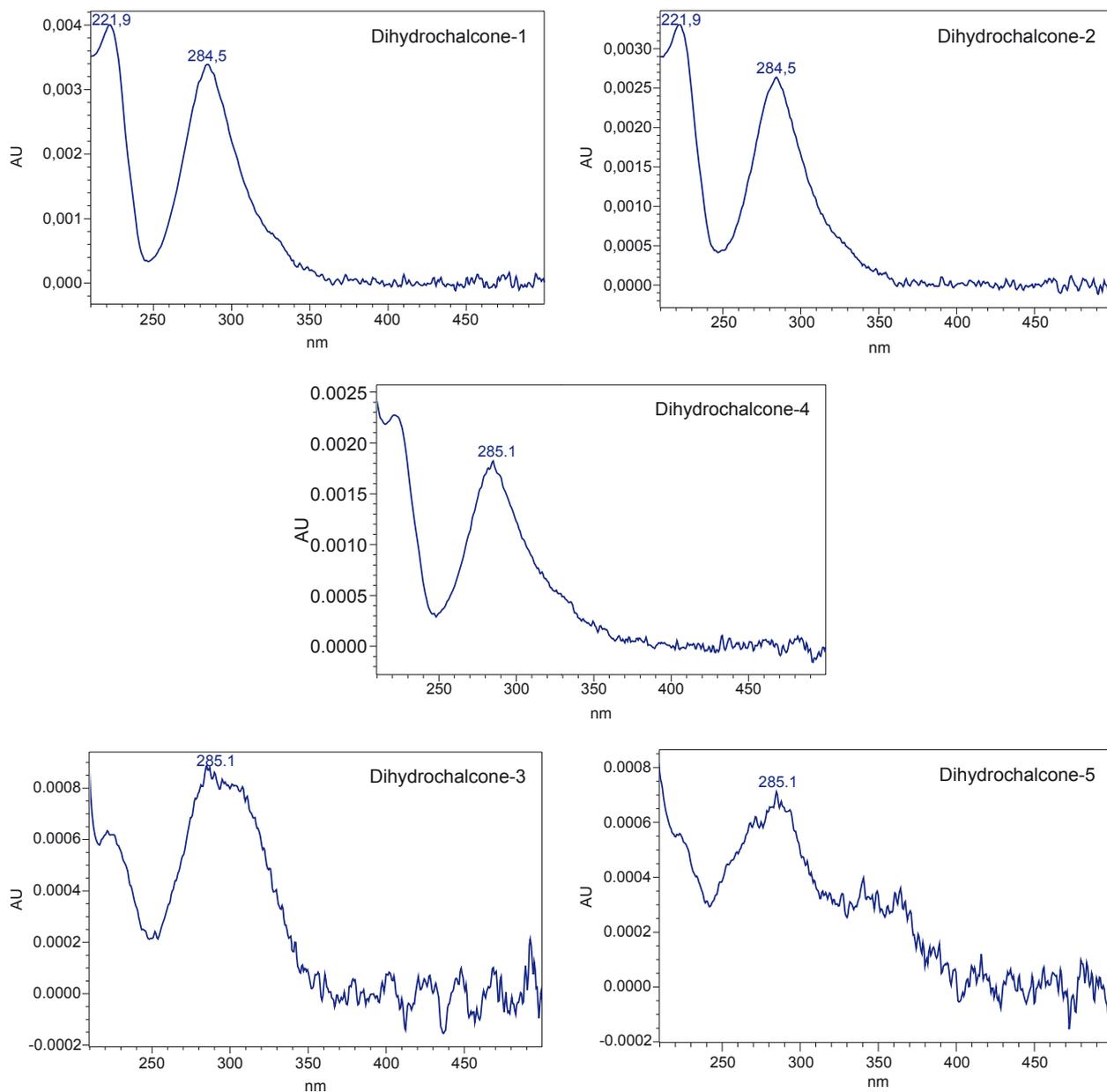


Figure 41 : Spectres UV des pics à  $t_R = 5,4$  min (Dihydrochalcone-5),  $t_R = 6,3$  min (Dihydrochalcone-4),  $t_R = 7,9$  (Dihydrochalcone-2) min,  $t_R = 8,2$  min (Dihydrochalcone-1), et  $t_R = 8,9$  min (Dihydrochalcone-3)

Enfin, lors des étapes de fractionnement sur SPE, d'autres composés ayant des spectres UV très proches de celui de la phlorizine ont été identifiés avec certains échantillons et dans certaines conditions de séparation. Ces composés présents en très faibles quantités sont masqués car co-élués dans les extraits bruts. Bien que leur identification n'ait pas été possible lors de ces manipulations, cela démontre qu'il reste beaucoup de progrès et de recherches à faire sur l'identification et le dosage des dihydrochalcones dans la pomme. De nouvelles dihydrochalcones restent certainement à découvrir.

## **b) Par HPLC - MS-MS**

Toutes les dihydrochalcones, aussi bien aglycones que glycosides, ont des spectres UV très semblables, la seule technique qui permette une identification claire et sans ambiguïté est la spectroscopie de masse. Cependant, le spectromètre de masse du laboratoire n'est pas relié à l'UPLC, cette technique a été utilisée associée à une séparation par HPLC. Ainsi les temps de rétention sont modifiés et la séparation, de moins bonne résolution, ne permet pas d'analyser toutes les dihydrochalcones identifiées par UPLC.

## **c) Intérêt de l'UPLC par rapport à l'HPLC**

L'UPLC ou *Ultra Performance Liquid Chromatography* est une technique très récente qui apporte une nouvelle dimension à la chromatographie liquide. L'UPLC permet de faire des séparations à très haute pression en utilisant des colonnes plus petites et un débit plus faible qu'en HPLC.

L'utilisation d'une granulométrie très fine (1,7  $\mu\text{m}$ ) permet un gain significatif en efficacité qui est maintenu à des débits et vitesses linéaires beaucoup plus élevés. Ainsi, la vitesse et la capacité de pics (correspondant au nombre de pics résolus par unité de temps), peuvent atteindre des performances inaccessibles auparavant [83].

D'après le fabricant Waters, l'utilisation de particules inférieures à 2  $\mu\text{m}$  sur une chaîne UPLC permet d'obtenir une efficacité 3 fois supérieure et une résolution supérieure de 70 % à celle qui peut être obtenue avec des particules de 5  $\mu\text{m}$ . La longueur de la colonne peut ainsi être divisée par 3 en conservant la même efficacité de séparation (en transposant la méthode) et les séparations peuvent être réalisées à un débit trois fois supérieur. De ce fait, la vitesse d'analyse est multipliée par neuf sans perte de résolution. En accélérant ainsi la vitesse d'analyse, on peut obtenir une sensibilité supérieure de 70 % car les pics sont plus fins et donc plus allongés.

Tout ceci a été confirmé lors des manipulations au laboratoire. Une analyse de 85 minutes par HPLC est réduite à 9 minutes par UPLC en gardant une séparation assez semblable (Figure 42).

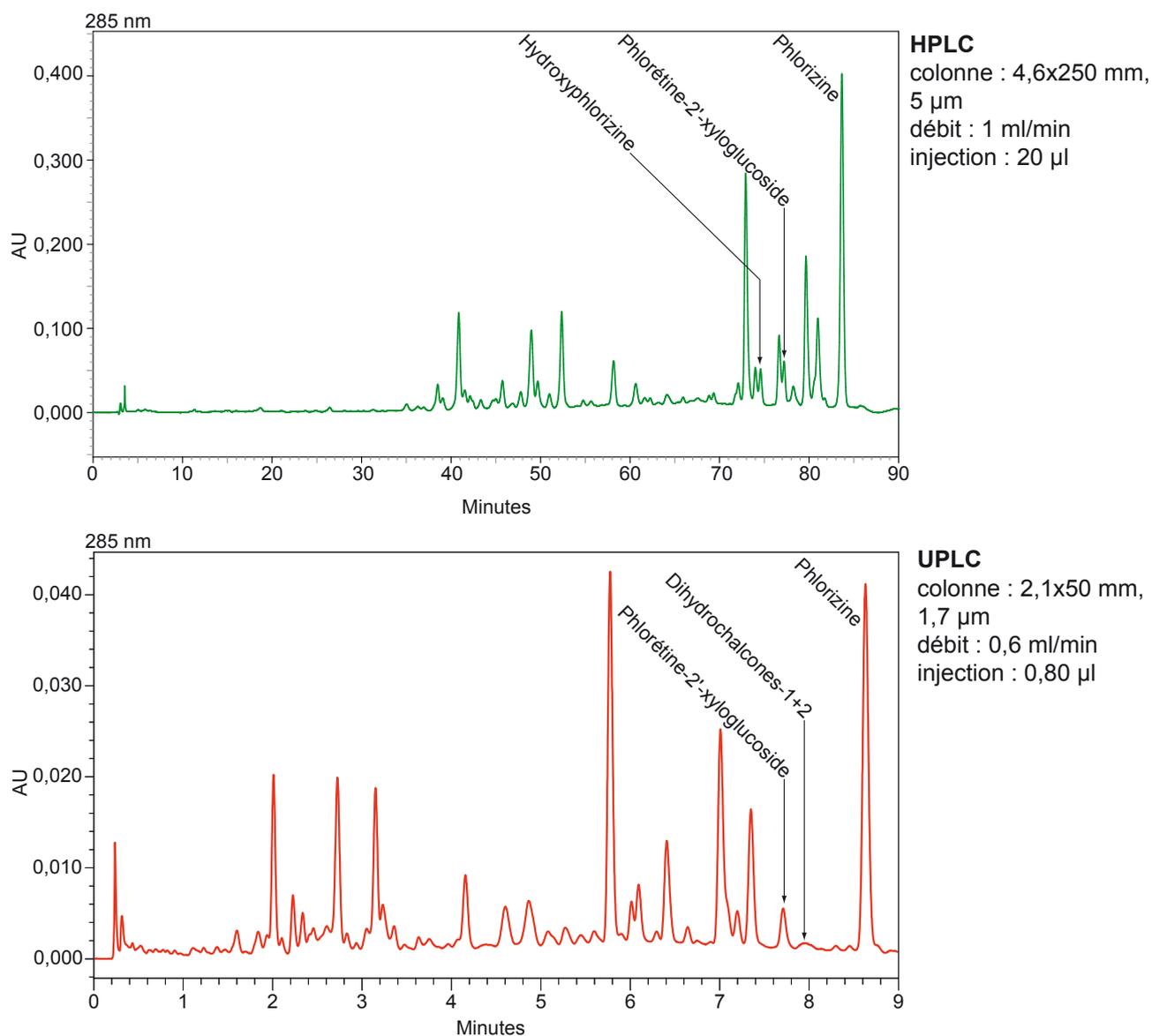


Figure 42 : Chromatogrammes en HPLC (en haut) et en UPLC (condition UPLC 2, en bas) d'un extrait de pomme Boskoop

#### d) Amélioration de la résolution en UPLC

Plusieurs colonnes C18 ont été utilisées sur la chaîne UPLC. Dans un premier temps, une colonne de 50 mm permettait d'obtenir rapidement le profil polyphénolique de fractions issues de séparations par SPE ou Flash Chromatographie.

En effet, lors des étapes de séparation par fractionnement, il est intéressant de disposer de techniques rapides d'analyses afin de savoir si les composés d'intérêt ont été séparés ou s'ils sont toujours fixés à la colonne. Souvent la technique de chromatographie sur couche mince est utilisée. Or dans le cas présent, la révélation des plaques était impossible car les dihydrochalcones sont présentes en trop faible quantité. Il a été ainsi possible de développer, grâce à cette colonne de taille très réduite (50 mm), une méthode extrêmement rapide

(condition UPLC 1) qui permet de réaliser une analyse en trois minutes seulement mais avec une mauvaise résolution (Figure 43).

Par la suite, une méthode d'une durée plus longue (condition UPLC 2) sur la même colonne de 50 mm a permis de réaliser les analyses en neuf minutes tout en retrouvant une résolution équivalente à celle obtenue par HPLC.

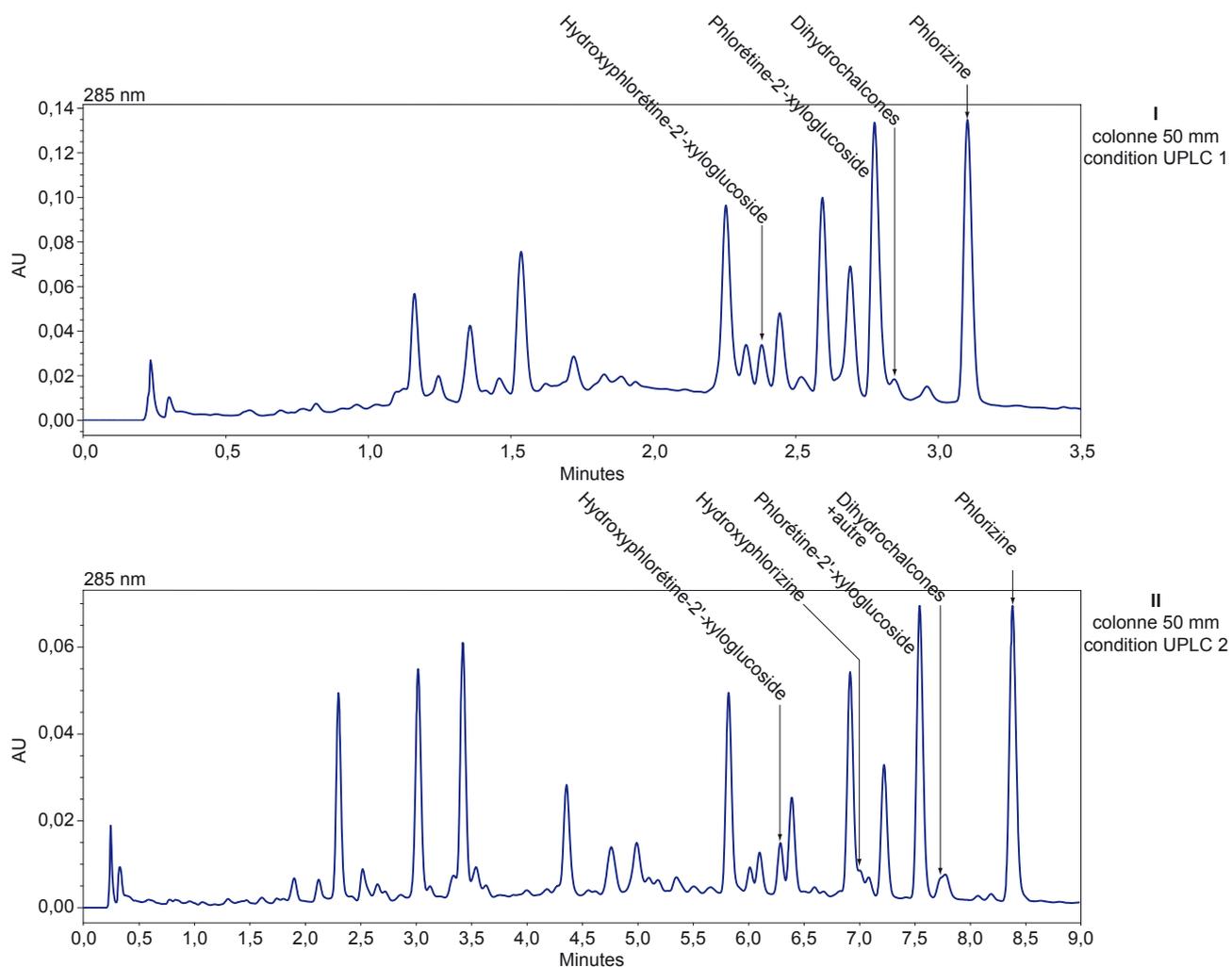


Figure 43 : Chromatogrammes d'un même extrait de peau de Bohnapfel selon 2 méthodes :  
I colonne 50 mm (condition UPLC 1) ; II colonne 50 mm (condition UPLC 2)

Enfin, afin de doser sélectivement les différentes dihydrochalcones identifiées, il était nécessaire d'améliorer la séparation. Ceci étant impossible sur la colonne de 50 mm, une colonne de 150 mm a été utilisée. Une première méthode (condition UPLC 3) a permis d'augmenter la résolution pour une durée d'analyse inchangée.

Finalement, comme le dosage s'effectuait sur les composés les plus hydrophobes ayant des  $t_R$  supérieurs à cinq minutes, le gradient a été accéléré en début d'analyse pour éluer les composés les plus hydrophiles plus rapidement et a été ralenti par la suite pour augmenter la

séparation des dihydrochalcones sans avoir à augmenter le temps général d'analyse à plus de dix minutes (condition UPLC 4). Cette dernière méthode n'offre plus aucun pouvoir de séparation des composés phénoliques plus polaires (ayant un temps de rétention inférieur) mais permet une résolution maximale des pics des dihydrochalcones.

C'est grâce à ces avancées technologiques et méthodologiques qu'il a été possible de mettre en évidence des dihydrochalcones non encore décrites dans la bibliographie (Figure 44).

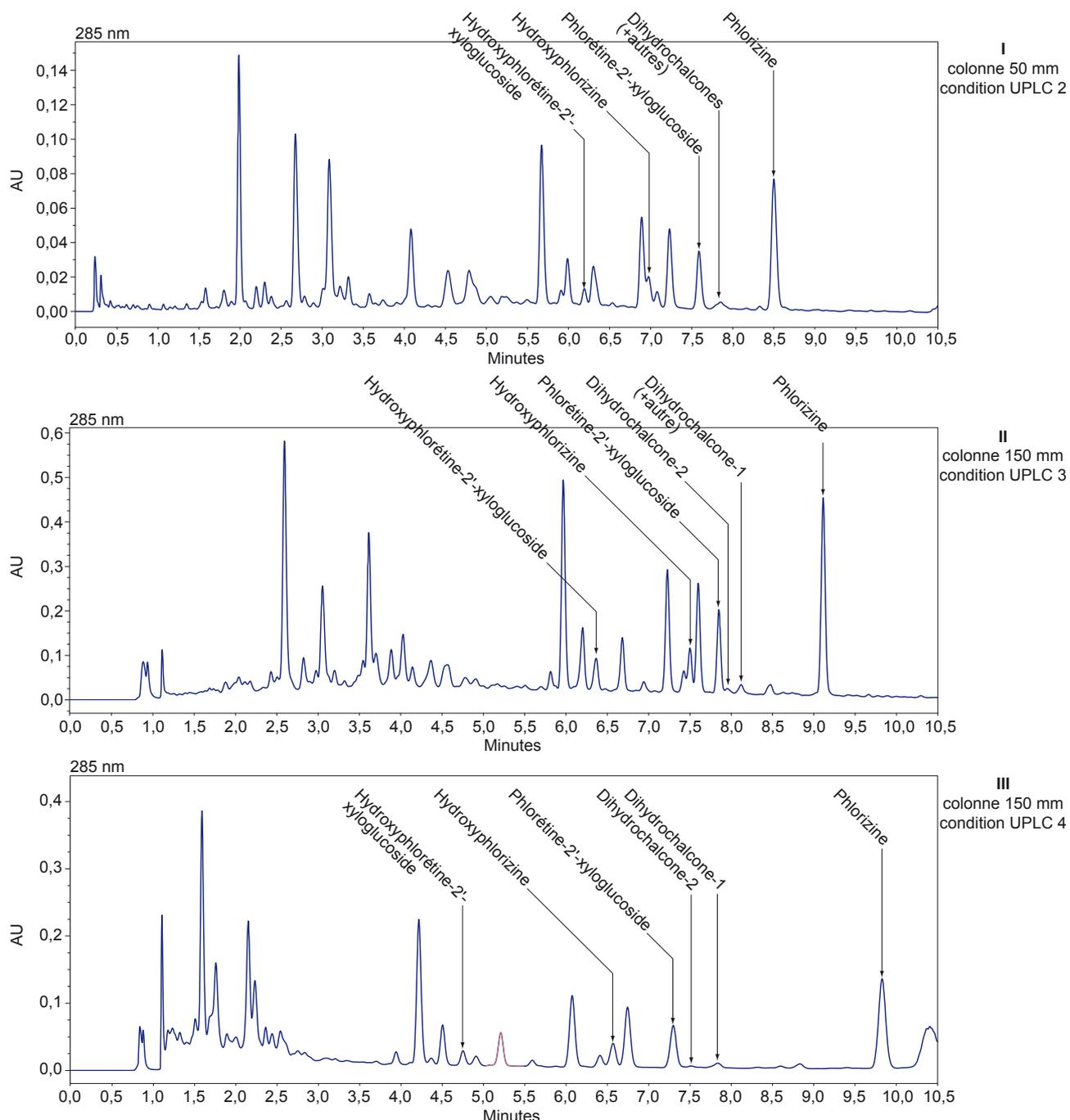


Figure 44 : Chromatogrammes d'un même extrait de peau de Golden selon 3 méthodes : I colonne 50 mm (condition UPLC 2) ; II colonne 150 mm (condition UPLC 3) ; III colonne 150 mm (condition UPLC 4)

## 2. Extraction

Avant toute analyse, l'étape d'extraction est primordiale dans l'étude de composés issus d'une matrice alimentaire. La pomme renferme énormément de composés et il est nécessaire de recueillir principalement les composés souhaités avec un rendement acceptable afin de proposer des résultats d'analyse de qualité. Ainsi, beaucoup d'essais ont été effectués pour améliorer l'extraction à partir d'échantillons de peau, de chair et de résidu de pressage qui, une fois lyophilisés et broyés, sont extraits de la même façon. Cependant, le jus de pomme est à considérer de manière différente. En effet, il peut être analysé directement après filtration, mais des méthodes d'extraction doivent être mises en place afin de concentrer les dihydrochalcones qui y sont en faibles concentrations.

### a) La peau, la chair et le moût

La littérature fait état de nombreux mélanges de solvants utilisés pour extraire les polyphénols des pommes lors de l'étude de leur profil polyphénolique. Le solvant le plus utilisé est un mélange méthanol/eau (80/20) auquel est très souvent ajouté un peu d'acide acétique. Cependant, cette étape n'est que peu discutée alors que c'est une étape clé dans la quantification des différents polyphénols.

C'est pourquoi, différents solvants tels que l'eau pure, l'eau contenant 1 % d'acide acétique, différentes quantités de méthanol pur, du méthanol contenant 1 % d'acide acétique ainsi qu'un mélange méthanol/eau (80/20) ont été comparés en suivant le protocole E.01.

Puisque la teneur en dihydrochalcones de la peau des pommes *Golden* n'est pas connue, il n'est pas possible de calculer le taux de recouvrement d'extraction dans chaque cas. Les surfaces des pics identifiés sont utilisées afin de comparer l'efficacité d'extraction des différents solvants (Figure 45).

Il apparaît que 5 fois moins de dihydrochalcones sont extraits avec 10 ml d'eau pure qu'avec 5 ml de méthanol pur. De plus l'ajout d'acide acétique (1 %) comme c'est souvent le cas ne modifie pas significativement l'extraction en utilisant du méthanol mais améliore l'extraction avec l'eau.

