

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

**UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI –OUZOU**  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



## **Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

## **Thème**

**Evaluation des activités biologiques des extraits du  
fruit du Cognassier**

Réalisé par : M<sup>elle</sup> MEHRAZ Rebiha

Soutenu le : 10/ 10/ 2017

Devant le jury composé de :

Président : Mr OUELHADJ A.

Maître de Conférences (A) à l'UMMTO

Examinatrice : Mme AIT AIDER F.

Maître de Conférences