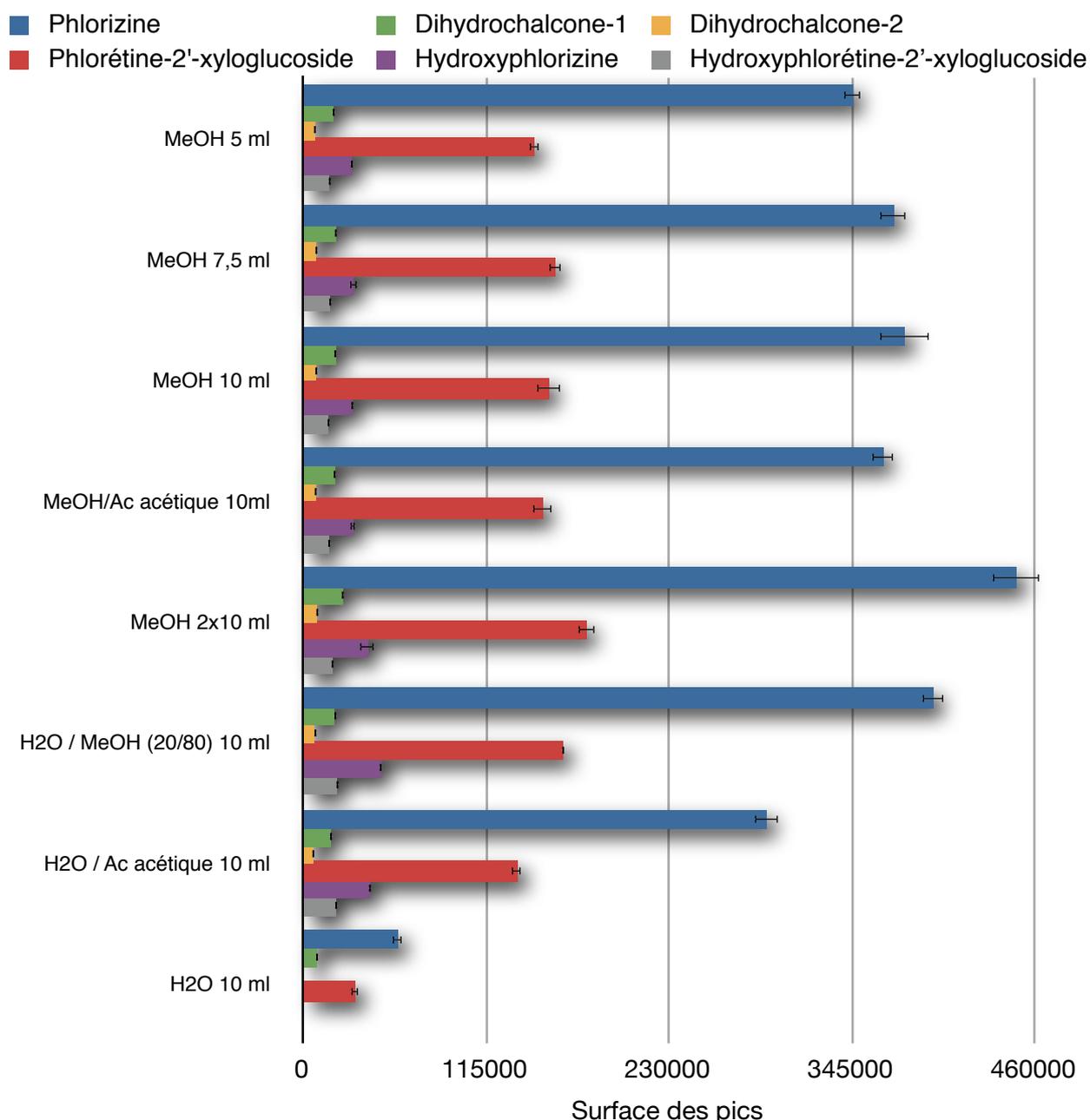


Figure 45 : Surface de pic des dihydrochalcones après extraction de 100 mg de peau de Golden avec différents solvants d'extraction

Le méthanol reste le solvant le plus approprié puisque 5 ml suffisent pour extraire 77 % de la phlorizine et 10 ml permettent d'atteindre un taux de recouvrement de 84 %, en considérant la double extraction par 10 ml de méthanol comme complète. En effet, une troisième extraction ne s'est pas révélée nécessaire. Le gain apporté par une extraction avec 10 ml par rapport à 7,5 ml n'est pas significatif. En revanche, une double extraction avec 10 ml de méthanol permet d'augmenter significativement le rendement d'extraction. Finalement le mélange eau/méthanol s'avère être un excellent solvant d'extraction des dihydrochalcones très comparable au méthanol pur. Cependant, il est beaucoup plus pratique de n'utiliser que 10 ml de méthanol pur qui peut être facilement évaporé à l'évaporateur rotatif (42°C, 160 mBar) afin d'obtenir un extrait sec.

Ainsi, 10 ml de méthanol pour 100 mg de pelures de pommes semblent être un bon rapport d'extraction. Selon le protocole E.04, en gardant le même rapport volume de solvant sur masse d'échantillon, une seule extraction suffit pour obtenir un rendement d'extraction de plus de 90 % (Figure 46). Comme précédemment, les surfaces des pics des chromatogrammes ont été utilisées en considérant que la somme des surfaces des deux extractions représente 100 % d'extraction.

De cette façon, la première extraction permet d'obtenir 94 % de la phlorizine et 96 % de la phlorétine-2'-xyloglucoside. Ainsi pour une grande quantité de peau de *Golden*, la proportion masse/volume de solvant définie précédemment permet une extraction efficace en une seule étape. Cette extraction peut nécessiter d'importants volumes de méthanol surtout si l'on souhaite traiter une plus grande quantité de pommes mais le méthanol peut facilement être recyclé en l'évaporant et en le recueillant à l'évaporateur rotatif.

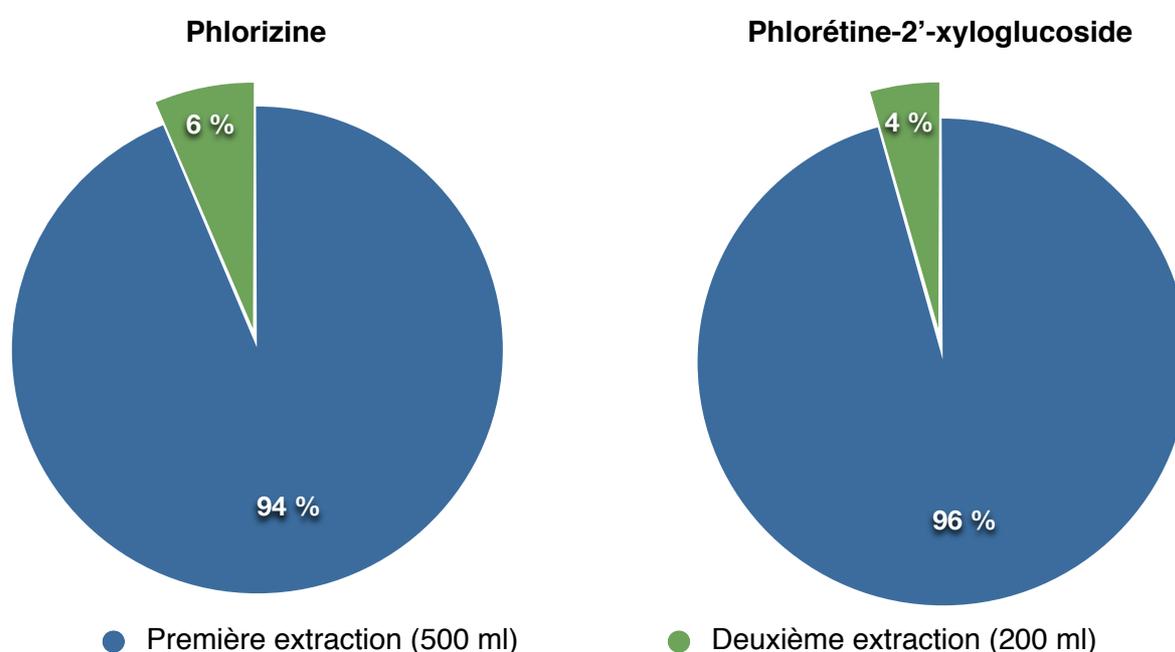


Figure 46 : Rendements d'extraction des deux dihydrochalcones majoritaires de la peau de pomme Golden

## b) Le jus de pomme

### (1) Mise au point de colonnes de PVPP

Dans l'industrie du vin et de la bière, la PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) est mise en suspension dans le vin puis filtrée après 15 minutes de contact environ [84]. Lors de sa régénération, les composés qui y sont fixés sont le plus souvent détruits par le milieu alcalin et les polyphénols sont ainsi perdus. Il serait cependant intéressant de pouvoir récupérer ces polyphénols.

C'est dans cette optique qu'ont été imaginées des colonnes de PVPP sur lesquelles le jus de pomme serait déposé. Les polyphénols du jus restant fixés à la PVPP, il suffirait par la suite d'éluer la colonne avec un solvant adapté capable de les décrocher sans les détruire. Cette méthode originale permettrait d'obtenir une fraction riche en polyphénols issus du jus de pomme tout en éliminant une grande majorité des sucres, des pectines, mais aussi l'eau (Figure 47).

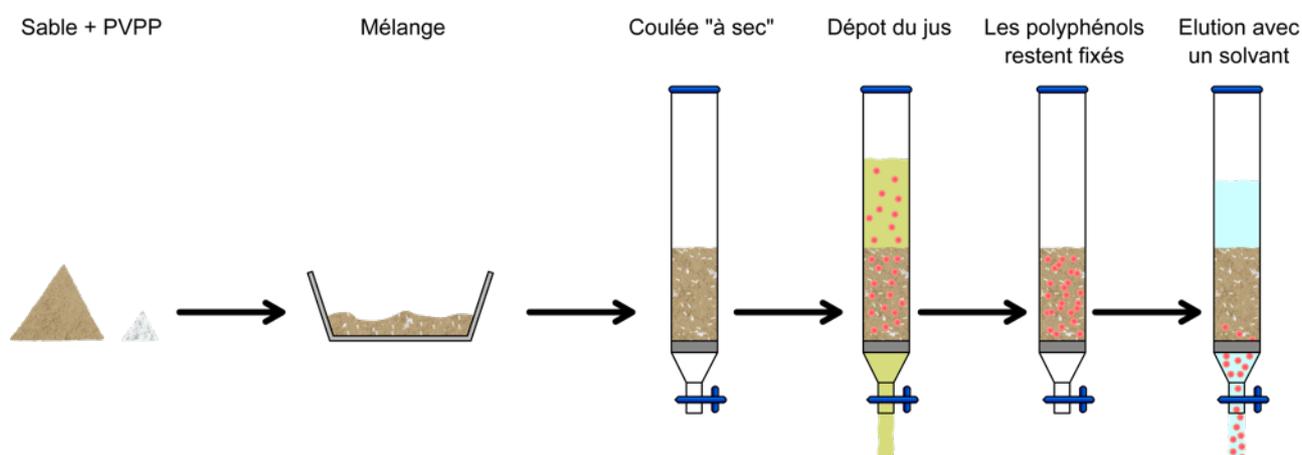


Figure 47 : Protocole de mise au point et d'utilisation de colonnes de PVPP

Cependant les premiers essais se basant sur des colonnes composées uniquement de PVPP se sont avérés non concluants. En effet, au bout de quelques secondes, le solvant ne s'écoulait plus dans la colonne. Du fait de sa texture très fine qui gonfle au contact de l'eau la PVPP colmatait la colonne. Ses propriétés vont à l'encontre d'une utilisation comme phase stationnaire pour une colonne.

Afin d'augmenter la granulométrie de la phase et ainsi favoriser l'écoulement des solvants d'élution, du sable de Fontainebleau a été ajouté à la PVPP. Il faut respecter un rapport d'environ 20 fois plus de sable que de PVPP pour obtenir un débit acceptable dans les colonnes en verre Sigma utilisées. Néanmoins ce rapport peut varier de manière très importante selon le diamètre et la hauteur de la colonne. Afin d'obtenir une phase assez homogène, il est nécessaire de mélanger les deux composés à sec puis « couler » la colonne en l'absence de tout solvant. Enfin, la colonne peut être conditionnée avec quelques millilitres d'eau pour faire gonfler la PVPP ou alors le jus peut être directement déposé sur ce support.

## **(2) Optimisation du solvant d'élution**

Dans un premier temps, différents solvants d'élution tels que l'acétonitrile, l'éthanol et l'isopropanol ont été comparés au méthanol selon le protocole E.04. Il s'est avéré que le méthanol était le plus approprié d'autant qu'il présente les avantages d'être peu onéreux, facilement évaporable et donc recyclable.

Dans un deuxième temps, les polyphénols étant retenus par des liaisons hydrogènes à la PVPP, le méthanol a été utilisé en milieu alcalin. En effet, une augmentation du pH permet d'ioniser les fonctions phénols des noyaux aromatiques et ainsi de rompre les liaisons hydrogènes. Ainsi, des solutions méthanoliques contenant 1 %, ou 8 % d'ammoniaque à 25 % sont comparées au méthanol pur selon le protocole E.05. L'intérêt de l'ammoniaque est qu'elle est facilement évaporable à l'évaporateur rotatif et qu'il n'est ainsi pas nécessaire de neutraliser la solution.

En analysant à l'UPLC, le jus de pomme déposé sur les colonnes de PVPP et les fractions méthanoliques éluées, le rendement de récupération des différentes dihydrochalcones identifiées peut être calculé (Figure 48).

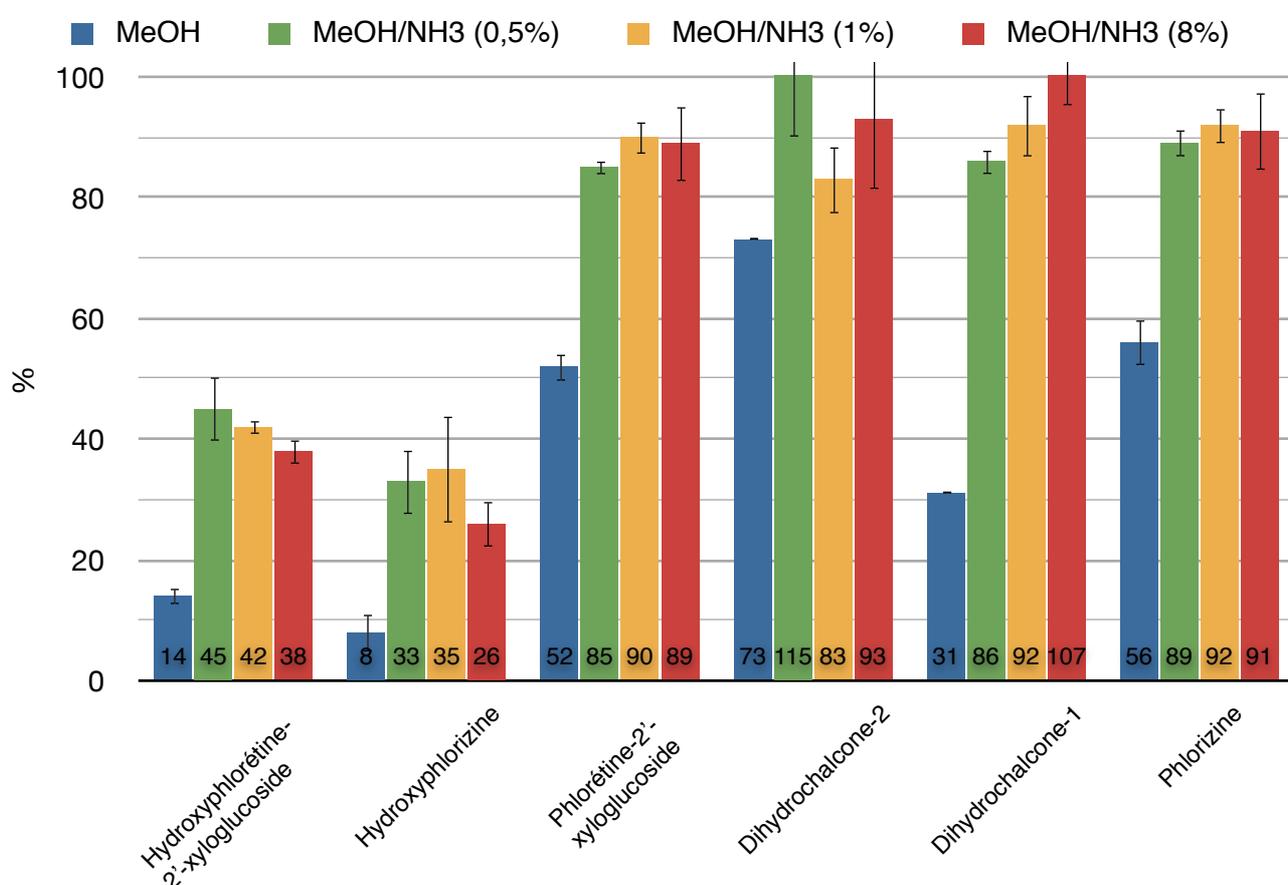


Figure 48 : Rendement de récupération des dihydrochalcones fixées sur une colonne de PVPP en utilisant 50 ml de 3 solvants d'éluion

L'ajout de 1 % d'ammoniaque au méthanol permet d'augmenter de manière significative le rendement de récupération des dihydrochalcones. En effet, le rendement de récupération de la phlorizine passe de 53 % pour le méthanol pur à 90 %. C'est un gain très important qui permet d'envisager la réalisation de plus grandes colonnes de PVPP. Cependant il faut noter que le rendement reste très faible et ne dépasse pas les 30 à 40 % pour les dérivés de l'hydroxyphlorétine, malgré l'ajout d'une base.

Par ailleurs, si l'ajout d'ammoniaque au méthanol est nécessaire, sa teneur n'importe pas. En effet, l'addition de plus de 1 % de solution ammoniacale n'a pas amélioré le rendement de récupération qui reste très semblable pour des solutions méthanoliques à 0,5, 1 ou 8 % d'ammoniaque. Étant donné que des valeurs inférieures à 0,5 % de solution ammoniacale n'ont pas été testées et afin d'être certain d'avoir une teneur en ammoniaque dont l'efficacité a été démontrée, la solution à 1 % est choisie pour les expériences futures.

### **(3) Optimisation du volume d'élution**

Le méthanol à 1 % de solution ammoniacale à 25 % est le solvant le plus adapté pour décrocher des polyphénols des colonnes de PVPP. Cependant 50 ml de solvant sont nécessaires pour obtenir des rendements corrects pour un dépôt initial de 7 ml de jus. Ces conditions ne sont pas envisageables dans l'optique de traiter plusieurs litres de jus et il a donc été nécessaire d'optimiser ce volume.

Les tentatives de diminuer le volume de solvant se sont montrées infructueuses. En utilisant moins de 50 ml de solvant pour 7 ml de jus déposé, la diminution de rendement était trop importante. Pour 40 ml de solvant, la diminution de rendement pouvait atteindre 20 %. Une diminution du volume de solvant d'élution n'est donc pas efficace.

Afin de réduire tout de même le volume de solvant, seulement 20 ml de méthanol/NH<sub>3</sub> ont été utilisés afin d'éluer plusieurs fois la même colonne après un dépôt de jus de pomme selon le protocole E.07.

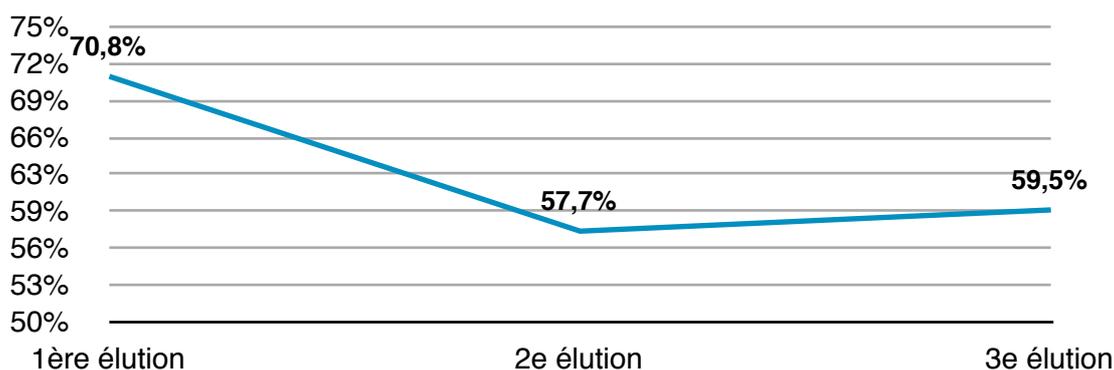


Figure 49 : Pourcentage de récupération de la phlorizine lors de 3 éluions successives avec les mêmes 20 ml de méthanol

Bien que le rendement de récupération soit de près de 71 % pour la phlorizine dès la première éluion (Figure 49), ce taux diminue à 58 % à la deuxième éluion. Il semblerait que la phlorizine soit re-fixée sur la colonne de PVPP. De plus, un état d'équilibre entre la solubilité du produit dans le solvant d'élution et son affinité pour la PVPP semble exister puisque le taux reste stable à la troisième éluion.

#### (4) Effet de la température

Dans l'idée de fragiliser les liaisons hydrogènes qui retiennent les dihydrochalcones à la PVPP, l'effet de la température a été étudié. Selon le protocole E.06, des solvants d'éluion à température ambiante ou préchauffé à 50°C ont été utilisés.

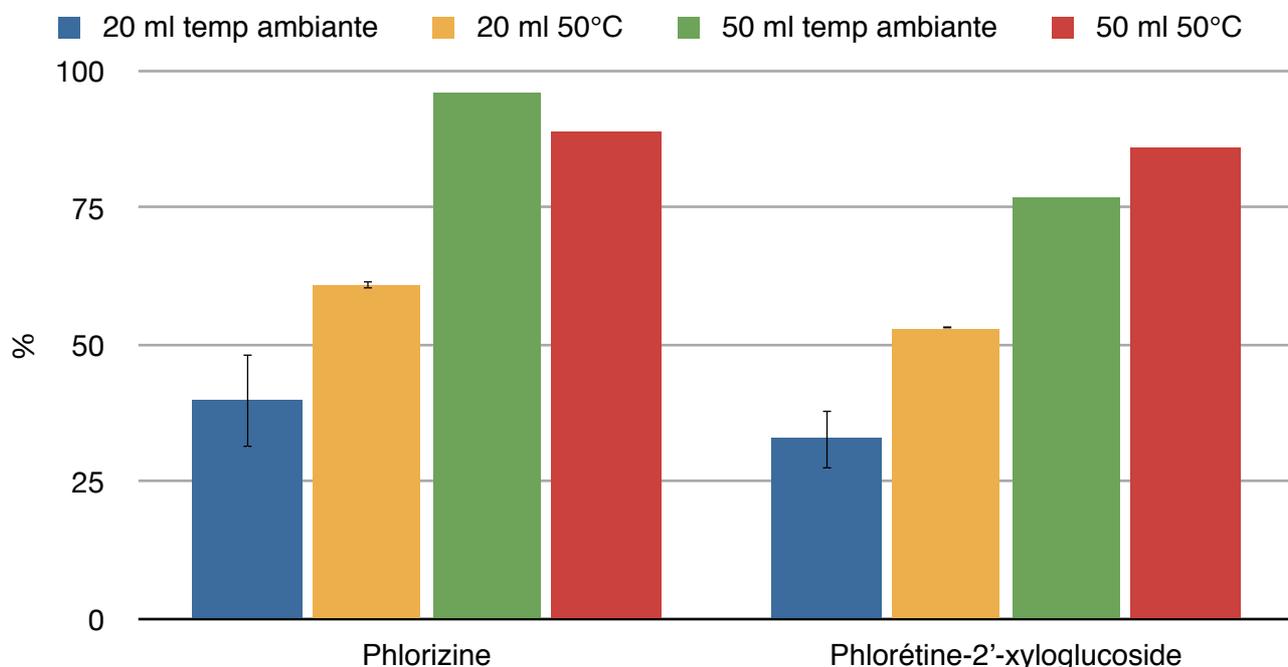


Figure 50 : Rendement de récupération de la phlorizine et la phlorétine-2'-xyloglucoside en utilisant du méthanol à 1 % de solution ammoniacale à température ambiante ou à 50°C

Pour un volume de 20 ml, l'élévation de la température permet d'augmenter le décrochage des dihydrochalcones de la PVPP (Figure 50). De plus, la diminution de l'écart-type indique que les résultats sont beaucoup plus répétables. Ayant eu des problèmes lors de l'injection en UPLC, les résultats pour un volume de 50 ml ne proviennent que d'une seule répétition. Si l'effet sur le rendement est contestable pour un volume plus important de solvant, l'élévation de la température apporte un avantage considérable lors de la manipulation. En effet, l'écoulement à travers la colonne se fait beaucoup plus rapidement. Ce gain de temps est non négligeable et permettrait de diminuer le rapport PVPP/sable. Ainsi il serait possible d'augmenter la quantité de PVPP et donc celle de jus déposé sur la colonne.

### 3. Étude de la teneur en dihydrochalcones

#### a) Comparaison de différentes variétés communes de pommes

Bien que la littérature abonde de données comparatives concernant les variations des profils polyphénoliques des différentes variétés de pomme, différentes pommes ont été examinées au cours des manipulations afin de sélectionner les plus riches en dihydrochalcones. Les résultats ne sont cependant pas significatifs car une seule pomme de chaque espèce a été analysée et une seule extraction a été réalisée. Le but de cette expérience était simplement d'étudier les profils phénoliques et ainsi de déterminer quelle pomme présentait la plus grande proportion de dihydrochalcones.

La grande disparité entre les différentes variétés a été confirmée (Figure 51). Les pommes *Boskoop* sont des pommes « communes », facilement disponibles dans le commerce, très riches en polyphénols et surtout en dihydrochalcones (Figure 52).

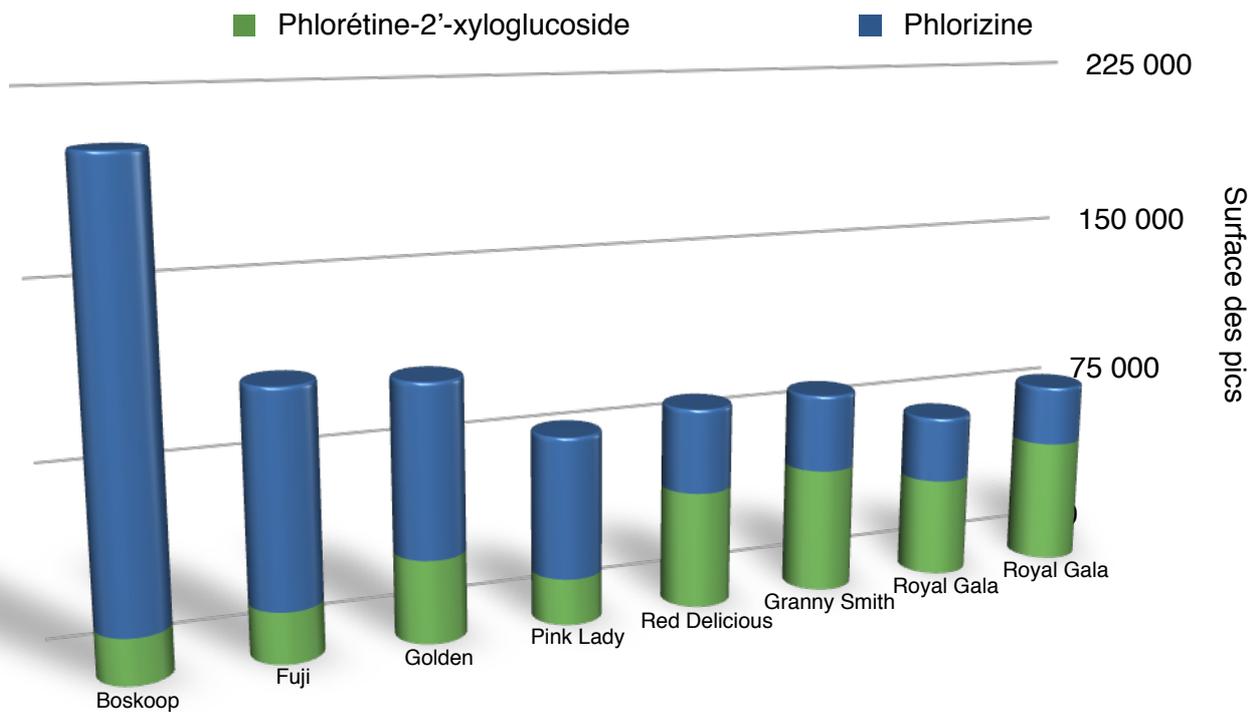


Figure 51 : Teneurs en phlorizine et phlorétine-2'-xyloglucoside dans les extraits de peau de différentes pommes

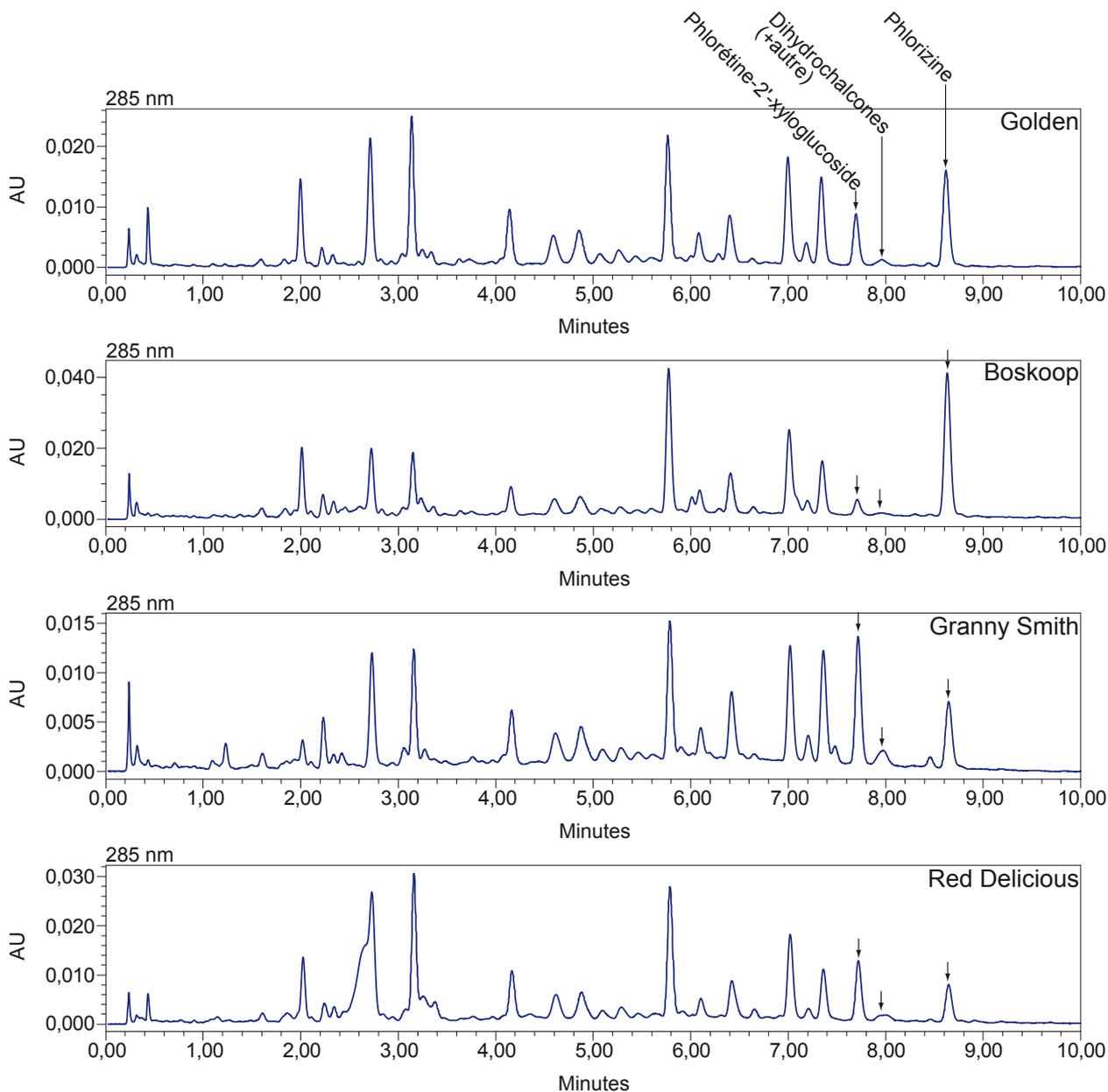


Figure 52 : Chromatogrammes d'extraits de pommes Golden, Boskoop, Granny Smith et Red Delicious (respectivement de haut en bas) (condition UPLC 2)

De plus, trois pommes *Bohnapfel* ont pu être analysées (mais pas par UPLC). Cette ancienne variété de pomme allemande a présenté des teneurs en dihydrochalcones très importantes. Cependant elles ne se conservent pas au delà du mois d'avril-mai et il a été impossible de s'en procurer ultérieurement. La peau de *Bohnapfel* a présenté une teneur en phlorizine très importante puisqu'elle était de 93,1 mg/kg de peau fraîche. Ceci est plus important que la peau de *Boskoop* qui a été analysée avec une teneur de 73,8 mg/kg. Ces valeurs semblent très faibles comparées à la littérature. Il est cependant très probable que les chercheurs surestiment les concentrations de phlorizine car leur séparation par HPLC est souvent loin d'être très bonne et ils ne mettent pas en évidence tous les composés analysés par UPLC. Leur pic de phlorizine doit très certainement être en partie co-élué avec d'autres composés ce qui peut entraîner une surestimation.

## b) La pomme Weirouge

Dans le cadre d'une collaboration avec la ferme fruitière Rothgerber située à Traenheim (Alsace), une variété de pomme très rare a pu être étudiée. En effet, cette ferme cultive et produit du jus à partir d'une pomme appelée *Weirouge* qui est qualifiée de pomme sanguine (Figure 53). Son nom est issu de la fusion de « Wei » qui est dérivé de *Weihenstephan*, une petite ville proche de Munich et « rouge » du fait de sa chaire particulière de couleur rouge. Cette couleur rouge est due à la présence d'anthocyanines dans la chair. La teneur en anthocyanines est 10 fois supérieure à la moyenne et leur richesse en acide malique, qui les prévient du brunissement, les rend particulièrement intéressantes dans l'analyse des dihydrochalcones.



Figure 53 : Pommes Weirouge (© Philippe Rothgerber)

Preuve de l'intérêt croissant que suscite cette pomme, un producteur de la région du Val Venosta dans le nord est de l'Italie a décidé de démarrer sa culture en 2009 et prévoit une disponibilité commerciale d'ici quatre ans [85].

Grâce à cette collaboration, il a été possible d'étudier à la fois des pommes fraîches, des jus de pomme (bruts et pasteurisés) ainsi que du résidu de pressage issu de cette variété. Ceci a permis d'étudier la répartition générale des dihydrochalcones.

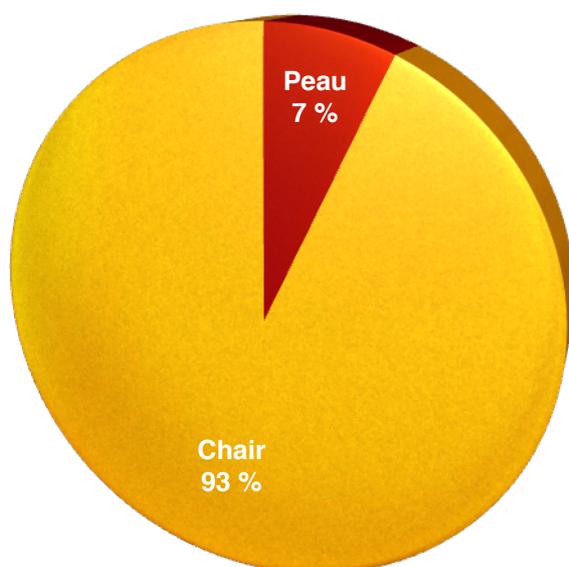
## (1) Peau et chair

Ces analyses ont été effectuées sur 3 pommes de calibre semblable dont la masse moyenne était de 203,2 g. Selon les protocoles P.01, P.04 et E.03, les pelures et la chair ont été lyophilisées puis extraites. Bien que la peau ne représente que 7 % de la masse totale de la pomme, elle contient 67 % de la phlorizine analysée dans la pomme (Tableau 7 et Figure 54). L'analyse des pépins n'a pas pu être effectuée. Elle aurait certainement modifié les rapports puisque ces derniers sont très riches en polyphénols.

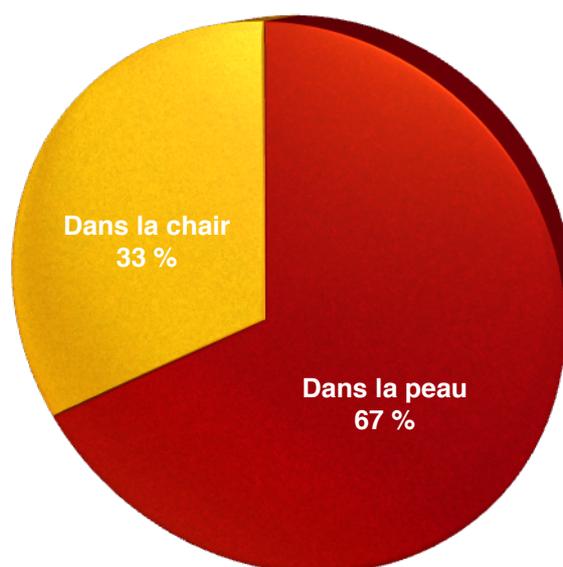
	Masse	Teneur en phlorizine	Quantité de phlorizine
Peau d'une pomme	14,7 g	0,457 mg / g	6,72 mg
Chair d'une pomme	188,6 g	0,018 mg / g	3,35 mg
Total dans la pomme	203,3 g		10,07 mg

Tableau 7 : Répartition de la phlorizine dans une pomme Weirouge moyenne

Répartition peau/chair (en masse)



Répartition de la phlorizine

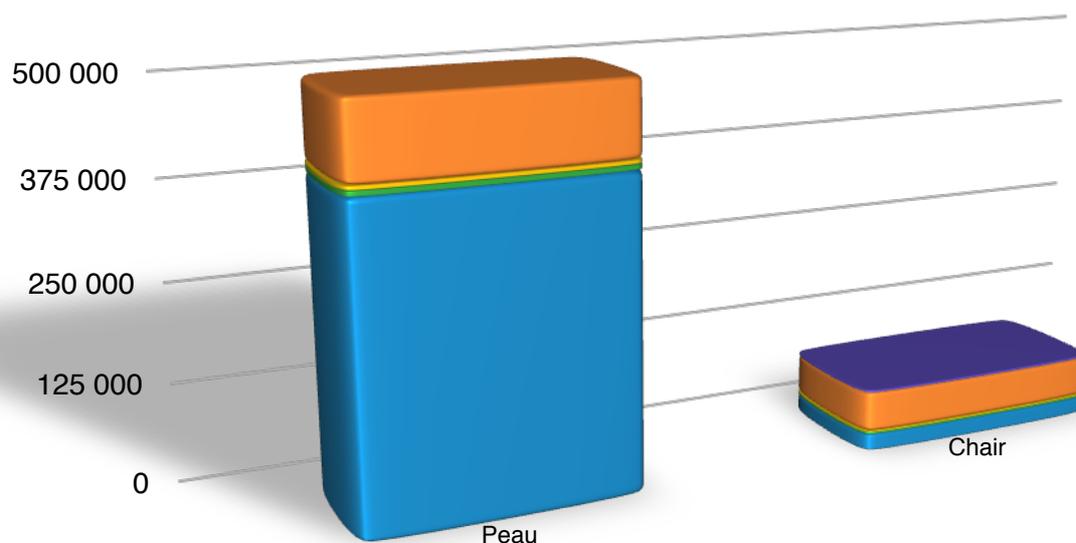


● Peau

● Chair

Figure 54 : Répartition peau/chair (en masse) dans une pomme Weirouge moyenne (à gauche) et répartition de la phlorizine dans une pomme Weirouge moyenne (à droite)

En comparant de manière plus détaillée la répartition de toutes les dihydrochalcones identifiées et non plus seulement de la phlorizine, la répartition n'est pas si uniforme. En effet, la peau contient environ 6,5 fois plus de dihydrochalcones dont la phlorizine représente 71 %. La chair contient par contre environ 3 fois plus de phlorétine-2'-xyloglucoside que de phlorizine (Figure 55).



- |                                                              |                                                                   |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <span style="color: blue;">■</span> Phlorizine               | <span style="color: green;">■</span> Dihydrochalcone-1            |
| <span style="color: yellow;">■</span> Dihydrochalcone-2      | <span style="color: orange;">■</span> Phlorétine-2'-xyloglucoside |
| <span style="color: red;">■</span> Hydrophlorétine-glucoside | <span style="color: purple;">■</span> Hydrophlorétine-diglucoside |

Figure 55 : Répartition des dihydrochalcones dans la peau et la chair d'une pomme Weirouge moyenne

La peau des pommes est beaucoup plus riche en polyphénols et particulièrement en dihydrochalcones. Par conséquent, il semble beaucoup plus intéressant de travailler avec des pelures de pommes afin d'isoler une fraction concentrée. Cependant, la chair, bien que moins concentrée en dihydrochalcones, présente très peu d'autres composés phénoliques tels que les flavonols (Figure 56). Il est ainsi beaucoup plus aisé de purifier une fraction de dihydrochalcones à partir de chair même si des quantités plus importantes seront nécessaires. Il est tout de même intéressant de noter que la teneur en dérivés de quercétine dans la peau est très faible comparée aux autres pommes étudiées.

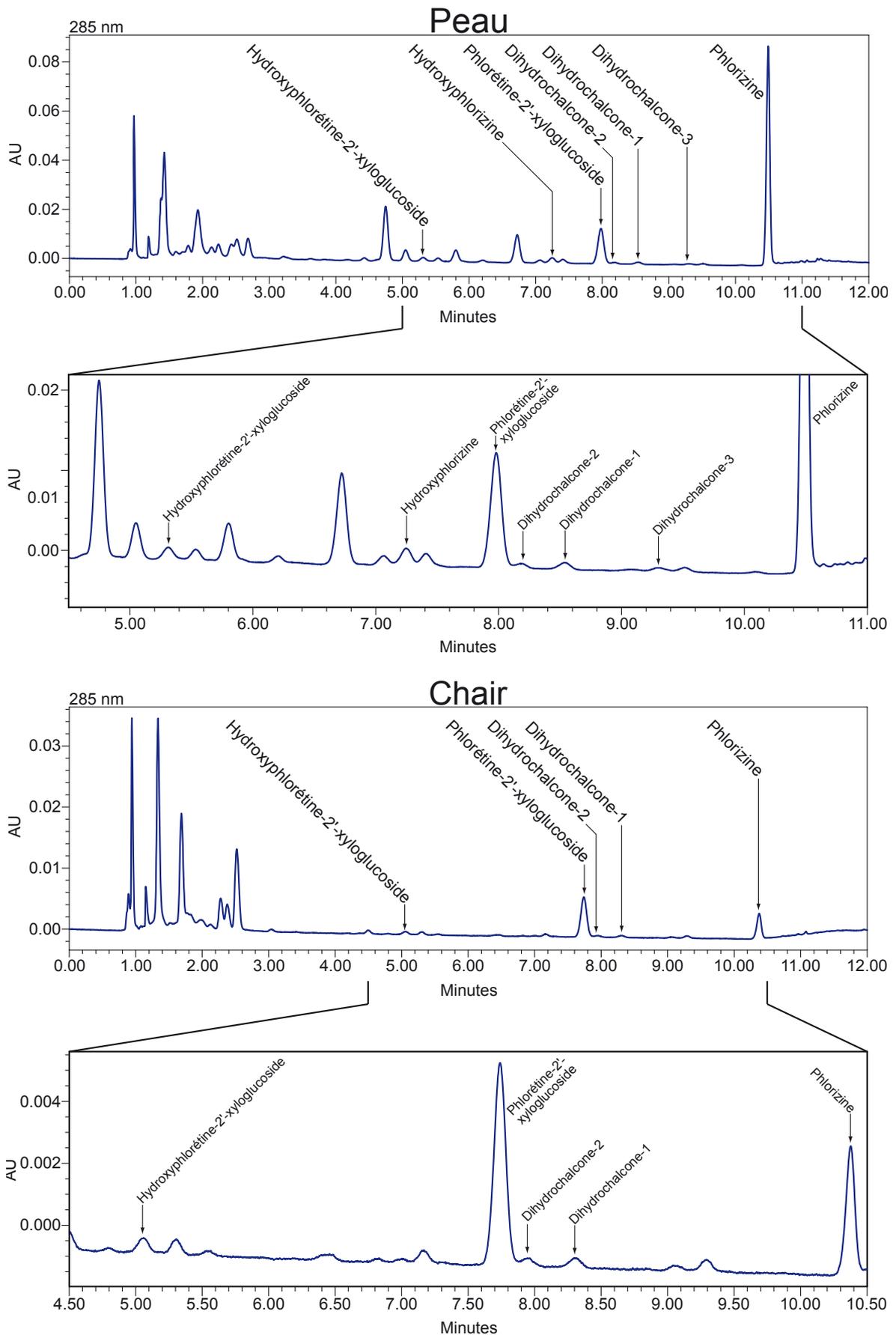


Figure 56 : Chromatogrammes de la peau (en haut) et la chair (en bas) d'une pomme Weirouge (condition UPLC 4)

## (2) Jus

Le jus de *Weirouge* brut de sortie de pressoir contient une proportion de phlorétine-2'-xyloglucoside plus proche de celle de la chair que de celle de la peau. En effet, il a été démontré que lors du pressage des jus, seuls les composés présents dans la chair étaient recueillis. C'est pourquoi la teneur en dérivés de la quercétine, exclusivement retrouvés dans la peau est presque nulle dans les jus (Figure 57).

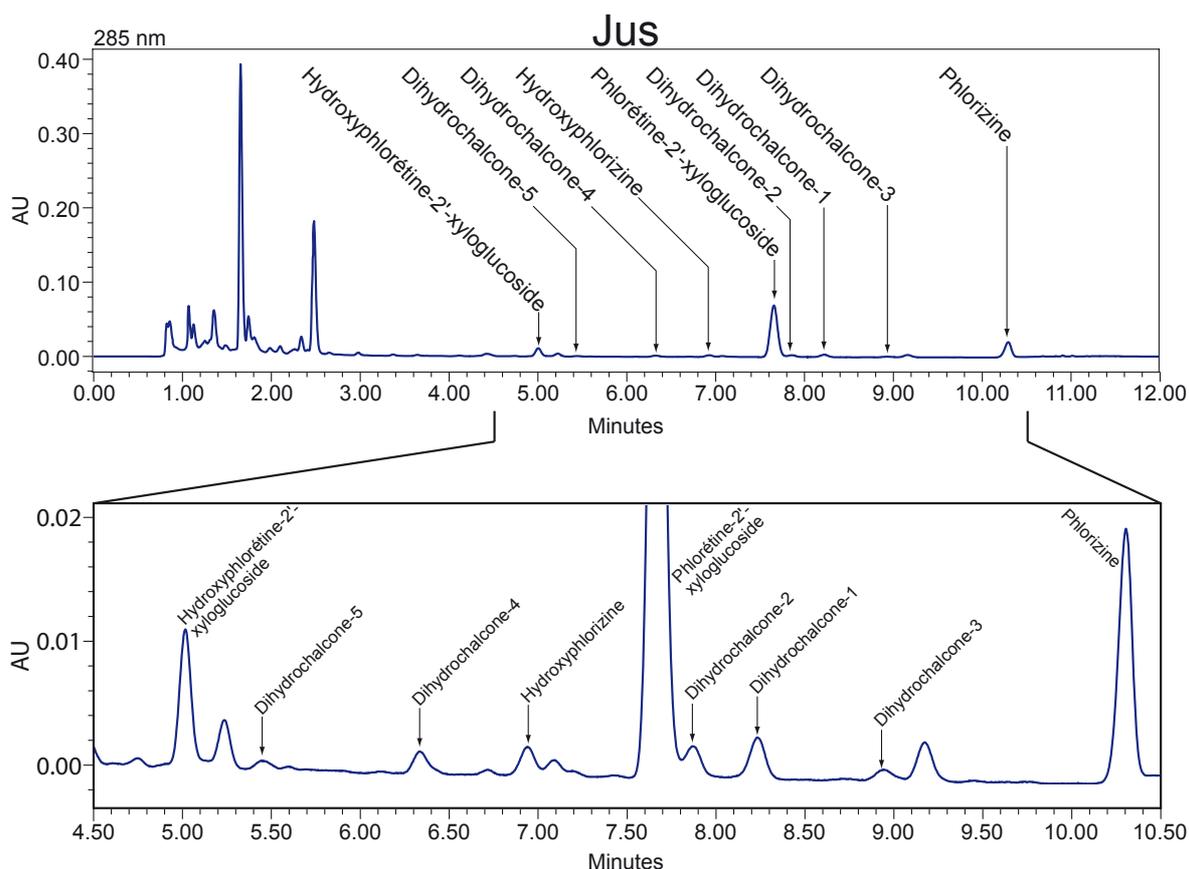


Figure 57 : Chromatogramme d'un jus de Weirouge (condition UPLC 4)

Deux types de jus de *Weirouge* ont été analysés, un jus pasteurisé mis en bouteille en 2007 et un jus brut de sortie de pressoir réalisé en 2008, quelques jours avant l'analyse. Le jus de 2007 a été conservé à l'abri de la lumière dans un entrepôt à température constante. De plus, un jus de *Boskoop* brut de sortie de pressoir a aussi été analysé.

Le jus de *Weirouge* brut de sortie de pressoir présente une concentration en phlorizine de 14 mg/l. Cette concentration est relativement intéressante par rapport aux jus de pomme de *Golden* ou d'autres pommes à dessert mais beaucoup moins importante que le jus de *Boskoop* analysé qui possède une concentration de 23 mg/l. Cependant la teneur totale en dihydrochalcones semble plus importante dans le jus de *Weirouge*, dans lequel la proportion en

phlorizine est beaucoup plus faible, que dans le jus de *Boskoop* mais est contre-balanç e par une teneur en phlorétine-2'-xyloglucoside très importante.

Enfin, une forte diminution du taux de dihydrochalcones est constatée entre le jus brut et le jus pasteurisé. En effet, le jus pasteurisé ne présente plus qu'une concentration de 9 mg de phlorizine par litre (Figure 58).

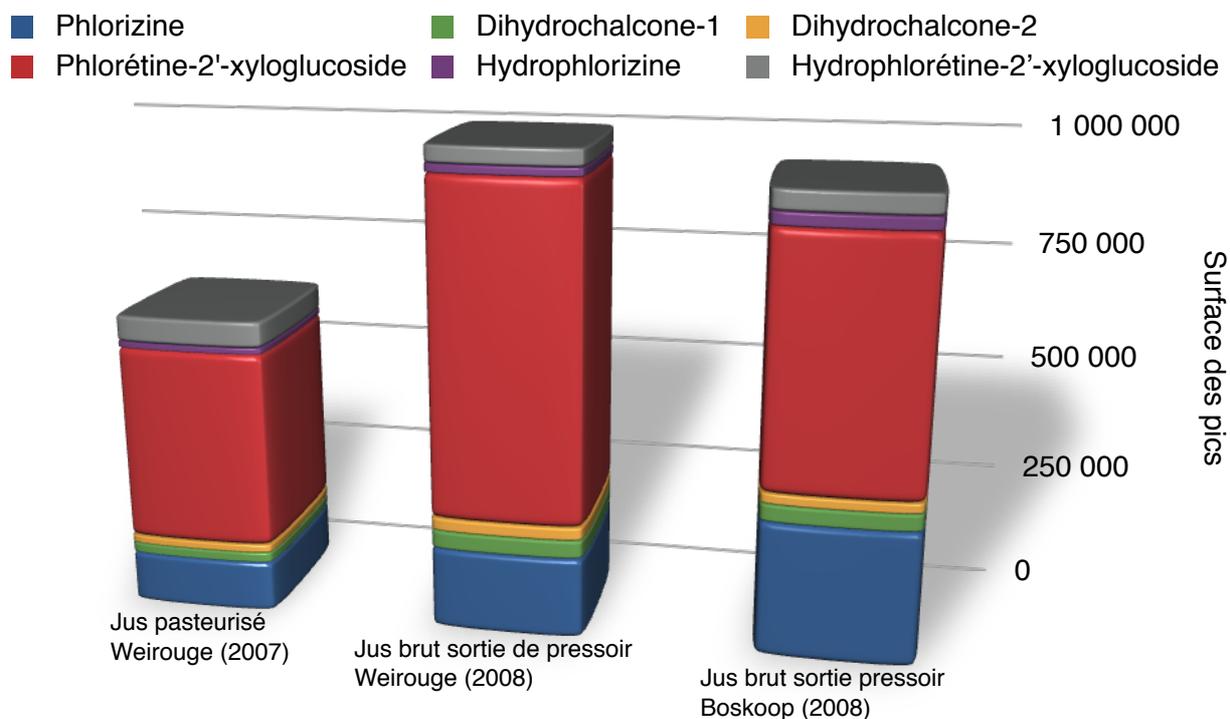


Figure 58 : Comparaison de la teneur en dihydrochalcones d'un jus de Weirouge pasteurisé et d'un jus brut de sortie de presseoir ainsi que d'un jus Boskoop brut de sortie de presseoir.

Bien que les jus pasteurisés et bruts soient issus de deux productions différentes à un an d'intervalle, la comparaison est intéressante. Effectivement, la teneur en dihydrochalcones est presque deux fois moins importante dans le jus pasteurisé. La littérature a montré que la teneur en dihydrochalcones est assez stable au cours du temps et il semblerait donc que la pasteurisation soit pour beaucoup dans la chute de concentration en dihydrochalcones.

### (3) Résidu de pressage

De par l'hétérogénéité du résidu de pressage, son analyse et son extraction sont difficiles à réaliser de manière répétable. Il est nécessaire de bien homogénéiser ce matériau et d'effectuer des prises d'essai importantes. Afin d'obtenir de bons rendements d'extraction la lyophilisation (protocole P.04) s'est avérée nécessaire car le résidu de pressage contient encore 81 % d'eau (perte d'eau à la lyophilisation).   la sortie du presseoir, le résidu contient environ 70 % d'eau (mesures du producteur) puis cette teneur augmente car le résidu de pressage agit comme une éponge et se gorge à nouveau d'eau.

Le résidu de pressage de *Weirouge* possède une concentration en phlorizine de 137 mg/kg. Le profil chromatographique ressemble beaucoup à celui issu de la peau avec un pic de phlorizine majoritaire (Figure 59). La surface de ce pic représente 75 % de la surface des pics de tous les dihydrochalcones (Figure 60).

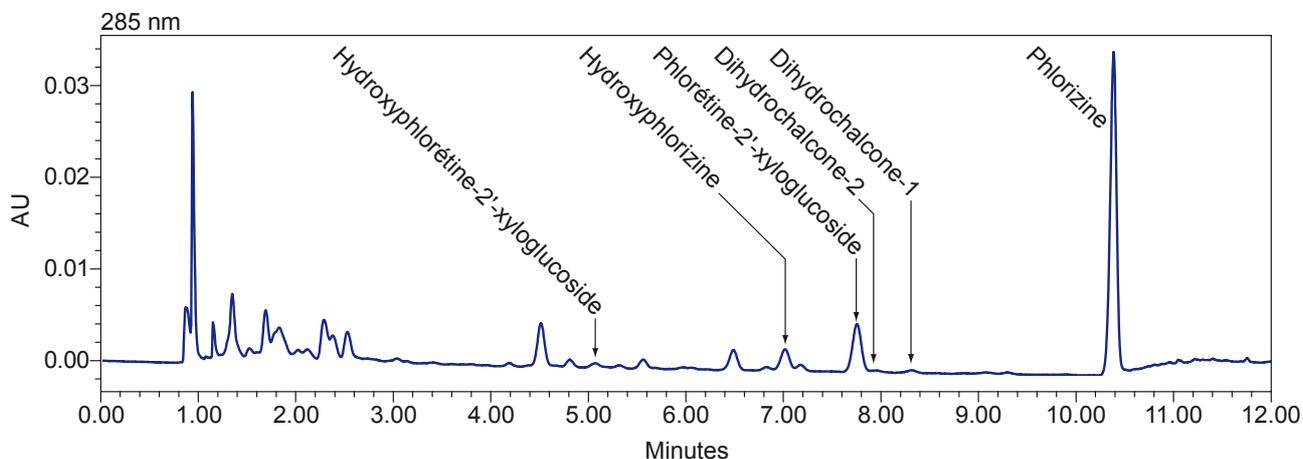


Figure 59 : Chromatogramme d'un extrait de résidu de pressage (condition UPLC 4)

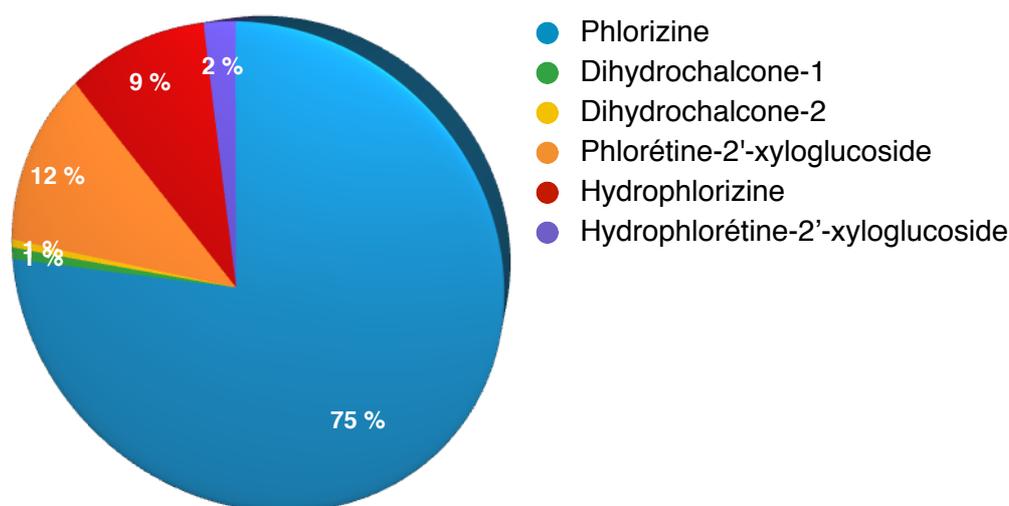


Figure 60 : Répartition des dihydrochalcones dans le résidu de pressage (surface des pics)

Un co-produit est un résidu de production que son producteur valorise ou souhaite valoriser. À l'origine, le résidu de pressage est considéré comme un déchet mais dès l'instant où l'on cherche à valoriser ce déchet, celui-ci devient co-produit.

Le résidu de pressage est très riche en composés phénoliques et constitue une source potentielle importante en dihydrochalcones. Il est donc intéressant de considérer le potentiel de la valorisation de ce co-produit végétal qui pourrait être destiné à la fabrication d'extraits riches en polyphénols. Ces antioxydants naturels, ayant des effets bénéfiques pour la santé, constituent des produits à haute valeur ajoutée qui pourraient être utilisés dans le secteur agro-alimentaire ou de la santé. Ainsi le traitement du résidu de pressage est une forte demande de la part du secteur

agricole et agro-alimentaire qui produisent des tonnages importants de cette matière organique. Le traitement des déchets végétaux représente un coût important et souvent mal évalué. C'est pourquoi la transformation de ces déchets en produits à haute valeur ajoutée pourrait permettre non seulement de réduire les coûts mais aussi d'en tirer un bénéfice. De plus, cette démarche s'inscrit dans les courants actuels de développement durable et protection de l'environnement.

L'approche méthodologique développée a consisté à mettre au point une méthode d'extraction des composés phénoliques à partir du résidu de pressage dans un premier temps, puis à purifier ces extraits afin de concentrer les dihydrochalcones (Figure 61). La principale contrainte a été de trouver des méthodes adaptées à des grandes quantités et à ce matériau très spécifique et très hétérogène. Malheureusement, le temps a manqué et aucune conclusion n'a pu être tirée des expérimentations effectuées à l'heure actuelle.

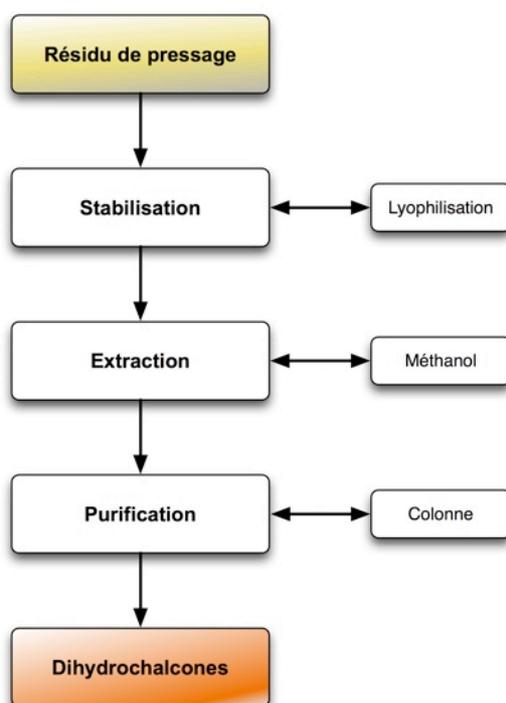


Figure 61 : Méthodologie de la valorisation du résidu de pressage

Le principal problème est venu de l'instabilité du résidu de pressage. En le laissant à l'air libre, la réaction d'oxydation enclenchée par le pressage continue. De plus, le résidu de pressage fermente très rapidement. Il est donc nécessaire de le stabiliser, soit par congélation, soit par lyophilisation. Comme il a été expliqué précédemment, le résidu de pressage est un composé hétérogène dont l'extraction des dihydrochalcones est très difficile. Des extractions au méthanol sous ultrasons mais aussi des extractions au soxhlet ont été testées sans réel succès. Peut-être que l'utilisation d'enzymes pour décomposer la matière organique permettrait d'augmenter le taux

de recouvrement. Enfin les méthodes de séparation évoquées dans le prochain point permettent de purifier et de concentrer les extraits en dihydrochalcones.

Bien qu'aucune conclusion n'ait pu être tirée, le sujet mérite d'être abordé et nécessite d'être approfondi. La valorisation du résidu de pressage a un réel potentiel industriel, économique et écologique.

### c) Séparation et concentration des dihydrochalcones

Tous les extraits de peau, de chair et de résidu de pressage obtenus avec du méthanol sont très riches en composés phénoliques. Les dihydrochalcones sont des composés très minoritaires qu'il est nécessaire de concentrer.

Les chromatogrammes obtenus en UPLC présentent deux groupes de composés phénoliques (Figure 62) : le premier groupe contient principalement des dérivés de la catéchine et l'acide chlorogénique et le second contient les dihydrochalcones ainsi que les dérivés de la quercétine.

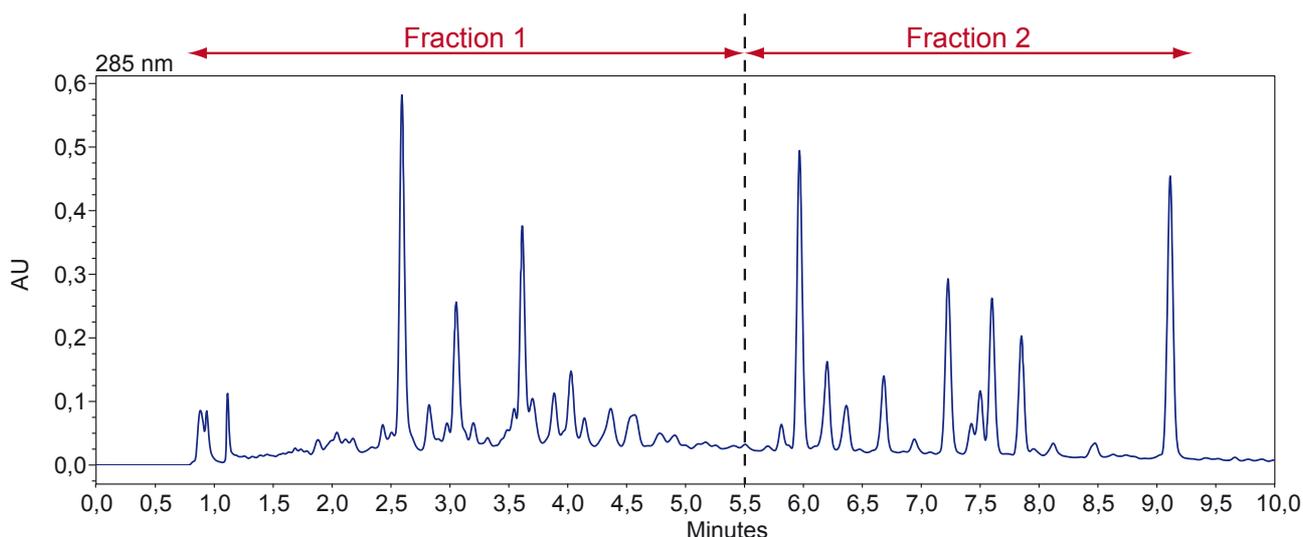


Figure 62 : Chromatogramme d'un extrait de peau de Golden (condition UPLC 3)

Deux types de phases stationnaires peuvent être envisagées, une phase inverse telle que la C18 ou une phase normale telle que la silice. Il est important de garder à l'esprit que pour obtenir des quantités suffisantes de dihydrochalcones il faut traiter des quantités très importantes d'extrait de pomme. Il faut donc opter pour des méthodes permettant de travailler avec de tels volumes. L'avantage de la phase normale par rapport à la phase inverse est la facilité de concentrer les fractions par évaporation. En effet, les solvants les plus utilisés sont le chloroforme, l'hexane et le méthanol tandis qu'une grande partie des solvants utilisés pour la phase inverse contient de l'eau. Enfin, la silice est beaucoup moins onéreuse que la phase C18.

Si la silice semble n'avoir que des avantages théoriques, les essais réalisés à partir d'extraits bruts n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il est impossible de séparer les deux groupes de composés polyphénoliques en jouant sur les proportions méthanol/chloroforme. Ces résultats pourraient être expliqués par une mauvaise affinité des composés vis-à-vis de la silice.

Puisqu'il est impossible de séparer les deux groupes de composés en utilisant une phase normale, une phase inverse, c'est à dire une silice greffée par des groupements C<sub>18</sub> a été utilisée. Les expérimentations ont été réalisées sur des cartouches d'extraction sur phase solide (SPE).

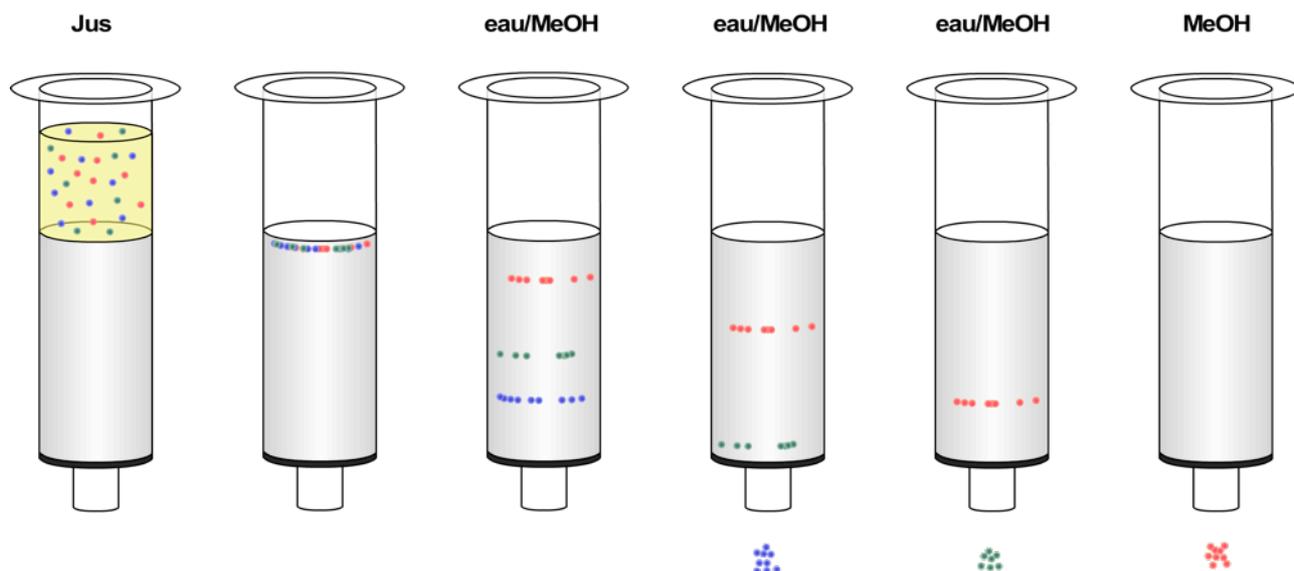


Figure 63 : Principe de séparation sur SPE

Grâce à ces cartouches, un grand volume d'eau contenant les polyphénols peut être traité (Figure 63). Les polyphénols ayant une meilleure affinité pour la phase stationnaire restent fixés à ce support. Ensuite, un gradient eau/méthanol décroissant est appliqué, ce qui permet d'éluer les différents groupes de composés. Les polyphénols les plus hydrophiles sont élués en premier tandis que les composés les moins hydrophiles sont élués en dernier.

Les volumes utilisés pour éluer la cartouche varient en fonction de la taille de cette dernière. Les gradients varient aussi en fonction de la taille de la colonne et du volume déposé. Plus le volume déposé sur une cartouche est important, plus il sera difficile de bien séparer les composés. En effet, en déposant des quantités plus importantes, les composés phénoliques vont se fixer à la colonne sur une épaisseur plus grande (Figure 64). De ce fait la hauteur de colonne restante, sur laquelle les composés phénoliques vont être élués et séparés, est beaucoup moins importante. La séparation sera donc de moins bonne qualité. Il s'agit au final de trouver un juste milieu pour pouvoir déposer une quantité suffisante afin de ne pas avoir à faire trop de répétitions tout en obtenant une bonne séparation.

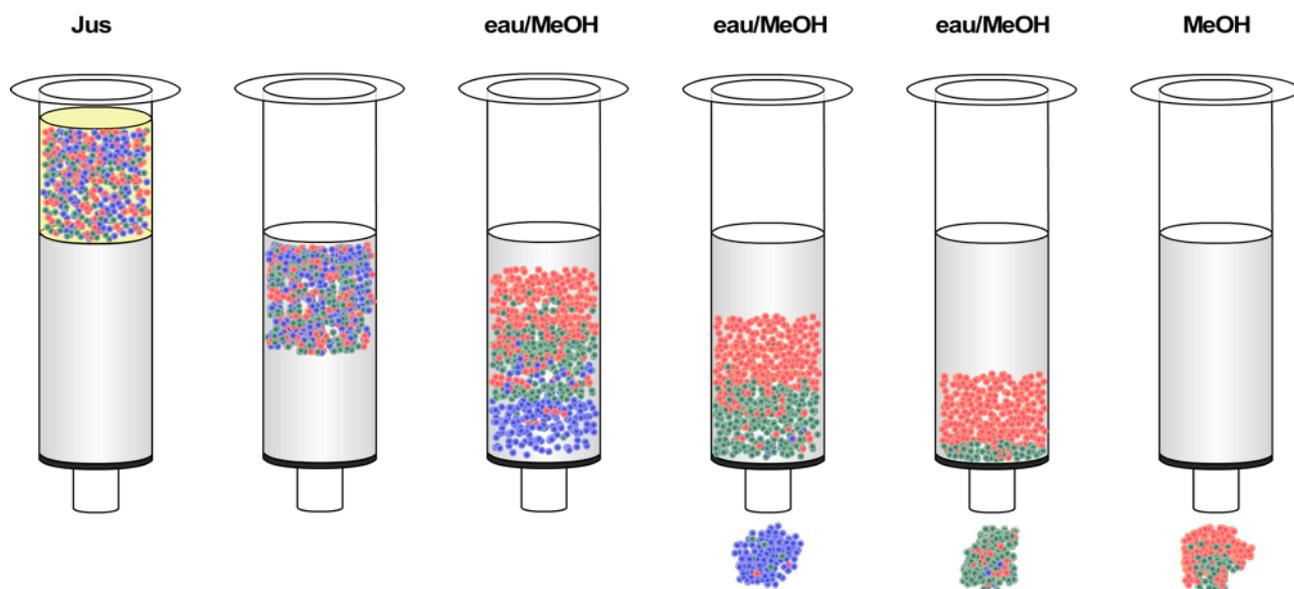


Figure 64 : Perte de séparation par SPE lors d'un dépôt trop important

Au final, en ajustant les volumes et les gradients, la phase inverse s'est montrée très efficace pour séparer les deux groupes de composés phénoliques (Figure 65). Ainsi en travaillant avec des extraits de jus ou de résidus de pressage qui contiennent des quantités infimes de dérivés de la quercétine, il est possible d'obtenir des extraits concentrés en dihydrochalcones.

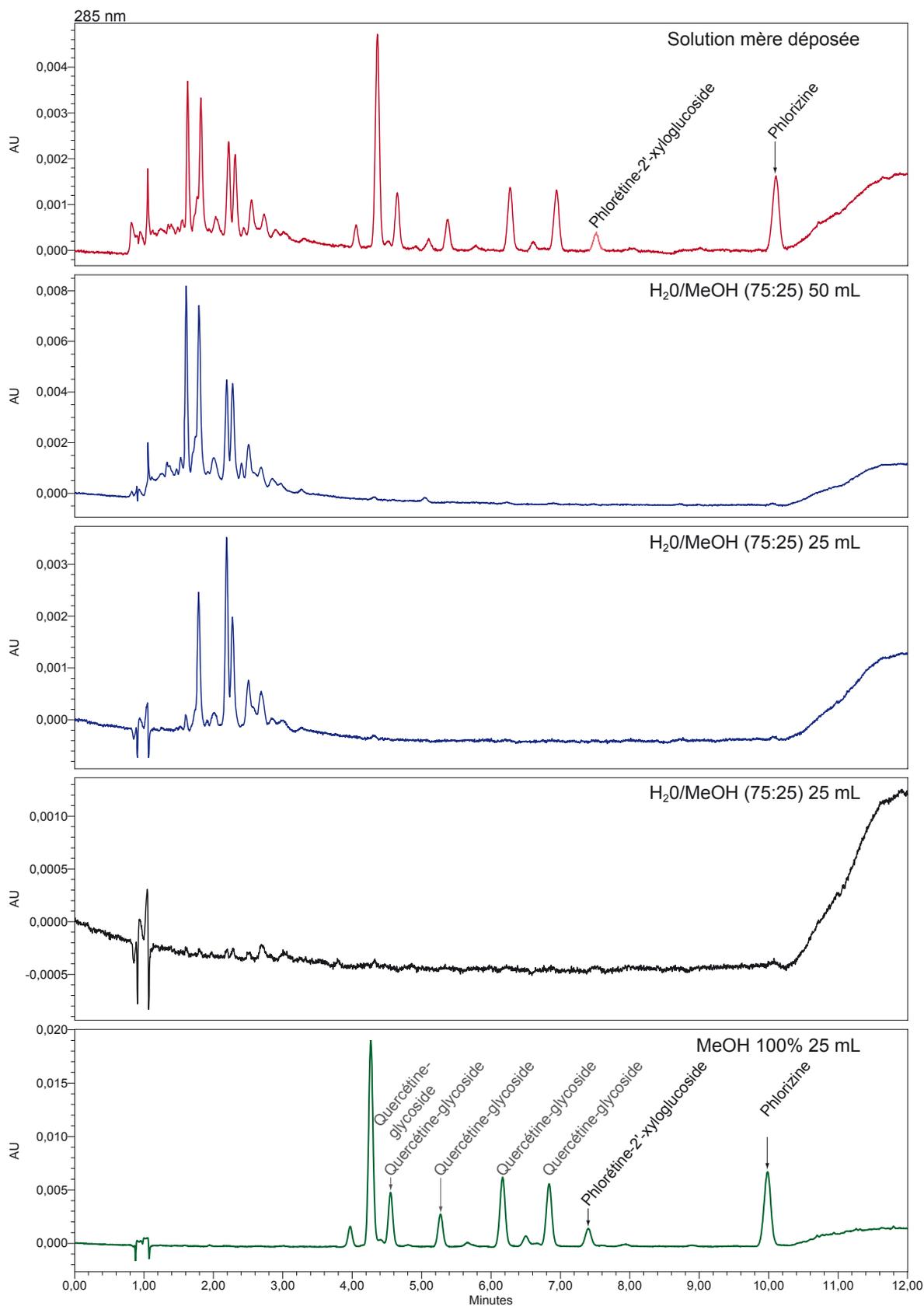


Figure 65 : Chromatogrammes des fractions d'élution d'une cartouche SPE C18ec 5 g (solution déposée : extrait de peau de Golden)

## **4. Purification d'une fraction concentrée en dihydrochalcones dans le cadre d'une collaboration franco-allemande**

Dans le cadre d'une collaboration franco-allemande entre le Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et l'Institut Max Rubner (MRI) de Karlsruhe, un extrait contenant des polyphénols a été séparé en 2 fractions. L'une contenait notamment les dihydrochalcones afin d'étudier plus précisément leur activité lors d'études *in vitro* et *in vivo*. Une méthode de purification des dihydrochalcones a ainsi été mise au point en profitant des expériences et des avancées effectuées précédemment.

### **a) Le MRI**

Le Max Rubner Institute est un institut de recherche fédéral pour l'alimentation et les denrées alimentaires. Leurs travaux sur les molécules bioactives issues de la pomme ont montré que les composés phénoliques présentent une activité biologique dans divers domaines. Cet institut a pour objectif d'identifier plus précisément les composés actifs et s'intéresse particulièrement aux dihydrochalcones.

Pour cela, ils mènent des études *in vitro* et *in vivo*. Leurs premiers travaux réalisés sur des rats obèses ont consisté à nourrir un groupe avec du jus de pomme et un autre avec une solution équivalente d'un point de vue énergétique. Il s'est avéré que le jus de pomme a présenté une action bénéfique sur la répartition des lipides hépatiques. En effet, les rats n'ont pas perdu de poids mais leurs lipides hépatiques ont été divisés par trois. Cette action pourrait être très bénéfique dans la prévention des complications liées à l'obésité et au diabète. Cette étude sera présentée plus en détails et discutée dans la dernière partie de ce mémoire. Afin de déterminer les molécules responsables de cet effet, des études complémentaires en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ont été menées.

### **b) Les objectifs**

Au vu de la littérature, il ressort que les polyphénols de la pomme peuvent être responsables de ces effets bénéfiques chez le rat. Ainsi, un extrait purifié de polyphénols de jus de pomme a été récupéré. Les chercheurs s'intéressant particulièrement aux dihydrochalcones, il a été convenu de fractionner cet extrait en deux afin de purifier et concentrer les dihydrochalcones dans une fraction unique. Par la suite, des études *in vitro* seront réalisées afin de comparer l'action de ces deux fractions. Le Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie a ainsi reçu un échantillon dénommé *Weißer Trierer 06* (WT06) fourni par le MRI.

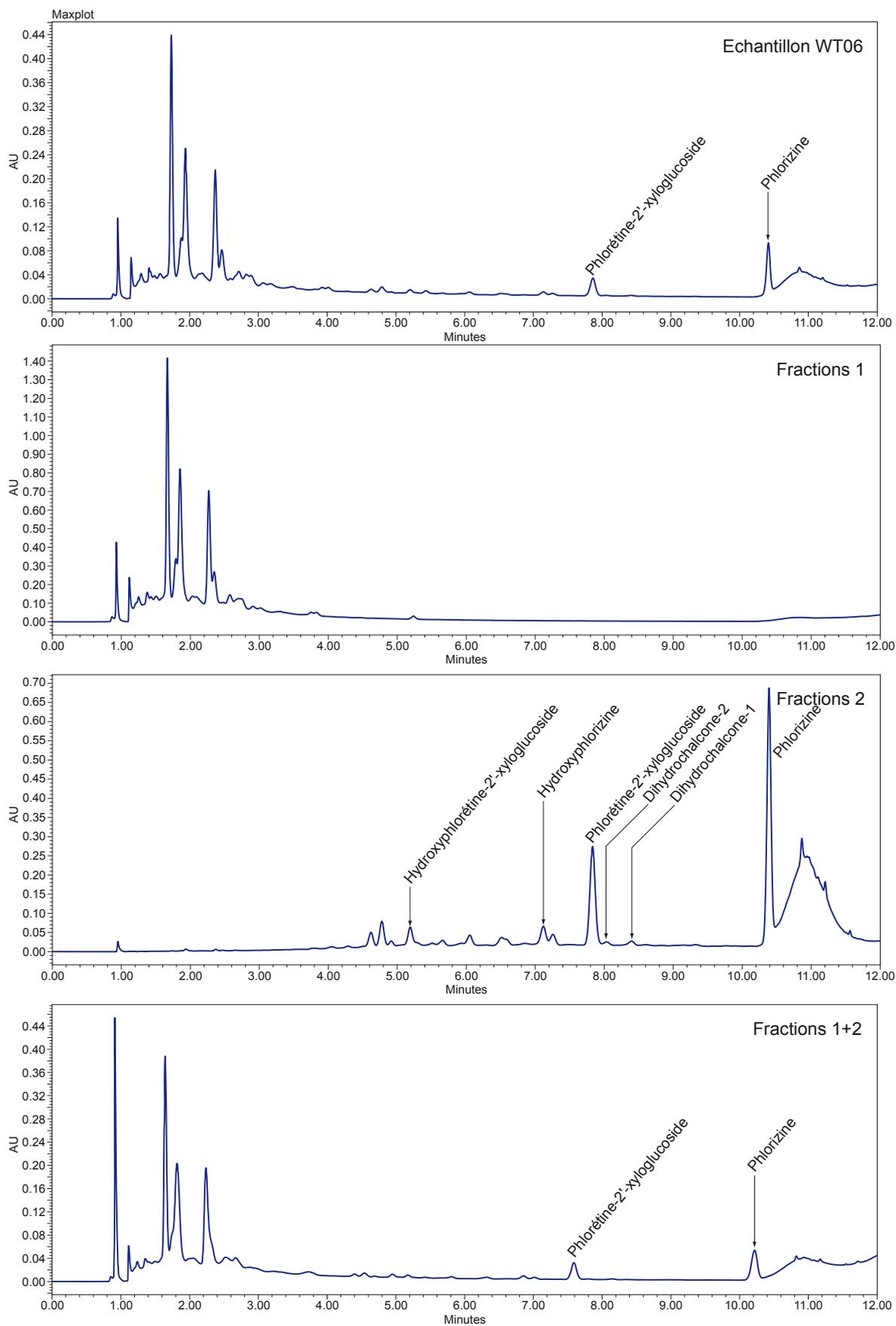


Figure 66 : Chromatogrammes de l'échantillon WT06 de départ, les fractions 1 et 2 et la réunion des deux fractions par UPLC (condition UPLC 4)

### **c) Résultats**

En suivant le protocole de séparation sur une colonne Chromabond C18ec de 100 g (cf. IV.A. 4.c)), chaque fraction obtenue a été analysée directement par UPLC après filtration sur des filtres PET 0,2 µm. Suite à l'analyse, les fractions sont considérées comme appartenant à la Fraction 1 ou la Fraction 2 selon leur profil chromatographique (Figure 66). Comme souhaité, grâce au gradient eau/méthanol réalisé, il a été possible de séparer l'échantillon en deux fractions. La seconde contient en grande majorité les dihydrochalcones qui sont totalement absents de la première. A la fin de la manipulation, le méthanol a été évaporé à l'évaporateur rotatif puis les échantillons ont été lyophilisés afin de rendre un échantillon stable et sec au MRI. Le chromatogramme du mélange des fractions 1 et 2 prouve que ce mélange est équivalent à l'échantillon WT06 fourni au départ. Malheureusement, les résultats de leurs expériences ne sont pas encore disponibles.

## V. Intérêt médical

Depuis toujours la pomme est considérée comme un aliment aux vertus thérapeutiques. Un dicton dit d'ailleurs : « une pomme chaque matin éloigne le médecin » (« An apple a day keeps the doctor away »). Toujours mis en avant, les polyphénols sont considérés comme les molécules actives de la pomme.

Les polyphénols sont présents dans tous les fruits et légumes et ont des effets reconnus sur les maladies chroniques tels que les maladies cardiovasculaires et les cancers [86, 87]. Combien de fois n'avons nous pas entendu, étant enfant : « Mange tes légumes, c'est bon pour toi » ?

Bien que seuls les composés phénoliques soient mis en avant, la pomme et le jus de pomme apportent de nombreux nutriments et autres composés tels que des fibres alimentaires, des minéraux et des vitamines présentés dans le tableau 8.

	Pomme	Jus de pomme
<b>Eau (g)</b>	85,30	88,10
<b>Energie (kcal / kJ)</b>	54 / 227	48 / 203
<b>Protéines (g)</b>	0,34	0,07
<b>Lipides (g)</b>	0,58	N.A.
<b>Carbohydrates (g)</b>	11,43	11,06
Glucose (g)	2,03	2,40
Fructose (g)	5,74	6,40
Sucrose (g)	2,55	1,70
<b>Fibres (g)</b>	2,02	0,77
Fibres hydrosolubles (mg)	480,00	N.A.
Fibres hydroinsolubles (g)	1,54	N.A.
<b>Minéraux (g)</b>	0,32	0,27
Potassium (mg)	144,00	116,00
Sodium (mg)	3,00	2,20
Calcium (mg)	7,10	6,90
Magnésium (mg)	6,40	4,20
<b>Vitamines</b>		
Vitamine C (mg)	12,00	1,40
Tocophérols (µg)	490,00	N.A.

Tableau 8 : Composition moyenne des pommes et jus de pomme (par 100g de poids frais - N.A. : résultats non publiés) [88]

La pomme est le fruit le plus consommé mondialement. Ainsi de très nombreuses études épidémiologiques et scientifiques traitent des polyphénols de la pomme et leur impact sur la santé. De nombreux effets ont été corrélés à la consommation de pomme, tels que la diminution du risque de cancer, de maladies cardiovasculaires, d'asthme et de diabète. Cependant, les

dihydrochalcones ne sont que très peu mises en avant et sont toujours masquées par la prépondérance des quercétines, des catéchines et de l'acide chlorogénique dans toutes les études et rapports traitant des polyphénols en général. Ainsi cette partie aura pour objectif de mettre en avant et résumer les principales découvertes sur les dihydrochalcones de la pomme et leur intérêt thérapeutique.

## A. Biodisponibilité

Il est important pour considérer l'intérêt médical des dihydrochalcones, d'étudier leur absorption et leur métabolisation. En effet, les composés phénoliques majeurs dans l'alimentation ne sont pas forcément les plus actifs. Ils peuvent ne pas avoir d'effet, ou être très peu absorbés.

Il a été démontré que la phlorizine était très rapidement hydrolysée en phlorétine dans l'intestin des rats avant son absorption. Cette hydrolyse serait réalisée par l'activité  $\beta$ -glucosidase de l'enzyme lactase-phlorizin hydrolase (LPH). Cette enzyme est localisée au niveau de la bordure en brosse intestinale. De plus la phlorétine résultant de cette hydrolyse est très rapidement conjuguée directement dans l'intestin par des enzymes de conjugaison retrouvées notamment dans les entérocytes. Il n'est pas exclu que la flore intestinale contribue à ces hydrolyses et conjugaisons et qu'elle soit aussi responsable de la dégradation de la phlorétine en acide phlorétique et en phloroglucinol, détectés dans les urines [89]. De ce fait chez des rats nourris avec de la phlorizine, ce composé n'est jamais retrouvé dans le plasma et l'aglycone phlorétine n'est présent qu'en très faible quantité (5 à 15 %). Les formes conjuguées (glucuro- ou sulfato-conjugués essentiellement) représentent ainsi 85 à 95 % des formes circulantes dans le plasma [89]. Il apparaît même qu'en général, les formes aglycones ne sont pas retrouvées dans le sang. La présence d'aglycones dans certaines études pourraient provenir du protocole expérimental qui met le plus souvent en jeu un « gavage » à la phlorétine ou son glucoside. De ce fait, la forme aglycone pourrait diffuser à travers la paroi épithéliale, ce qui ne reflèterait pas le phénomène dans des conditions physiologiques. La phlorétine-2'-xyloglucoside est plus stable que la phlorizine. Environ 20 % de la phlorétine-2'-xyloglucoside est retrouvée au niveau de l'iléum tandis qu'il ne reste plus de trace de phlorizine [90-93].

La forme métabolisée majoritairement retrouvée est la forme glucuroconjuguée dénommée phlorétine-2'-*O*- $\beta$ -glucuronide (Figure 67). Ce composé retrouvé dans le plasma et le tube digestif pourrait résulter de l'action d'enzymes intestinales ou de la métabolisation hépatique. Dans ce deuxième cas, sa présence dans l'iléum serait expliquée par le cycle entérohépatique [92].

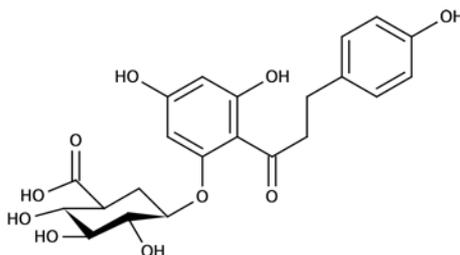


Figure 67 : Phlorétine-2'-O-β-glucuronide

Au final, la biodisponibilité de la phlorétine et de la phlorizine est équivalente bien qu'on note quelques différences de cinétique. En effet, le pic d'équivalent phlorétine dans le plasma apparaît beaucoup plus rapidement lorsque les rats sont nourris avec de la phlorétine qu'avec le glucoside. Après quatre heures, le pic d'équivalent phlorétine est deux fois moins important pour des rats nourris avec la phlorizine que pour ceux nourris avec la phlorétine. Cependant après dix heures, plus aucune différence n'est observée. L'absorption rapide de ces deux composés suggère une absorption dans le petit intestin, ou intestin grêle [90].

La demi-vie de ces composés est assez courte. La phlorétine se lie fortement aux cellules sanguines et surtout à l'hémoglobine ce qui aurait tendance à augmenter sa demi-vie. Cependant la forme aglycone est minoritaire par rapport aux métabolites conjugués. Les formes conjuguées sont rapidement éliminées par excrétion urinaire et le cycle entérohépatique. Après 24 heures, environ 85 % de l'équivalent phlorétine est éliminé du plasma [90, 94, 95].

## B. Action antioxydante

Les pommes ont la deuxième plus forte activité antioxydante derrière les canneberges (*cranberries*). Cette activité est due aux composés phénoliques qui sont de puissants antioxydants. Cet effet est souvent considéré comme la cause majeure de leurs effets bénéfiques. En effet, les maladies cardiovasculaires et le cancer sont tous deux considérés comme étant le résultat d'un stress oxydatif [86, 87].

### 1. Agents piégeurs des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont, pour la plupart, des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène. Les ERO sont des espèces chimiques à très forte réactivité capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les membranes des cellules (en attaquant les lipides membranaires). Cependant certains ERO, tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ne sont pas des radicaux au sens chimique, bien qu'étant réactif et toxique.

## a) Effets généraux des polyphénols de la pomme

Les polyphénols ont montré une grande activité antioxydante *in vitro*. Cependant, les résultats quant à l'activité *in vivo* sont plus contrastés et plus rares. Il existe un grand nombre de méthodes pour calculer le pouvoir antioxydant et ainsi autant de manière d'exprimer les résultats [96-101]. Les méthodes d'analyse du pouvoir antioxydant comparent le plus souvent l'inhibition de l'oxydation d'une molécule de référence (DPPH par exemple) en présence du composé phénolique étudié. Il est par conséquent très difficile de comparer les résultats des différentes études entre eux. De plus, les pommes et les jus utilisés sont chaque fois différents. Les teneurs en composés phénoliques ainsi que les résultats obtenus peuvent de ce fait énormément varier d'une étude à l'autre. Enfin, il est important de différencier le pouvoir antioxydant du jus en tant que tel (*in vitro*) et son pouvoir antioxydant *in vivo*.

Il existe une corrélation entre l'activité antioxydante d'un jus, ou d'un extrait de pomme, et sa teneur en composés phénoliques [101-103]. La littérature semble s'accorder sur le fait que les composés ayant l'activité antioxydante la plus importante dans les jus sont les flavan-3-ols qui sont les composés majoritaires du jus. Cependant, la quercétine possède l'activité antioxydante la plus élevée des composés phénoliques de la pomme. Elle est cependant présente en moins grande concentration dans le jus. Les glycosides de la phlorétine présentent une activité antioxydante moins importante que les autres composés phénoliques. Etant donné que ce sont, de plus, des composés présents en assez faible concentration, leur rôle dans l'action antioxydante de la pomme est très limité. Tous les composés phénoliques de la pomme, exceptée la phlorizine, ont une activité antioxydante supérieure aux vitamines C et E [97-104].

Les composés phénoliques sont facilement et rapidement absorbés. Ainsi, lors de l'administration par voie orale de jus de pomme, le pouvoir antioxydant du plasma augmente de près de 50 % dans les deux heures suivant la consommation [96]. Cependant les résultats ne sont pas tous aussi optimistes mais montrent tout de même un léger effet positif [105]. Ces résultats sont cependant mis en doute par d'autres études qui estiment que le pouvoir antioxydant du plasma n'est pas augmenté [98]. Comme il a été précisé précédemment, ces résultats discordants sont dus aux différentes méthodes de mesure du pouvoir antioxydant. De plus, aucune extrapolation entre l'activité antioxydante d'un jus *in vitro* et *in vivo* ne peut être faite puisque les composés phénoliques sont hautement métabolisés avant leur absorption. Les composés actifs *in vivo* ne sont donc pas les mêmes que ceux connus *in vitro*. Enfin, de nombreuses études mesurent l'effet obtenu chez des patients dans les heures suivant la consommation mais ne s'intéressent pas à un éventuel effet à plus long terme lors d'une consommation quotidienne.

## b) Pharmacophore

L'activité antioxydante est déterminée par la capacité d'une molécule à donner un hydrogène ou un électron. Cette capacité augmente quand la molécule sous forme radicalaire est capable de se stabiliser en délocalisant ses électrons limitant de ce fait sa réactivité avec d'autres molécules et stoppant ainsi une réaction en chaîne [87]. Le potentiel antioxydant des composés phénoliques est majoritairement dû à la structure orthodiol (catéchol) des aglycones (Figure 68), même si de nombreux pharmacophores ont été démontrés [11]. De ce fait les glycosides de la phlorétine, qui ne possèdent pas de structure catéchol, ont une action antioxydante moins importante que les autres composés phénoliques. Toutefois les glycosides de l'hydroxyphlorétine qui possèdent cette structure sur leur cycle B ont une activité supérieure aux glycosides de la phlorétine (Figure 68). Malgré cela, leur activité antioxydante reste deux fois moins importante que celle de la quercétine par exemple [104].

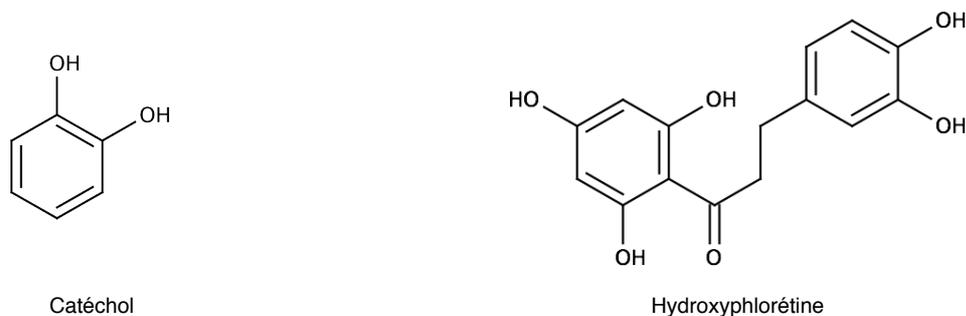


Figure 68 : Structure du noyau catéchol, pharmacophore principal des composés phénoliques et du noyau hydroxyphlorétine

L'origine de l'activité antioxydante de la phlorétine et ses glycosides, proviendrait de son noyau 2,4,6-trihydroxyacétophénone (Figure 69) [106]. Ce noyau a une activité antioxydante forte grâce à une stabilisation de son radical *via* tautomérisation. L'activité antioxydante de diverses dihydrochalcones issues d'autres plantes ou obtenues par synthèse chimique a été testée. Il a été démontré que tous les dihydrochalcones possèdent une activité antioxydante [107].

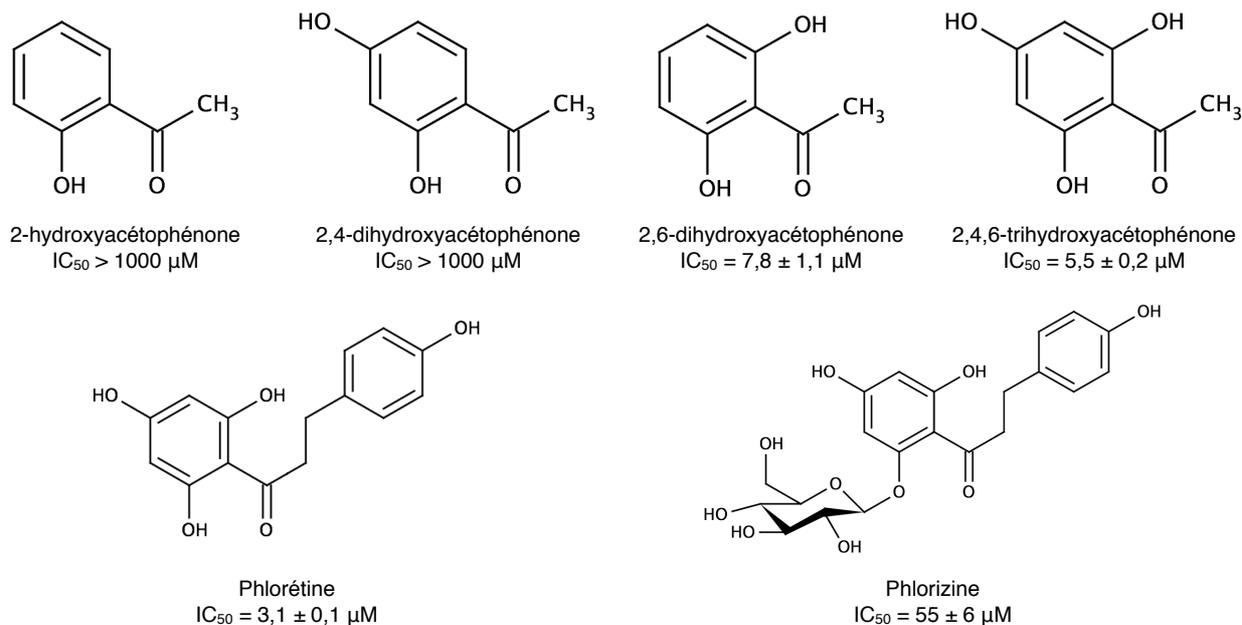


Figure 69 : Recherche du pharmacophore de l'activité antioxydante (résultats donnés en concentration de composé qui inhibe 50 % de l'activité du peroxy-nitrite) [106]

## c) Intérêts

### (1) Peroxydation des lipides

Le stress oxydant a de grandes répercussions sur le système lipidique. L'oxydation des LDL (*Low Density Lipoprotein*) notamment a été reconnue comme facteur de risque du développement de l'athérosclérose. L'effet préventif sur les maladies cardiovasculaires des polyphénols du vin a, depuis longtemps, été démontré et est souvent connu sous le terme du « paradoxe français ».

L'effet des polyphénols de la pomme sur l'oxydation des LDL a été testé *in vitro* [108]. Les résultats sont assez mitigés. En effet, des extraits de jus de pomme ont engendré une inhibition de 9 à 34 % de l'oxydation des LDL. Cependant des analyses de régression n'ont pas démontré de corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques ou toute autre classe de composés phénoliques. L'activité serait peut-être due à d'autres composés. *In vivo*, la consommation de pomme entraîne un effet protecteur de l'oxydation des LDL atteignant un pic 3 heures après la consommation et revenant à la normale dans les 24 heures [86].

### (2) Effets sur la peau

La peroxydation des lipides des membranes est actuellement une des théories du vieillissement. De ce fait, de nombreux antioxydants sont utilisés dans les cosmétiques. Ils protègent notamment des rayonnements UV qui sont source d'inflammations, d'érythèmes et à

long terme de cancers [109]. Cependant, en plus de leur effet antioxydant, la phlorétine et la 3-hydroxyphlorétine ont démontré une action inhibitrice de l'élastase qui, cumulée à l'effet antioxydant, pourrait apporter un intérêt dans la préparation de crèmes et pommades anti-âge [49]. Des brevets ont d'ailleurs déjà été déposés [110, 111].

## 2. Agents piègeurs des espèces réactives des dicarbonyles

En plus d'avoir un effet sur les espèces réactives de l'oxygène, la phlorétine et la phlorizine ont un effet sur les espèces réactives des dicarbonyles. Ces composés, tels que le méthylglyoxal (MGO) ou le glyoxal (GO) (Figure 70) ont été très étudiés ces dernières années car ce sont des composés extrêmement réactifs qui ont notamment des conséquences très néfastes chez les patients atteints de diabète. En effet, ces composés ont la faculté de former des produits de glycation avancés (AGE).



Figure 70 : Méthylglyoxal (à gauche) et glyoxal (à droite)

### a) La glycation

La réaction de glycation, aussi appelée réaction de Maillard, est une réaction non enzymatique entre l'aldéhyde d'un sucre réducteur et l'amine libre d'un acide aminé (Lys et Arg) d'une protéine donnant lieu à la formation d'une base de Schiff (Figure 71). Elle subit un réarrangement dit d'Amadori avec formation de dérivés plus stables : les produits d'Amadori. La condensation de plusieurs de ces produits conduit à la formation d'hétérocycles azotés : les produits de Maillard aussi appelés produits de glycation avancés (AGE) [112, 113].

Dans les conditions physiologiques, cette réaction dépend de trois paramètres : le temps d'exposition au sucre, de la concentration sanguine en glucose et de la cinétique de dégradation des protéines. La conjonction de ces trois paramètres est nécessaire pour observer une augmentation de la glycation.

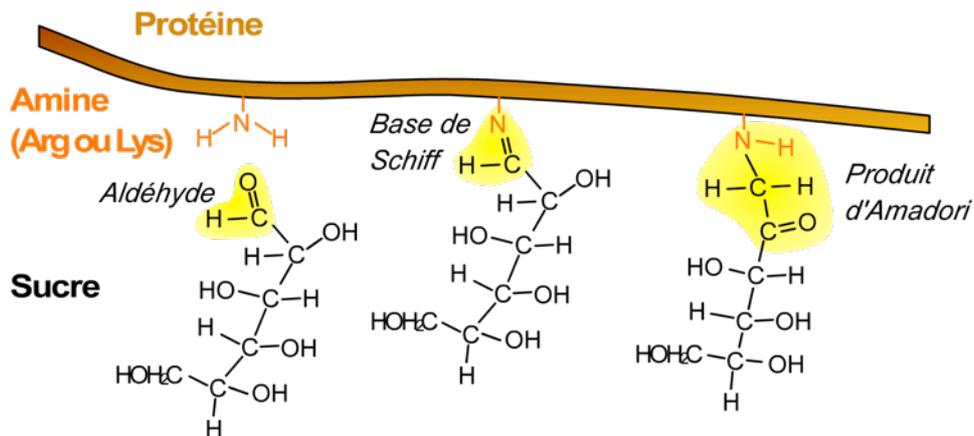


Figure 71 : Réaction de glycation

Elle concerne donc surtout les protéines de la matrice extracellulaire (collagène...) et les protéines circulantes (albumine, immunoglobulines...) qui sont en contact permanent avec le glucose sanguin. De ce fait, les AGE sont une famille très hétérogène de molécules, comprenant notamment l'hémoglobine glyquée utilisée comme marqueur de la glycémie dans le diagnostic et le suivi du diabète.

Il existe également d'autres voies de formation des AGE telles que la peroxydation lipidique et le stress oxydant.

## b) Conséquences de la glycation

La glycation des protéines a des conséquences physiologiques directes diverses. Les protéines glyquées voient leur structure et donc leurs propriétés changées. Par exemple, la glycation des LDL (*Low Density Lipoprotein*), des HDL (*High Density Lipoprotein*) et des VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) provoque un dysfonctionnement de leur mécanisme qui induit une obstruction des vaisseaux favorisant le développement de néphropathies, de rétinopathies et de l'athérosclérose. Celle des IgM et des IgG modifie leur activité et diminue la résistance à l'infection. Enfin, la glycation de la matrice extracellulaire induit une réticulation, en particulier du collagène, qui modifie l'élasticité des tissus. Les AGE ont donc des conséquences directes sur les complications liées à l'hyperglycémie et au diabète [112, 113].

## c) Importance du méthylglyoxal

L'importance du méthylglyoxal a notamment été mise en évidence par le pharmacien Pierre Potier, à l'origine du docétaxel (Taxotère®), médaille d'or du CNRS, et son équipe [114]. Le méthylglyoxal est l'un des produits de dégradation du glucose. Ce composé, véritable poison, comportant deux fonctions aldéhydes peut réagir, de façon beaucoup plus importante que les sucres, avec toutes les protéines selon la réaction de Maillard et former des AGE.

En temps normal, le glucose est utilisé pour fabriquer de l'ATP (adénosine triphosphate) et un système de glyoxalases détruit le peu de méthylglyoxal synthétisé. Ce système repose sur le glutathion et les glyoxalases I et II qui transforment le méthylglyoxal en D-lactate. Mais dans certaines circonstances (maladies, âge, alimentation, mode de vie), davantage de méthylglyoxal est synthétisé, dépassant les capacités d'élimination. La flore bactérienne pourrait, peut-être, aussi être responsable de la fabrication de méthylglyoxal. *Helicobacter pylori* à l'origine des cancers du pylore et de l'estomac produit par exemple du méthylglyoxal.

Le méthylglyoxal réagit avec l'insuline qui perd alors 60 % de son action hypoglycémiante. Cette réaction pourrait expliquer le phénomène de « résistance à l'insuline ». Le patient ne deviendrait pas résistant à l'insuline, c'est l'insuline qui serait désactivée. Un défaut de glutathion peut ainsi engendrer un diabète de type 2 selon le chercheur Potier. Dans ce cas, le méthylglyoxal inactive les glyoxalases comme tout autre peptide. Pour traiter l'ensemble de la maladie du diabète il faut donc non seulement mesurer la glycémie mais aussi doser les glyoxalases, ce qui n'est jamais fait, du moins en routine. Un kit de dosage est d'ailleurs en développement dans les laboratoires bioMérieux.

Le méthylglyoxal serait aussi à l'origine du déclenchement de maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, Parkinson ou encore l'autisme. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le méthylglyoxal serait impliqué dans la réticulation des protéines.

#### **d) Inhibition du méthylglyoxal**

Partant de ses conclusions, le docteur Potier a proposé et démontré l'efficacité de la metformine, réagissant avec le méthylglyoxal, entrant dans la formulation d'une pommade afin de soigner les lésions du pied de diabétique et plus généralement de toutes les plaies [114].

Chez le diabétique, le méthylglyoxal est présent dans le sang et au niveau des plaies pouvant réagir avec les facteurs de cicatrisation et ainsi les inhiber. La metformine, molécule hypoglycémiante utilisée dans le traitement du diabète réagit aussi avec le méthylglyoxal pour former un composé éliminé facilement. Cependant, la metformine n'est presque pas disponible dans le plasma et reste à 60 % dans les globules rouges. C'est pourquoi la metformine, lorsqu'elle est appliquée en pommade, permet une amélioration de la cicatrisation des lésions du pied du diabétique. Mais l'action de cette pommade est entravée si la plaie est infectée, ce qui est souvent le cas, et il est impératif d'éliminer le germe qui peut produire du méthylglyoxal. Cette découverte devrait mener à l'élaboration d'une nouvelle spécialité dans les années à venir.

## e) Actions de la phlorétine et la phlorizine

La phlorétine et la phlorizine peuvent piéger les formes réactives de méthylglyoxal (MGO) et de glyoxal (GO) en formant des produits d'addition mono- et di-MGO et GO (Figure 72). Dans des conditions physiologiques (37°C, pH 7,4), plus de 80 % du méthylglyoxal sont piégés par la phlorétine en 10 minutes et 68 % du glyoxal en 24h. La phlorizine est aussi active en piégeant 70 % du méthylglyoxal et 60 % du glyoxal en 24h [115].

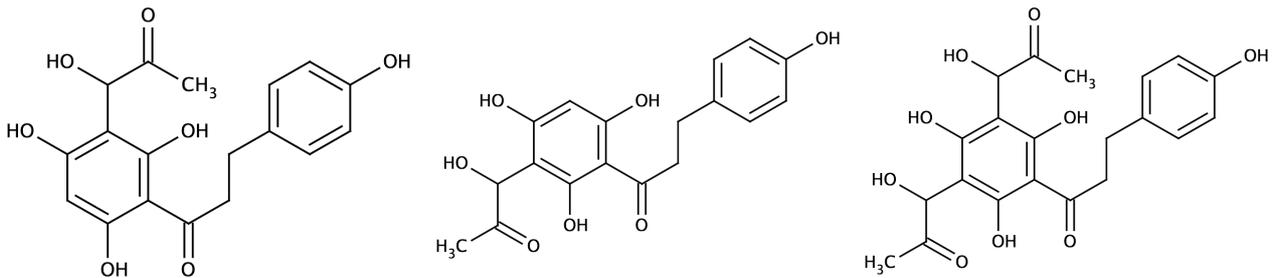


Figure 72 : Différents produits d'addition mono- et di-MGO résultant du piégeage par la phlorétine [115]

## f) Pharmacophore

Les positions 3 et 5 du cycle A de la phlorizine sont les sites majoritaires de liaison avec le MGO et le GO (Figure 73). Bien que la phlorizine soit aussi active que la phlorétine, son action est plus lente. Il semblerait que la glycosylation de l'hydroxyle en position 2 de la phlorétine diminue la cinétique de piégeage. En fait, lorsque l'hydroxyle est glycosylé, la mésomérie de la molécule est diminuée et l'addition nucléophile est alors plus difficile [115].

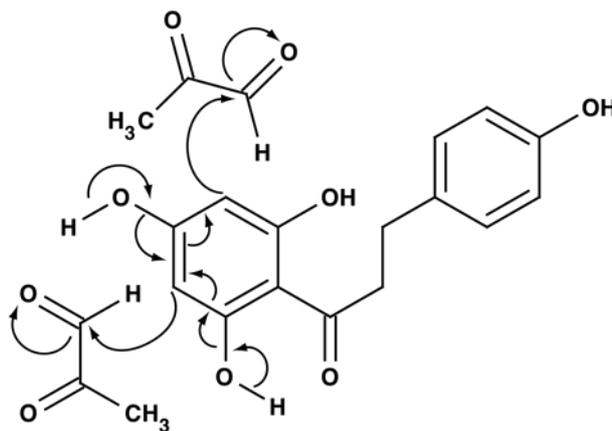


Figure 73 : Réaction de piégeage du MGO par la phlorétine [115]

## C. Action antidiabétique

Malgré la pléthore d'options thérapeutiques pour traiter le diabète, la normalisation de la glycémie et la réduction des complications du diabète à long terme reste problématique. Depuis la découverte de l'insuline au début des années 1920 jusqu'à la découverte des incrétines au cours de ces dernières années, et malgré tous les progrès effectués, le médicament antidiabétique idéal n'a pas encore été découvert. En fait, la metformine, l'un des agents hypoglycémisants oraux décrit en 1957, est encore recommandé comme traitement de première intention dans de nombreux cas. Au vu des prédictions catastrophiques de l'évolution de cette maladie dans les années à venir, l'industrie pharmaceutique consacre beaucoup de moyens à l'amélioration des traitements existants et la découverte de nouveaux produits efficaces. La phlorizine a, semble-t-il, ouvert la voie à l'une de ces nouvelles approches thérapeutiques [116].

### 1. Découverte des effets de la phlorizine

Dès 1886, il a été montré que l'administration de phlorizine par voie sous-cutanée provoque une sévère glycosurie. De plus, une administration chronique de phlorizine entraîne aussi une polyurie ainsi qu'une perte de poids. L'administration de phlorétine est par contre sans effet, démontrant l'importance de la forme glucosylée, tout comme l'administration de phlorizine par voie orale car elle est hydrolysée avant son absorption. La glycosurie provoquée par la phlorizine est dose dépendante jusqu'à atteindre un plateau. Ces effets ont été observés chez le rat, le hamster, le chien, le bovin et l'homme dès le début du siècle dernier [94, 117-120].

La découverte de ces effets a fait de la phlorizine un outil de premier choix dans l'étude de la fonction rénale dans les années 1900. De nombreuses découvertes sur le système rénal (l'hémodynamique rénale et les systèmes de transport dans les tubules) ont été possible grâce à la phlorizine [119, 120].

Jusque dans les années cinquante, il était admis que l'effet principal était dû à un blocage du transport du glucose au niveau du rein et du petit intestin [121]. Ce n'est que lorsque le cotransporteur sodium-glucose (SGLT - *Sodium-Glucose Linked Transporter*) a été identifié dans les années 1990 que le mécanisme et le potentiel de cette molécule ont suscité l'intérêt des chercheurs [122].

## 2. Les transporteurs du glucose (SGLT et GLUT)

Le rein joue un rôle prépondérant dans la régulation de la glycémie puisqu'il permet la réabsorption totale du glucose chez les sujets sains. Environ 180 g de glucose sont filtrés et réabsorbés dans les reins quotidiennement. Le tubule proximal a une capacité d'environ 375 mg/ml qui peut être dépassée lors d'une glycémie très élevée chez le sujet diabétique et entraîner une glycosurie. Il existe deux familles de transporteurs transmembranaires du glucose (Figure 74) : les transporteurs du glucose GLUT (*Glucose Transporter*) et les co-transporteurs sodium-glucose SGLT (*Sodium-Glucose Linked Transporter*) [116, 120, 122-124].

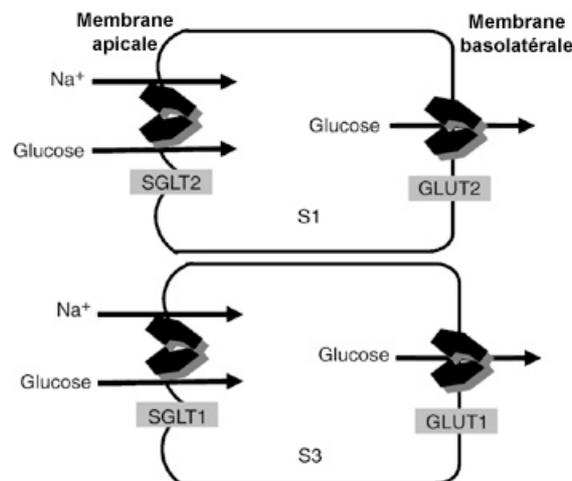


Figure 74 : Transport du glucose dans le tubule proximal[123]

La famille des transporteurs du glucose GLUT comporte 13 types ayant des spécificités de substrats, des propriétés cinétiques et une répartition tissulaire différentes. Parmi ces récepteurs, les transporteurs GLUT4 sont impliqués dans le transport dépendant de l'insuline dans les muscles et les adipocytes. Les transporteurs GLUT1, dans le transport indépendant de l'insuline, répartis sur de nombreux tissus tels que les érythrocytes et les cellules endothéliales. Leur expression à la surface des cellules est inversement proportionnelle à la glycémie. Enfin les transporteurs GLUT2 sont les principaux transporteurs entre le foie et le sang et sont localisés au niveau du foie, des cellules  $\beta$ -pancréatiques et de la membrane basolatérale du petit intestin et du tubule rénal.

Les transporteurs SGLT couplent le transport de molécules de glucose contre le gradient de concentration au transport d'ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) selon leur gradient de concentration. Deux isoformes ont été identifiés et clonés chez l'homme, SGLT1 et SGLT2.

Le transporteur SGLT1 est principalement localisé dans les cellules épithéliales du petit intestin où il est responsable de l'absorption du glucose alimentaire. Il est aussi présent dans le segment distal (S3) du tubule proximal du néphron (Figure 75). Il serait aussi présent au niveau du

coeur [125]. C'est un transporteur à haute affinité (glucose et galactose) mais de faible capacité. De ce fait, il n'a qu'un rôle mineur dans la réabsorption du glucose au niveau du rein. Le transporteur SGLT2 est spécifiquement localisé dans le segment contourné (S1) du tubule proximal. Pourtant une étude a démontré que l'ARNm (acide ribonucléique messenger) codant pour ce transporteur était transcrit de manière ubiquitaire dans les 23 tissus humains testés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [125]. A l'inverse du transporteur SGLT1, c'est un transporteur de haute capacité mais à faible affinité. Il participe activement à la réabsorption du glucose puisqu'il est responsable de 90 % de sa recapture.

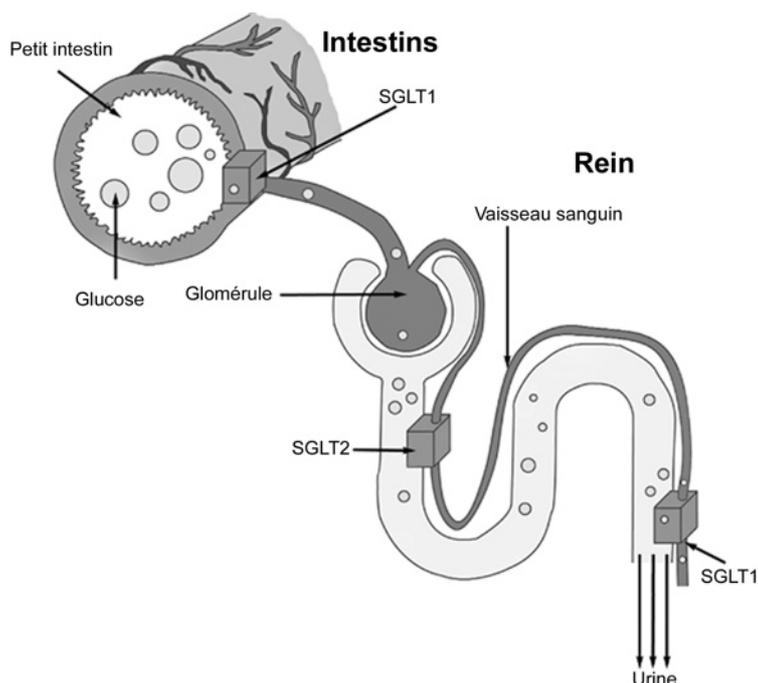


Figure 75 : Répartition des récepteurs SGLT dans le corps [122]

### 3. Potentiel des inhibiteurs des SGLT

Les inhibiteurs des SGLT2 représentent une innovation thérapeutique dans le traitement de l'hyperglycémie et/ou de l'obésité chez des patients atteints de diabète de type 1 ou 2 en favorisant l'élimination urinaire du glucose. Le fait que de nombreuses personnes atteintes de glycosurie familiale ne voient pas leurs fonctions rénales altérées à long terme laisse supposer que ce traitement pourrait être envisagé.

Le fait d'augmenter la glycosurie a suscité des interrogations quant aux risques accrus d'infections urinaires. Cependant, il n'y a pas eu d'augmentation significative d'infections urinaires lors d'une étude réalisée sur 600 femmes diabétiques ayant une glycosurie [126]. Cette conclusion a été confirmée depuis par des études cliniques sur les inhibiteurs des SGLT qui n'ont pas non plus démontré un risque accru d'infections urinaires chez des patients sous traitement.

Le diabète est une pathologie complexe du fait qu'il existe deux types de diabète. De plus le diabète de type 2 est une pathologie multifactorielle qui implique des relations complexes entre une résistance à l'insuline, une baisse de l'activité des cellules  $\beta$ -pancréatiques, un terrain génétique prédisposant et des facteurs environnementaux.

Ainsi, les inhibiteurs des transporteurs SGLT auraient l'avantage de réduire la glycémie de manière totalement indépendante de la pathologie sous-jacente. De ce fait, il est possible de traiter à la fois les patients atteints de diabète de type 1 et de type 2 chez lesquels une hyperglycémie inhibe les cellules  $\beta$ -pancréatiques conduisant à l'aggravation de la pathologie. De plus, comme ils n'interfèrent pas avec le métabolisme du glucose, ils peuvent être utilisés en complément des autres traitements (Figure 76).

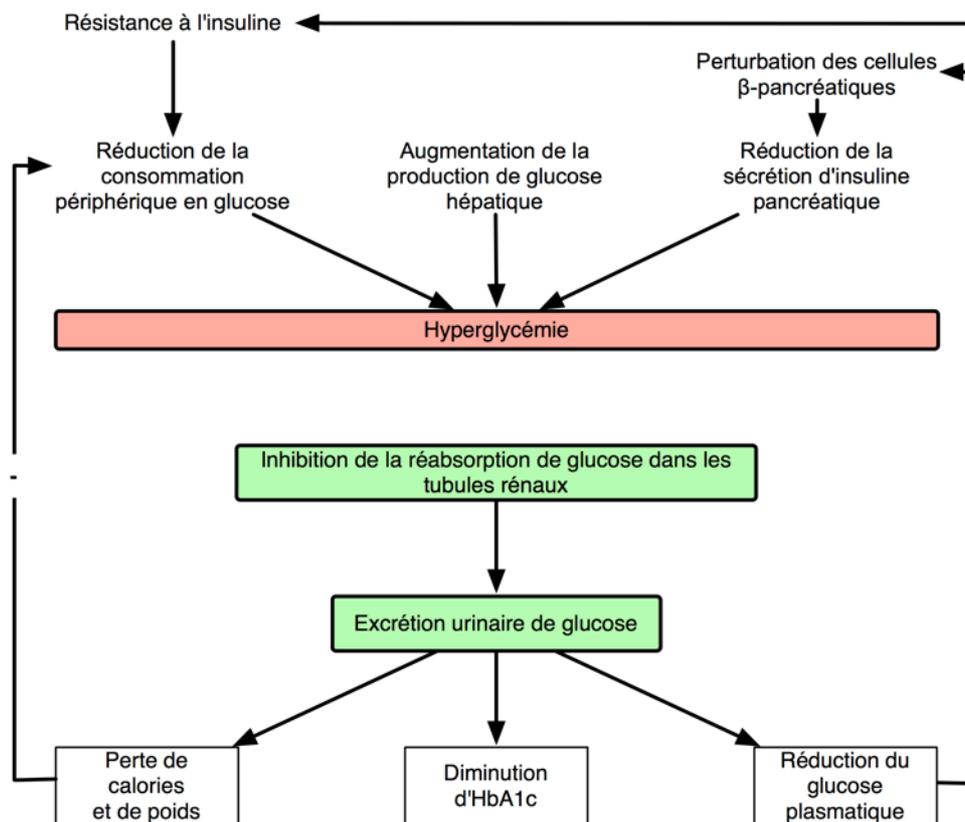


Figure 76 : Représentation des effets cliniques des inhibiteurs de SGLT2 [122]

Les conséquences de la glycosurie sont évidemment une baisse de la glycémie à court terme et une baisse de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) à plus long terme. De plus, la phlorizine restaure le mécanisme de régulation du glucose. En effet, elle améliore la sensibilité à l'insuline sans avoir d'effet directement sur l'insuline ni sur sa sécrétion et restaure la sécrétion de glucagon [127-129].

Les effets précédemment présentés sont tous liés à une administration parentérale car seule la phlorizine inhibe les récepteurs SGLT1 et SGLT2. Cependant une administration orale de phlorizine à des souris permet de diminuer de manière significative le pic glycémique postprandial

de 50 %. Cet effet est certainement lié à l'inhibition des récepteurs SGLT1 au niveau du petit intestin [130]. Pourtant en 2009, une équipe a confirmé l'effet de la phlorizine sur la glycémie par voie orale mais a aussi détecté pour la première fois la présence de phlorizine dans le sang de souris diabétiques (diabète induit par la streptozotocine). Selon leurs conclusions, la phlorizine inhiberait aussi l'expression du gène codant pour le transporteur SGLT1 [131].

Cependant, d'autres effets de la phlorizine plus ou moins directs ont été mis en avant. De fortes concentrations ( $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  M) de phlorizine inhibent le métabolisme aérobie et provoquent le gonflement des mitochondries. Des concentrations plus faibles ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  M) bloquent le transport du glucose dans les érythrocytes [132].

#### **4. Inhibiteurs des SGLT**

La phlorizine est ainsi devenue le chef de file de cette nouvelle classe de drogue mais sa très faible biodisponibilité par voie orale a immédiatement exclu son utilisation comme candidat médicament. De plus, la phlorizine n'est pas spécifique de l'un des deux isoformes du transporteur SGLT. Or, il est préférable de développer des molécules spécifiques des récepteurs SGLT2 qui ne sont présents qu'au niveau du rein et sont responsables de la majorité de la recapture du glucose. Ces dernières années la recherche de nouveaux inhibiteurs a permis de découvrir de nouvelles molécules dont quelques rares résultats cliniques permettent de juger de leur efficacité [122].

La majorité des molécules développées sont dérivées de la phlorizine. Elles sont toutes des prodrogues dont les modifications structurales permettent d'améliorer la biodisponibilité, la sélectivité vis-à-vis des transporteurs SGLT2 et la pharmacocinétique. Une grande partie des molécules ont été brevetées, principalement par des sociétés japonaises.

La molécule T-1095 est la première molécule développée. C'est une prodrogue rapidement métabolisée en métabolite actif (T-1095A) dans le foie après administration orale. Ce métabolite a une forte affinité et sélectivité pour les récepteurs SGLT2. De grands laboratoires pharmaceutiques sont entrés dans la course. D'autres molécules participent à des essais cliniques (Figure 77) dont la molécule AVE2268 (Sanofi-Aventis, Paris, France), la sergliflozine (molécule 869682 ; GSK, Londres, Royaume Unis), la dapagliflozine (molécule 512148 ; Bristol Myers Squibb, New York, USA - Astra Zeneca, Londres, Royaume Unis) et JNJ-28431754 (Johnson & Johnson, New Jersey, USA). Les molécules les plus prometteuses sont la dapagliflozine qui a déjà été testée dans des essais cliniques de phase II ainsi que la sergliflozine. Cependant, GSK a déjà développé un futur remplaçant de la sergliflozine, la remogliflozine (molécule 189075) actuellement en phase clinique IIb.

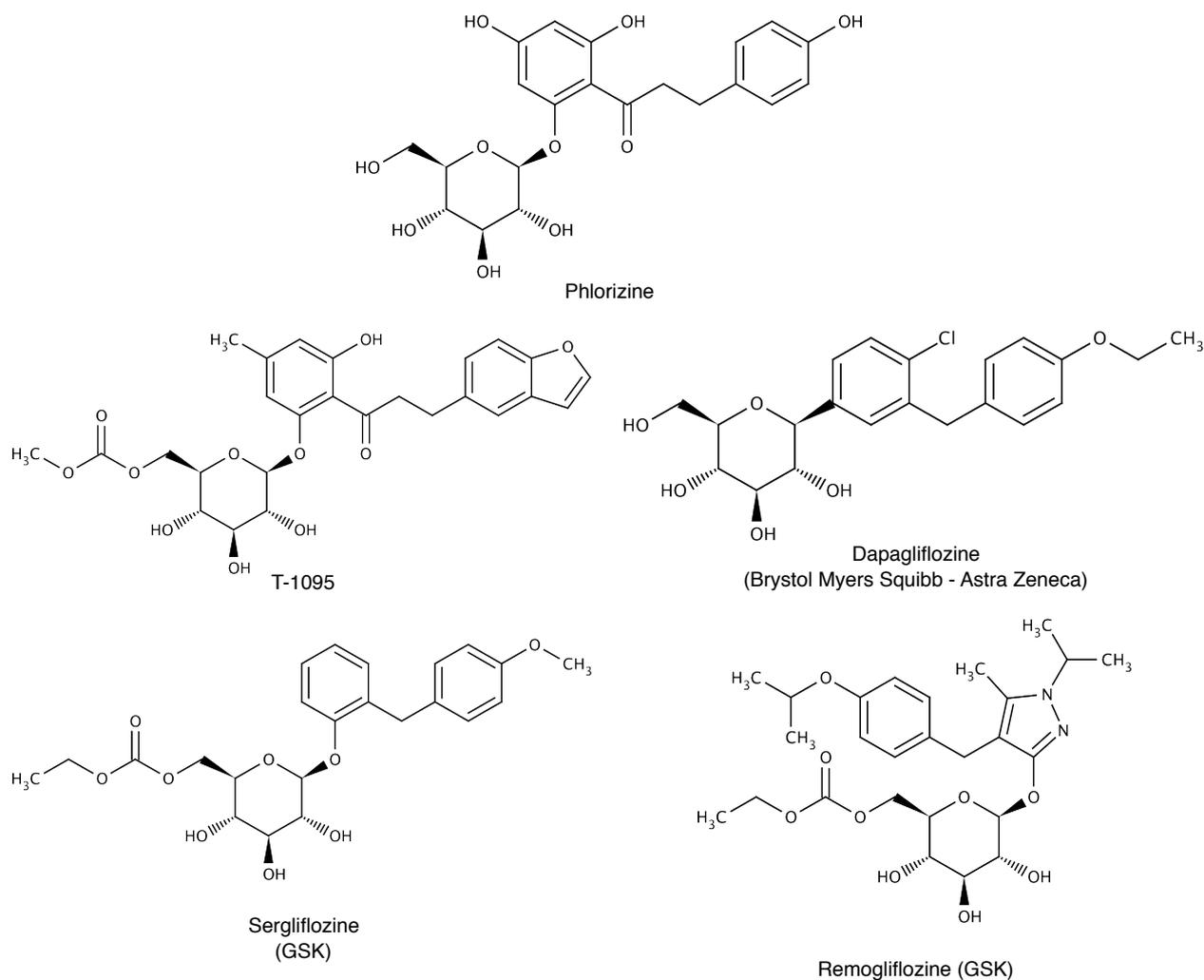


Figure 77 : Inhibiteurs des SGLT

## 5. Inhibition des GLUT2

La phlorizine inhibe les transporteurs SGLT1 et SGLT2 mais n'a aucun effet sur les transporteurs GLUT. Par contre son aglycone, la phlorétine est un inhibiteur des récepteurs GLUT et notamment les récepteurs GLUT2 [133, 134].

Les transporteurs GLUT2 sont insérés de façon permanente dans les membranes basolatérales des entérocytes, et de façon transitoire, au cours d'un repas sucré, dans la membrane apicale améliorant ainsi la capacité d'absorption intestinale des sucres [135]. De ce fait, leur inhibition au niveau de l'intestin, diminue fortement l'absorption du glucose car la voie passive par les transporteurs GLUT2 est la voie majeure d'absorption, trois fois supérieure à celle des SGLT1 [133, 134].

## D. Action antiobésité

L'obésité est un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires, du diabète de type 2 mais aussi de la stéatose hépatique. La stéatose est une pathologie histologique, caractérisée par une accumulation de lipides tels que les triglycérides dans les hépatocytes. Ces lipides altèrent les fonctions métaboliques du foie et sont responsables de nombreuses complications chez 50 % des diabétiques et 76 % des personnes obèses et 100 % des personnes cumulant ces deux facteurs.

Des travaux menés par l'institut Max Rubner (Karlsruhe) ont démontré que l'administration de jus de pomme à des souris obèses, développant une stéatose hépatique accompagnée de dérégulations du système lipidique et de résistance à l'insuline, a permis de normaliser la stéatose hépatique et les paramètres inflammatoires [136]. Le foie a retrouvé un état normal, les masses lipidiques ayant disparues sans que l'animal n'ait perdu de poids. Tout se passe comme si les lipides avaient été chassés hors de l'organe (Tableau 9).

	Souris obèses contrôle	Souris obèses + jus
Poids corporel (g)	338,3 ± 19,4	340,1 ± 30,9
Poids relatif du foie (%)	5,75 ± 1,34	3,46 ± 0,65 **
Lipides totaux hépatiques (g/foie)	7,66 ± 3,05	1,90 ± 0,86 **
Triglycérides hépatiques (mg/foie)	3539,1 ± 1424,6	1105,4 ± 751,0 **
Cholestérol hépatique (mg/foie)	42,76 ± 13,91	21,14 ± 4,98 **
Triglycérides plasmatiques (mg/dl)	123,2 ± 59,8	269,3 ± 114,6 **
Cholestérol plasmatique (mg/dl)	337,7 ± 40,2	271,9 ± 48,8 **
Glucose plasmatique (mg/dl)	120,0 ± 12,8	117,5 ± 12,1
Insuline plasmatique	22,60 ± 16,37	7,83 ± 3,53 *

Tableau 9 : Paramètres plasmatiques et hépatiques de souris obèses nourries avec du jus de pomme ou une solution à valeur énergétique équivalente [136]  
(n=12 animaux par groupe ; \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; ANOVA)

Cette découverte apporte énormément d'espoir dans le traitement de l'obésité et du diabète et plus généralement du syndrome métabolique puisqu'il permet d'ôter un facteur de risque primordial dans l'évolution de la pathologie. Ces premiers essais font partie d'un programme visant à déterminer les molécules actives de la pomme. Les premiers espoirs se sont posés sur les dihydrochalcones du fait de leur activité sur les adipocytes et les études sont en cours.

## E. Action anticancéreuse

Des études épidémiologiques ont démontré que la consommation d'une ou plusieurs pommes par jour diminuait le risque de développer un cancer notamment des poumons et du colon [137]. Le phénomène de cancérogenèse est un très long procédé qui dure des années entre l'initiation de la tumeur et son diagnostic. La compréhension de ce procédé au niveau cellulaire et moléculaire ayant fait de grands progrès ces dernières années, une nouvelle approche préventive du cancer a fait son apparition. Sous le terme de chimioprévention, elle consiste à bloquer, inhiber, ou inverser le développement et la progression de cellules pré-cancéreuses en utilisant des agents non-cytotoxiques ou des nutriments [137].

Il a été démontré *in vitro* que les extraits de pomme influencent un certain nombre de mécanismes intéressants dans la prévention du cancer. Ils ont une activité antimutagène, antioxydante, anti-inflammatoire, antiproliférative, modulent le métabolisme carcinogène ainsi que les voies de signalisation intracellulaires. Ils ont aussi un effet sur les mécanismes épigénétiques et immunitaires, et enfin induisent l'apoptose. Les produits de la pomme permettent de prévenir la carcinogenèse de la peau, du sein et du côlon [137].

L'administration d'extraits de composés phénoliques de la pomme inhibe *in vitro* la prolifération de cellules tumorales et module l'expression de gènes liés au métabolisme des xénobiotiques. L'action antiproliférative des composés phénoliques de la pomme peut avoir de très nombreuses causes. La plus facile à expliquer est leur action antioxydante. En effet, les composés antioxydants sont connus pour avoir un effet protecteur sur les lésions de l'ADN. Cependant cet effet ne semble pas être le plus important car de nombreux composés phénoliques, dont la phlorétine agissent directement sur le métabolisme et les voies de signalisation des cellules tumorales ainsi que sur l'expression de certains gènes [138].

Les cellules cancéreuses sont des cellules à forte activité métabolique qui nécessitent des apports énergétiques importants. Ainsi, les transporteurs du glucose sont surexprimés à leur surface afin de permettre un apport suffisant de glucose. D'ailleurs le glucose radio-marqué (fluoro-2-deoxy-D-glucose) est utilisé en diagnostic clinique dans la détection de cancers par tomographie à émission de positon (TEP).

Par son action sur les transporteurs GLUT, la phlorétine a permis une inhibition de 60 % de la consommation en glucose. La diminution de l'apport en glucose permet en association avec d'autres agents cytotoxiques, d'augmenter leur efficacité [139, 140]. D'autres études ont démontré que l'apoptose des cellules pouvait être déclenchée directement par l'inhibition du transport du glucose par la phlorétine [141-143]. La phlorétine a aussi une action sur la protéine kinase C qui

joue aussi un rôle dans l'apoptose cellulaire [144, 145]. La phlorétine interviendrait sur un certain nombre de voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'apoptose. La phlorétine augmenterait l'activité caspase-3, ainsi que la signalisation des JNK (*Jun N-terminal Kinase*) et des MAPK p38 (Mitogen-Activated Protein kinase p38) [146].

## **F. Action sur la contractilité des myocytes (canaux calciques et potassiques)**

Le réticulum sarcoplasmique est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium. La membrane du réticulum sarcoplasmique contient la calcium ATPase (SERCA). Cette protéine est une pompe permettant l'accumulation du calcium à l'intérieur du réticulum, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Lorsqu'une cellule musculaire est stimulée, le réticulum sarcoplasmique libère des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) qui vont interagir avec la protéine troponine et induire la contraction de la cellule. Quand la stimulation cesse, la libération d'ions calcium s'arrête. Les ions libérés sont alors repompés dans le réticulum par la SERCA et la cellule se relaxe.

La phlorétine et la phlorizine ont toutes deux démontré une action sur les transporteurs transmembranaires SERCA en inhibant la recapture des ions calcium sur du réticulum sarcoplasmique de cellules cardiaques isolées. Cependant seule la phlorétine a démontré une action sur des cellules cardiaques entières [147].

Les flux calciques de myocytes cardiaques de rat isolés, stimulés électriquement en absence ou en présence de phlorétine et de phlorizine ont été étudiés. L'amplitude et la surface des courants électriques provoqués par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont significativement augmentées en présence de 20  $\mu\text{M}$  de phlorétine. Ainsi, la contraction des cellules est aussi augmentée de près de 4 fois en présence de phlorétine. Cependant, à des concentrations supérieures en phlorétine, les cellules s'hypercontractent dès le début de la stimulation électrique mais ne se relaxent plus. Enfin, le potentiel d'action des cellules est prolongé de 31 ms à 165 ms. Ce dernier effet semble dû à une modification des courants d'ions potassium ( $\text{K}^+$ )  $I_{\text{to}}$  qui participe à la repolarisation des membranes après le passage d'un potentiel d'action. Ces effets sont réversibles puisque les valeurs reviennent à la normale après lavage des cellules. Aucun effet significatif n'a été observé en présence de phlorizine [148]. La réelle cause de ces effets reste indéterminée, notamment par la récurrence de ces découvertes. En effet, il n'est pas certain que les effets soient dus à l'action inhibitrice des SERCA car les concentrations en phlorétine utilisées avaient démontré une inhibition de seulement 10 % de l'activité de la SERCA [147].

L'augmentation de la contraction serait peut-être plutôt à chercher du côté de l'action sur les canaux potassiques (K<sup>+</sup>) et l'augmentation du temps des potentiels d'actions [148]. En effet, un certain nombre de publications ont évoqué le fait que la phlorétine pouvait s'adsorber sur les membranes lipidiques et ainsi modifier les potentiels membranaires. L'adsorption de la phlorétine, qui a un fort moment dipolaire (5,6 Debye), aurait des conséquences sur la perméabilité des composés chargés électriquement en augmentant la conductance des cations et en diminuant celle des anions [149-154].

Les auteurs imputent l'absence d'action de la phlorizine à son manque de passage intracellulaire. En effet, la phlorizine traverse les membranes grâce à un transporteur. L'entrée de phlorizine dans la cellule pourrait ainsi ne pas être suffisante, d'autant plus que la phlorizine avait montré un effet très limité sur les SERCA [148].

La phlorétine a montré un effet sur la contractilité des myocytes et notamment des myocytes cardiaques. Cependant, comme les auteurs le font justement remarquer, il est très improbable que cet effet puisse intervenir lors de la consommation normale de pommes ou de produits dérivés. En effet, les concentrations y sont très faibles et la métabolisation en glucuronides fait que le taux de phlorétine plasmatique est trop faible pour engendrer une action de ce type [148].

## **G. Action sur la mémoire**

L'importance de la glycémie sur les capacités intellectuelles et en particulier les capacités d'apprentissage et de mémoire a été démontrée depuis de longues années. Dans ce cas, il serait attendu que la phlorizine qui inhibe des transporteurs du glucose ait un effet négatif sur la mémoire d'autant plus qu'une étude a démontré dès 1975 que la phlorizine bloquait la consommation de glucose dans le cerveau [155]. Cependant, il a été démontré que la phlorizine était un composé augmentant les facultés de mémorisation [156, 157].

Quand la phlorizine est administrée par voie intrapéritonéale à des rats ou des souris à des concentrations très faibles, de l'ordre de 3 à 300 µg/kg, avant ou après un test d'entraînement, elle permet une augmentation significative du potentiel de mémorisation des animaux par rapport aux animaux contrôles. La phlorizine a des effets sur le processus de mémorisation mais pas sur la récupération de la mémoire.

Bien que le mécanisme d'action reste mystérieux, il a été démontré que la phlorizine, aux concentrations testées, n'entraînait pas de modification de la glycémie, ni de modification du transport du glucose vers les cellules du cerveau.

## H. Action sur les poumons

Dans plusieurs études, la consommation de pommes a été inversement liée à l'apparition d'asthme et autres maladies obstructives chroniques des bronches et a, plus généralement, été fortement associée à une bonne santé pulmonaire.

Une étude a mis en avant l'activité de la phlorizine au niveau pulmonaire. La phlorizine permet de diminuer l'absorption du fluide alvéolaire *in et ex vivo*. Cet effet ne semble pas lié à une modification métabolique. Il a été avancé que cet effet pourrait être dû aux cotransporteurs sodium-glucose dont une équipe de chercheurs supporte l'idée qu'ils pourraient être impliqués dans le transport actif transalvéolaire de sodium [158].

## I. Action antimalarique

Dès sa découverte, par extrapolation des propriétés antipyrétiques d'autres extraits de racine tels que ceux de sauge et de quinine et de par son goût amer, la phlorizine a été étudiée pour ses effets antimalariques. Ce n'est que 150 ans plus tard que l'on a démontré qu'elle avait des effets inhibiteurs du développement intraérythrocytaire du paludisme dans des cultures *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Le parasite serait sensible à cette molécule à son stade trophozoïte et une exposition de 2 à 8 heures causerait un arrêt définitif de son développement. La phlorizine aurait même un second mode d'action puisqu'elle inhiberait aussi la formation, par le parasite, de pores dans la cellule hôte. En effet, la phlorizine, qui ne peut normalement pas pénétrer dans les cellules, profite des pores induits par la présence du parasite. Ces mêmes pores pourraient aussi représenter le site d'action qui serait ainsi bloqué. Cet effet est réversible lorsque les cellules sont lavées et remises en culture [159].

## J. Application actuelle

Actuellement, la phlorétine est utilisée en tant que principe actif dans un seul produit présent sur le marché. Il s'agit d'un produit cosmétique anti-rides, présenté sous la forme d'un sérum de 30 ml vendu environ 150€ et développé par les laboratoire SkinCeuticals.



Phloretin CF est une association de 2 % de phlorétine, 10 % d'acide ascorbique (vitamine C) et 0.5 % d'acide férulique. Cette association est vantée comme : « agissant à la fois sur la prévention et la correction des signes de l'âge. Phloretin CF aide à protéger efficacement les cellules de la peau contre un large spectre de radicaux libres connus pour causer des dommages importants au niveau de l'ADN des cellules, corrige rapidement les signes visibles du vieillissement cutané (rides, taches, hyperpigmentation, teint terne) grâce à la phlorétine qui stimule la synthèse du collagène et accélère le renouvellement cellulaire. La peau est renforcée intensément, visiblement lissée, rajeunie et éclatante à l'extérieur » [160].

D'un point de vue scientifique, l'acide férulique est un puissant antioxydant tout comme la vitamine C. Il est possible que ces trois antioxydants combinés permettent une action à différents niveaux et sur plusieurs systèmes oxydatifs. Il a été démontré que cette association protégeait des conséquences d'une exposition aux rayonnements UV [109]. De plus, les nombreuses propriétés de la phlorétine, à savoir son fort potentiel à traverser les membranes lipidiques, son action antioxydante et préventive de la peroxydation des lipides ainsi que son action sur les cellules cancéreuses et son inhibition du méthylglyoxal pourraient justifier son utilisation et ses bénéfices contre le vieillissement de la peau.

Dans tous les cas, l'opinion des consommatrices vis à vis de ce nouveau produit est plutôt bonne, hormis quelques femmes se plaignant de voir leur peau se dessécher quelque peu. Les cinq années de recherches de SkinCeuticals semblent avoir porté leur fruits, au moins d'un point de vue commercial, car c'est cet argument ainsi que les nombreuses publications sur les bienfaits de la phlorétine qui semblent être le plus convaincant auprès de la gente féminine cliente de ce produit.

## K. Synthèse

De nombreuses propriétés thérapeutiques ont été attribuées aux dihydrochalcones de la pomme. Le tableau 10 résume les différents effets de ces molécules qui ont été abordés dans ce mémoire en précisant la forme active et la voie d'administration proposée.

Effet	Forme active	Voie d'administration proposée
antioxydant	aglycone/glycosides	voie orale
inhibiteur du méthylglyoxal et glyoxal	aglycone/glycoside	voie orale / locale
inhibiteur de la recapture du glucose	glucoside	voie intraveineuse
anticancéreux	aglycone	voie orale
contractilité des myocytes	aglycone	voie intraveineuse
action sur les poumons	glucoside	voie intraveineuse / locale ?
action sur la mémoire	glucoside	voie intraveineuse
antimalarique	aglycone	voie intraveineuse

Tableau 10 : Effets thérapeutiques des dihydrochalcones de la pomme

Les voies d'administration jouent un rôle prépondérant dans l'activité des divers dihydrochalcones. En effets, les glycosides sont hydrolysés dans le tube digestif avant leur absorption. Cependant des études galéniques pourraient permettre de protéger les formes glycosides. De plus, la consommation de pommes en fin de repas pourrait, grâce à la matrice alimentaire qui tamponne l'acidité gastrique et inhibe (ou sature) les activités enzymatiques, permettre de protéger les formes glycosides de la lyse. Ceci permettrait d'augmenter la concentration en glycosides au niveau de la paroi épithéliale du tube digestif. Malheureusement, aucune étude n'a déterminé si les glycosides étaient capables de traverser la barrière intestinale, bien qu'une étude ait détecté la présence de phlorizine dans le sang de souris après administration orale. De plus, il a été démontré que la phlorétine était très rapidement métabolisée et ne représentait que 5 à 15 % des formes présentes dans le sang. De ce fait, la forme majoritaire dans l'organisme est la forme conjuguée qui n'a fait l'objet d'aucune étude concernant ses potentiels effets.

Ainsi, bien qu'on attribue de nombreux effets thérapeutiques à la phlorétine et la phlorizine, il reste de nombreuses études à réaliser sur les effets de leurs formes métabolisées présentes dans le plasma et sur les autres dihydrochalcones de la pomme. En effet, la phlorétine-2'-xyloglucoside et les glycosides de l'hydroxyphlorétine n'ont fait l'objet d'aucune étude certainement car ils ne sont pas disponibles sur le marché.

# Conclusion

Les dihydrochalcones sont des polyphénols présents dans la pomme et dans tous ses produits dérivés. Bien qu'ils soient minoritaires (présent en faibles concentrations), ils peuvent représenter une part non négligeable des composés phénoliques dans le jus par exemple. Leur étude au laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg a permis de mettre en évidence la présence de dihydrochalcones non encore identifiées.

Par ailleurs, il a été démontré que la séparation et la concentration des dihydrochalcones à grande échelle étaient possible de manière aisée en utilisant des colonnes de phase inverse et des gradients eau/méthanol adaptés. De plus, l'utilisation de colonnes de PVPP permettrait de les extraire du jus facilement et avec un coût relativement peu élevé.

La phlorizine est devenue le chef de file d'une nouvelle classe de médicaments antidiabétiques qui inhibe la recapture du glucose dans le rein et permet ainsi de diminuer fortement la glycémie. De nombreux groupes pharmaceutiques se sont lancés dans la course afin de proposer des traitements dans les années à venir.

De manière générale, des études épidémiologiques ont démontré que la consommation de pommes était corrélée à une diminution du risque de diabète de type 2 mais aussi une perte de poids et une diminution de la glycémie. A cela s'ajoutent les effets inhibiteurs de la peroxydation des lipides et la diminution du cholestérol. Tous ces paramètres sont directement impliqués dans toutes les composantes du syndrome métabolique. Si on considère que les polyphénols sont majoritairement responsable de ces effets bénéfiques pour la santé, il est important de se rappeler qu'ils sont essentiellement présents dans la peau des pommes. De ce fait, il est conseillé de manger les pommes non pelées. Pourtant c'est aussi dans la peau qu'on retrouve les produits phytosanitaires. Mais ceci est un autre débat...

Même si les dihydrochalcones de la pomme ne sont pas des molécules miracles, les effets bénéfiques suggérés par toutes les études scientifiques devraient mener à une augmentation de la consommation de produits à base de pomme ou un enrichissement en concentrés phénoliques issus de la pomme dans des suppléments alimentaires.

Alors n'hésitez plus et mangez des pommes !

# Bibliographie

- [1] Section Nationale Pomme. <http://www.lapomme.org/>, consulté le 19/07/2009
- [2] Les crets fruits et pomologie, *Ressources génétiques du pommier*. <http://pomologie.com/pomme1/datapom/types.htm>, consulté le 22/07/09
- [3] CCLF, Cidreries du Calvados La Fermière. <http://www.cidre-ecusson.com>, consulté le 23/07/2009
- [4] Parcours Le Monde. [http://www.parcourslemonde.com/dossiers/index\\_dossiers.php?colonne=1&article=pomme.html](http://www.parcourslemonde.com/dossiers/index_dossiers.php?colonne=1&article=pomme.html), consulté le 23/07/2009
- [5] Pomme - Wikipedia. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Pomme>, consulté le 22/07/2009
- [6] Le Petit Futé. *New York (10<sup>e</sup> édition)*. Nouvelles Editions de l'Université; 2007
- [7] Tous-les-fruits.com. *Pomme*. <http://tous-les-fruits.com/fruit-320.html>, consulté le 19/07/2009
- [8] Croqueurs de pommes. <http://www.croqueurs-de-pommes.asso.fr>, consulté le 23/07/2009
- [9] FAOSTATS (Food And Agriculture Organization Of The United Nations), <http://faostat.fao.org/>, consulté le 19/07/2009
- [10] Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. *Les Composés Polyphénoliques des végétaux*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes; 2005
- [11] Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, and Kanazawa K. *Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (3): p571-581
- [12] De Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. Journal of Chromatography A. 2006 ; 1112: p31-63
- [13] Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*. Analyst. 2000; 125 (5): p989-1009
- [14] Lu Y; Yeap Foo L. *Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace*. Food Chemistry 1997; 59 (2): p187-194
- [15] Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, BERRUETA LA, *et al*. *On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection*. Journal of Chromatography A 2004; 1046: p89–100
- [16] Kahle K, Kraus M, Richling E. *Polyphenol profiles of apple juices*. Mol. nutr. Food res. 2005; 49: p797-806
- [17] Escarpa A, González MC. *High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties*. Journal of Chromatography A 1998; 823: p331–337
- [18] Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau JF. *Polyphenol profiles of french cider Apple varieties (Malus domestica sp.)*. J. Agric. Food Chem. 1999; 47 (12): p4847-4853

- [19] Escarpa A, Gonzalez MC. *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*. Anal. Chim. Acta. 2001; 427 (1): p119-127
- [20] Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JP. *Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (Malus domestica Var. Kermerrien)*. J. Agric. Food Chem. 1998; 46 (5): p1698-1705
- [21] Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F. *Quantitation of polyphenols in different apple varieties*. J. Agric. Food Chem. 2004; 52 (21): p6532-6538
- [22] Lawson AM. *Etude Phytochimique d'une Fabacée tropicale*. Sciences de la Vie et de la Santé, Sciences Pharmaceutiques – Phytochimie/Biologie, Université de Limoges; 2006
- [23] Robards K. *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables*. Journal of Chromatography A. 2003; 1000 (1-2): p657-691
- [24] Harborne JB, Williams CA. *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry. 2000; 55 (6): p481-504
- [25] Stéphane B. *Stratégie d'étude de produits de l'oxydation de polyphénols par LC/MS : application au jus de pomme*. Biologie, Université de Rennes I; 2005
- [26] Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. *Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits*. J. Agric. Food Chem. 1992; 40 (9): p1591-1598
- [27] Tomás-Barberán FA, Clifford MN. *Review Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden*. J. Sci. Food. Agric. 2000; 80 (7): p1073-1080
- [28] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am. J. Clin. Nutr. 2004; 79 (5): p727-747
- [29] Lin LZ, Harnly JM. *A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials*. J. Agric. Food Chem. 2007; 55 (4): p1084-1096
- [30] Lister CE, Lancaster JE, Walker JRL. *Developmental changes in enzyme of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars*. J. Sci. Food. Agric. 1996; 71 (3): p313-320
- [31] Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM. *Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population*. J. Agric. Food Chem. 2004; 52 (5): p1124-1131
- [32] Lu Y, Yeap Foo L. *Isolation and identification of procyanidins in apple pomace*. Food Chemistry 1999; 64 (4): p511-518
- [33] Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. *Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC)*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (21): p6347-6353
- [34] Burda S, Oleszek W, Lee CY. *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*. J. Agric. Food Chem. 1990; 38 (4): p945-948

- [35] Spanos GA, Wrolstad RE, Heatherbell DA. *Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Apple Juice*. J. Agric. Food Chem. 1990 ; 38 (7): p1572-1579
- [36] Alonso-Salces RM, Korta E, Barranco A, Berrueta, LA, Gallo B, Vicente F. *Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49 (8): p3761-3767
- [37] Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I, Carle R. *Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (Malus domestica cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS*. Phytochem. Anal. 2002; 13 (2): p87-94
- [38] Mihalev K, Schieber A, Mollov P, Carle R. *Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice*. J. Agric. Food Chem. 2004; 52 (24): p7306-7310
- [39] Sadilova E, Carle R, Stintzing FC. *Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity*. Mol Nutr Food Res. 2007; 51 (12) : p1461-1471
- [40] Dick AJ, Redden PR, DeMarco AC, Lidster PD, Grindley BT. *Flavonoid Glycosides of Spartan Apple Peel*. J. Agric. Food Chem. 1987; 35 (4): p529-531
- [41] Noveroske RL, Williams EB, Kue J. B-glucosidase and phenoloxydase in apple leaves and their possible relation to resistance to venturia inaequalis. Phytopathology. 1964; 54: 98-103
- [42] Petersen C. *Analyse des Phloridzins*. Annales Academie Science. Française. 1835; 15: p178
- [43] Auguste Cahours. *Traité de chimie générale élémentaire: leçons professées à l'Ecole centrale des arts et manufactures, Volume 3 (2<sup>e</sup> édition)*. Mallet-Bachelier; 1860 p95-96
- [44] Justus von Liebig. *Traité de Chimie Organique (3<sup>e</sup> édition)*. Fortin; 1843 p206-208
- [45] Tomás-Barberán FA, García-Viguera C, Nieto J, Ferreres F, Tomás, Tomás-Lorente F. *Dihydrochalcones from apple juices and jams*. Food Chem. 1993; 46: p33-36
- [46] Versari A, Biesenbruch S, Barbanti D, Farnell PJ. *Adulteration of fruit juices : Dihydrochalcones as quality markers for apple juice identification*. Lebensm. Wiss. Technol. 1997; 30 (6): p585-589
- [47] Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, et al. *Detection of phloridzin in strawberries (Fragaria x ananassa Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and nmR spectroscopy*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (10): p2896-2899
- [48] Hvattum E. *Determination of phenolic compounds in rose hip (Rosa canina) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection*. Rapid Commun. Mass.Spectrom. 2002 ; 16 (7) : p655-662
- [49] Leu SJ, Lin YP, Lin RD, Wen CL, Cheng KT, Hsu FL, Lee MH. *Phenolic Constituents of Malus doumeri var. formosana in the Field of Skin Care*. Biol Pharm Bull. 2006; 29 (4): p740-745
- [50] Oleszek W, Lee CY, Jaworski AW, Price KR. *Identification of some phenolic compounds in apples*. J. Agric. Food Chem. 1988; 36 (3): p430-432
- [51] Lu Y, Yeap Foo L. *Constitution of some chemical components of apple seed*. Food Chem. 1998; 61 (1-2): p29-33

- [52] Schieber A, Keller P, Carle R. *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 2001; 910 (2): p265-273
- [53] Arts ICW, Hollman PCH. *Optimization of a Quantitative Method for the Determination of Catechins in Fruits and Legumes*. J. Agric. Food Chem. 1998, 46 (12): p5156–5162
- [54] Mangas JJ, Suárez B, Picinelli A, Moreno J, Blanco D. *Differentiation by phenolic profile of apple juices prepared according to two membrane techniques*. J. Agric. Food Chem. 1997; 45 (12): p4777-4784
- [55] Suárez B, Picinelli A, Moreno J, Mangas JJ. *Changes in phenolic composition of apple juices by HPLC with direct injection*. J Sci. Agric. 1998; 78: p461-465
- [56] Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA. *Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage*. J. Agric. Food Chem. 1995; 43 (7): p1794-1801
- [57] Alonso-Salces RM, Herrero, C, Barranco A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. *Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions*. Food Chemistry 2005; 93 (1): 113-123
- [58] Alonso-Salces RM, Herrero, C, Barranco A, López-Márquez DM, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. *Polyphenolic compositions of Basque natural ciders: A chemometric study*. Food Chemistry 2006; 97 (3): p438-446
- [59] Mangas JJ, Rodríguez R, Suárez B, Picinelli A, Dapena E. *Study of the phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques*. J. Agric. Food Chem. 1999; 47 (10): 4046-4052
- [60] Tomás-Lorente F, García-Viguera C, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. *Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuineness*. J. Agric. Food Chem. 1992; 40 (10): p1800-1804
- [61] Hernandez T, Ausín N, Bartolomé B, Bengoechea L, Estrella I, Gómez-Cordovés C. *Variations in the phenolic composition of fruit juices with different treatments*. Z Lebensm Untersuch Forsch. 1997; 204 (2): p151-155
- [62] Kermasha S, Goetghebeur M, Dumont J, Couture R. *Analyses of phenolic and furfural compounds in concentrated and non-concentrated apple juices*. Food Research International. 1995; 28 (3): p245-252
- [63] Guyot S, Marnet N, Sanoner P, Drilleau JF. *Variability of the polyphenolic composition of cider apple (Malus domestica) fruits and juices*. J. Agric. Food Chem. 2003 ; 51 (21): p6240-6247.
- [64] Van Der Sluis AA, Dekker M, De Jager A, Jongen WMF. *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49 (8): p3606–3613
- [65] Sanogo T, Sanoner P, Eude R. *Procédé d'obtention d'un extrait végétal de fruits à pépins, extrait végétal ainsi obtenu et ses utilisations*. France, WO/2007/026101, 2006
- [66] Sudha MI, Baskaran V, Leelavathi K. *Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making*. Food Chem. 207; 104 (2): p686-692
- [67] Spanos GA, Wrolstad RE. *Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review*. J. Agric. Food Chem. 1992; 40 (9): p1478–1487
- [68] Murata M, Tsurutani M, Tomita M, Homma S, Kaneko K. *Relationship between Apple Ripening and Browning: Changes in Polyphenol Content and Polyphenol Oxidase*. J. Agric. Food Chem. 1995; 43 (5): p1115-1121

- [69] I.N.R.A. *Cidre et polyphénols : Les polyphénols natifs des pommes à cidre, présence, devenir & rôle (synthèse)*. Documents de restitution INRA. 2004
- [70] Schilling S, Alber T, Toepfl S, Neidhart S, Knorr D, Schieber A, Carle R. *Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices*. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2007; 8 (1): p127-134
- [71] Borneman Z, Gökmen V, Nijhuis HH. *Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juices using PES/PVP membranes in a single ultrafiltration process*. Sep. and Purif. Technol. 2001; 22-23: p53-61
- [72] Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F. *Monophenolase activity of polyphenol oxidase from verdedoncella apple*. J. Agric. Food Chem. 1995; 43 (11): p2807-2812
- [73] Eissa HA, Fadel HHM, Ibrahim GE, Hassan IM, Elrashid AA. *Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products*. Food Research International. 2006; 39 (8): p855-863
- [74] Will F, Bauchhage K, Dietrich H. *Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: Analytical data of the corresponding juices*. Eur Food Res and Technol. 2000 ; 211 (4): p291-297
- [75] Schilling S, Schmid S, Jäger H, Ludwig M, Dietrich H, Toepfl S, et al. *Comparative study of pulsed electric field and thermal processing of apple juice with particular consideration of juice quality and enzyme deactivation*. J. Agric. Food Chem. 2008; 56 (12): p4545-4554
- [76] Schilling S, Toepfl S, Ludwig M, Dietrich H, Knorr D, Neidhart S, et al. *Comparative study of juice production by pulsed electric field treatment and enzymatic maceration of apple mash*. European Food Research and Technology. 2008; 226 (6): p1389-1398
- [77] Lea AGH, Timberlake CF. *The phenolics of ciders: effect of processing conditions*. J. Agric. Food Chem. 1978; 29: p484-492
- [78] Lea AGH. *Bitterness and astringency: the procyanidins of fermented apple ciders*. In: R.L. Roussel, Editor, Bitterness in food and beverages. Elsevier, Oxford; 1990 p123-143.
- [79] Rodia. *Orelis Kerasep™ Modules Tubulaires à membranes céramique Microfiltration, Ultrafiltration, nanofiltration*. <http://www.rodia-eco-services.com/uk/files/DI PF PG sa micro carbosep kerasep fr.pdf>, consulté le 27/05/2009
- [80] Giovanelli G, Ravasini G. *Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process*. Lebensm. Wiss. Technol. 1993; 26 (1): p1
- [81] Institut Technique de la Vigne et du Vin. *Les fiches pratiques : La polyvinylpolypyrrolidone ou PVPP*. <http://www.itv-midipyrenees.com/publications/fiches-pratiques/PVPP.php>, consulté le 07/10/2008
- [82] Fügel R, Carle R, Schieber A. *A novel approach to quality and authenticity control of fruit products using fractionation and characterisation of cell wall polysaccharides*. Food Chemistry 2004; 87 (1): p141-150
- [83] BASF. *Divergan® RS*. Technical information. 2005
- [84] Waters. *Waters : ACQUITY UPLC Ultra Performance*. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr FR&cid=514207>, consulté le 08/10/2008
- [85] Fruitnet. *Italy to harvest red-fleshed apples*. <http://www.fruitnet.com/content.aspx?ttid=14&cid=3871>, consulté le 25/08/2009

- [86] Boyer J, Liu, RH. *Apple phytochemicals and their health benefits*. Nutrition Journal. 2004; 3 (12): p1-45
- [87] Biedrzycka E, Amarowicz R. *Diet and health: apple polyphenols as antioxidants*. Food Reviews International. 2008; 24 (2): p235-251
- [88] Souci SW, Fachmann W, Kraut H. *La composition des aliments, Tableaux des valeurs nutritives* (5<sup>ème</sup> édition). CRC Press, Ed Medpharm; 1994
- [89] Monge P, Solheim E, Schelin RR. *Dihydrochalcone metabolism in the rat: phloretin*. Xenobiotica. 1984; 14: p917-924
- [90] Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C. *Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats*. J. Nutr. 2001; 131: p3227-3230
- [91] Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C. *Comparison of intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats*. J. Nutr 2001; 131: p2109-2114
- [92] Kahle K, Huemmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T, Richling E. *Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption*. J. Agric. Food Chem. 2007; 55: p10605-10614
- [93] Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Richling E. *Colonic availability of apple polyphenols - A study in ileostomy subjects*. Mol. nutr. Food res. 2005; 49 (3): p1143-1150
- [94] Booth AN, Jones FT, DeEds F. *Metabolic and glucosuria studies on naringin and phloridzin*. J. Biol. Chem. 1958; 233: p280-282
- [95] Jennings MI, Solomon AK. *Interaction between phloretin and the Red Blood Cell Membrane*. J Gen Physiol. 1976; 67 (4): p381-397
- [96] Bitsch R, Netzel M, Carlé E, Strass G, Kesenheimer B, Herbst M, Bitsch I. *Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 2000; 1 (4): p245-249
- [97] Ki Won Lee, Young Jun Kim, Dae-Ok Kim, Hyong Joo Lee, and Chang Yong Lee. *Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (22): p6516-6520
- [98] Lotito, S.B., Frei, B. *Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects*. Free Radical Biology and Medicine. 2004; 36 (2): p201-211
- [99] Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA. *The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink*. Food Chemistry. 1997; 60 (3): p331-337
- [100] Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, Yang R, Charles MT, Vasantha Rupasinghe HP. *Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing*. Journal of Food Composition and Analysis. 2008; 21 (5): p396-401
- [101] Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. *Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple?* J. Agric. Food Chem. 2005; 53 (12): p4989-4995
- [102] Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. *Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition*. J. Agric. Food Chem. 2004; 52 (15): p4684-4689

- [103] Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Savatović S, Mandić A, Tumbas V. *Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace*. Food Chem. 2008; 109 (2): p340-347
- [104] Lu Y, Yeap Foo L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry 2000; 68 (1): p81-85
- [105] Mayer B, Schumacher M, Brandstätter H, Wagner FS, Hermetter A. *High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum*. Anal Biochem. 2001; 297 (2): p144-153
- [106] Rezk BM, Haenen GR, Van Der Vijgh WJ Bast A. *The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids*. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 295(1): p9-13
- [107] Nakamura Y, Watanabe S, Miyake N, Kohno H, Osawa T. *Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51 (11): p3309-3312
- [108] Pearson DA, Tan CH, German JB, Davis PA, Gershwin ME. *Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation*. Life Sci. 1999; 64 (21): p1913-20
- [109] Oresajo C, Stephens T, Hino P, Law R, Yatskayer M, Foltis P, et al. *Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin*. Journal of Cosmetic Dermatology. 2008; 7 (4): p290-297
- [110] Gaudout D, Megard D, Inisan C, Esteve C, Lejard F. *Fraction phénolique riche en phloridzine et son utilisation en tant qu'agent cosmétique, alimentaire ou nutraceutique*. France. FR2822466
- [111] Gaudout D, Megard D, Lejard F. *Use of a dihydrochalcone-rich phenolic fraction in a cosmetic composition*. France, EP1338270, 2002
- [112] Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL. *Les produits de glycation avancée (AGE) : de nouvelles toxines ?* Néphrologie. 2002; 23 (7): p349-357
- [113] Wautier JL, Guillausseau PJ. *Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy*. Diabetes & Metabolism. 2001; 27 (5): p535-542
- [114] Marcoux E. *Diabète: le rôle du méthylglyoxal mis à jour. Rencontre avec Pierre Potier*. L'actualité chimique. 2005; 290-291: p10-12
- [115] Shao X, Bai N, He K, Ho CT, Yang CS, Sang S. *Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species*. Chem Res Toxicol. 2008; 21(10): p2042-2050
- [116] Grossman LD. *L'inhibition du transport du sodium et du glucose rénaux dans le traitement du diabète de type 2*. Endocrinologie - Conférences scientifiques. 2009; 9 (1): p1-6
- [117] Bishop JHV, Elegbe R, Green R, Thomas S. *Effects of phlorizine on glucose, water and sodium handling by rat kidney*. J. Physiol. 1978; 275: p467-480
- [118] Young JW, Schmidt SP, Akowuah ES, Hess GS, McGilliard AD. *Effects of phlorizine on glucose kinetics in the bovine*. J. Dairy Sci. 1974; 57 (6): p689-694
- [119] Chasis H, Jolliffe N, Smith HW. *The action of phlorizin on the excretion of glucose, xylose, sucrose, creatinine and urea by human*. J Clin Invest. 1933; 12 (6): p1083-1090
- [120] Ehrenkranz JRL, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. *Phlorizin: a review*. Diabetes Metab Res Rev. 2005; 21 (1): p31-38

- [121] Glossmann H, Neville DM. *Phloridzin receptors in isolated kidney brush border membranes*. J. Biol. Chem. 1972 ; 247 (23) : p7779-7789
- [122] Idris I, Donnelly R. *Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: An emerging new class of oral antidiabetic drug*. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2009; 11 (2): p79-88
- [123] Lee YJ, Lee YJ, Han HJ. *Regulatory mechanisms of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells*. Kidney International. 2007; 72: pS27–S35
- [124] Wright EM, Hirsch JR, Loo DDF, Zampighi. *Regulatory mechanisms of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters*. J Exp Biol. 1997; 200: p287-293
- [125] Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. *Human cardiomyocytes express high level of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 (SGLT1)*. J Cell Biochem. 2003; 90 (2): p339-346
- [126] Geerlings SE, Stolk RP, Camps MJ, Netten PM, Collet TJ. *Risk factors for symptomatic urinary tract infection in women with diabetes*. Diabetes Care. 2000; 23 (12): p1737-1741
- [127] Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, *et al*. *Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes*. Diabetes 2004; 53: p2901-2909
- [128] Starke A, Grundy S, McGarry JD, Unger RH. *Correction of hyperglycemia with phloridzin restores the glucagon response to glucose in insulin-deficient dogs : implications for human diabetes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: p1544-1546
- [129] Kim YW, Kim JY, Lee SK. *Effects of phlorizin and acipimox on insulin resistance in STZ-diabetic rats*. J. Korean Med. Sci. 1995; 10 (1): p24-30
- [130] Takii H, Matsumoto K, Kometani T, Okada S, Fushiki T. *Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice*. Biosci. Biotech. Biochem. 1997; 61 (9): p1531-1535
- [131] Masumoto S, Akimoto Y, Oike H, Kobori M. *Dietary Phloridzin Reduces Blood Glucose Levels and Reverses Sglt1 Expression in the Small Intestine in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice*. J. Agric. Food Chem. 2009; 57 (11): p4651–4656
- [132] Keller DM, Lotspreich WD. *Effect of phlorizine on the osmotic behavior of mitochondria in isotonic sucrose*. J Biol Chem. 1959; 234: p991-994
- [133] Kellett GL, Helliwell PA. *The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane*. Biochem J. 2000; 350 (1): p155–162
- [134] Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. *Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids*. FASEB J. 2007; 21 (2): p366-77
- [135] Le Gall M, Tobin V, Dalet V, Stolarczyk E, Brot-Laroche E, Leturque A. *GLUT2 : Transporteur-détecteur des sucres dans l'intestin*. Gastroentérologie Clinique et Biologique. 2006; 30 (1): p86
- [136] Communications personnelles, Stephan Barth
- [137] Gerhauser C. *Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components*. Planta Medica. 2008; 74 (13): p1608-1624

- [138] Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog.* 2005; 45 (3): p164-174
- [139] Cao X, Fang L, Gibbs S, Huang Y, Dai Z, Wen P, *et al.* Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 59 (4): p495-505
- [140] Yang KC, Tsai CY, Wang YJ, Wei PL, Lee CH, Chen JH, *et al.* Apple Polyphenol Phloretin Potentiates the Anticancer Actions of Paclitaxel Through Induction of Apoptosis in Human Hep G2 Cells. *Mol Carcinog.* 2009; 48 (5): p420-431
- [141] Wu CH, Ho YS, Tsai CY, Wang YJ, Tseng H, Wei PL, *et al.* In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *International Journal of Cancer.* 2009; 124 (9): p2210-2219
- [142] Park SY, Kim EJ, Shin HK, Kwon DY, Kim MS, Surh YJ, Park JH. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin. *J Med Food.* 2007; 10 (4): p581-586
- [143] Hoa N, Myers MP, Douglass TG, Zhang JG, Delgado C, Driggers L, *et al.* Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PLoS One.* 2009; 4 (2): e4631
- [144] Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T, Shinohara K. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. *Cancer Lett.* 1997; 119 (2): p207-212
- [145] Kobori M, Iwashita K, Shinmoto H, Tsushida T. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63 (4): p719-725
- [146] Kim MS, Kwon JY, Kang NJ, Lee KW, Joo Lee HJ. Phloretin Induces Apoptosis in H-Ras MCF10A Human Breast Tumor Cells through the Activation of p53 via JNK and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171: p479-483
- [147] Olson ML, Kargacin ME, Honeyman TW, Ward CA, Kargacin GJ. Effects of phytoestrogens on sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a and Ca<sup>2+</sup> uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 2006; 316 (2): p628-635
- [148] Olson MI, Kargacin ME, Ward CA, Kargacin GJ. Effects of phloretin and phloridzin on Ca<sup>2+</sup> handling, the action potential, and ion currents in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321 (3): p921-929
- [149] Strichartz GR, Oxford GS, Ramon F. Effects of the dipolar form of phloretin on potassium conductance in squid giant axons. *Biophys J.* 1980; 31 (2): p229-246
- [150] Cseh R, Benz R. Interaction of Phloretin with Lipid Monolayers: Relationship between Structural Changes and Dipole Potential Change. *Biophysical Journal.* 1999; 77: p1477-1488
- [151] Melnik E, Latorre R, Hall JE, Tosteson FC. Phloretin-induced changes in ion transport across lipid bilayer membranes. *J Gen Physiol.* 1977; 69 (2): p243-257
- [152] Cseh R, Benz R. The Adsorption of Phloretin to Lipid Monolayers and Bilayers Cannot Be Explained by Langmuir Adsorption Isotherms Alone. *Biophysical Journal.* 1998 74: p1399-1408

- [153] Bechinger B, Seelig J. *Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A deuterium and phosphorus-31 NMR study of phloretin and phloretin analogs in phosphatidylcholine membranes.* Biochemistry. 1991; 30 (16): p3923-3929
- [154] Andersen OS, Finkelstein A, Katz I, Cass A. *Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes.* Gen Physiol. 1976; 67 (6): p749-771
- [155] Betz AL, Drewes LR, Gilboe DD. *Inhibition of glucose transport into brain by phlorizin, phloretin, and glucoses analogues.* Biochem Biophys Acta. 1975; 406: p505-515
- [156] Boccia MM, Kopf SR, Baratti CM. *Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice.* Neurobiol Learn Mem. 1999; 71 (1): p104-12
- [157] Hall JL, Reilly RT, Cottrill KL, Stone WS, Gold PE. *Phlorizin enhancement of memory in rats and mice.* Pharmacol Biochem Behav. 1992; 41 (2): p295-299
- [158] Suzuki S, Noda M, Sugita M, Tsubochi H, Fujimura S. *Difference in the effect of phloridzin on alveolar fluid absorption in anesthetized rats and in ex vivo rat lungs.* Exp Lung Res. 1999; 25 (5): p393-406
- [159] Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Cabantchik ZI. *On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of Plasmodium falciparum.* Biochem Pharmacol. 1987; 36 (1): p123-129
- [160] Skinceutical - PREVENIR - Phloretin CF. [http://www.skinceuticals.fr/site/phloretin\\_cf\\_186.html](http://www.skinceuticals.fr/site/phloretin_cf_186.html), consulté le 08/09/09

# FICHE SIGNALÉTIQUE

GILLARD Sébastien

Né le 03 février 1985 à Strasbourg

## LES DIHYDROCHALCONES DE LA POMME : EXTRACTION, SÉPARATION ET INTÉRÊT MÉDICAL

Soutenu le 31 octobre 2009 à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (67)

N° d'ordre : \_\_\_\_\_

### Résumé :

Les dihydrochalcones sont des polyphénols méconnus, appartenant à la classe des flavonoïdes, et présents dans la pomme et dans tous ses produits dérivés. Bien qu'ils soient minoritaires (présents en faibles concentrations), ils peuvent représenter une part non négligeable des composés phénoliques dans le jus par exemple. Leurs principaux représentants sont la phlorétine et son glycoside la phlorizine mais la présente étude a permis de mettre en évidence la présence de dihydrochalcones non encore identifiés.

Par ailleurs, il a été démontré que la séparation et la concentration des dihydrochalcones à grande échelle était possible de manière aisée en utilisant des colonnes de phase inverse et des gradients eau/méthanol adaptés. De plus l'utilisation de colonnes de PVPP permettrait de les extraire du jus facilement et avec un coût relativement peu élevé.

La phlorizine est devenue le chef de file d'une nouvelle classe de médicaments antidiabétiques qui inhibe la recapture du glucose dans le rein et permet ainsi de diminuer fortement la glycémie. De nombreux groupes pharmaceutiques se sont lancés dans la course afin de proposer des traitements dans les années à venir.

**Mots-clés** : dihydrochalcone, polyphénol, pomme, weirouge, phlorétine, phlorizine, hydroxyphlorétine, hydroxyphlorizine, diabète

**Directeur de thèse** : M. le Professeur Éric MARCHIONI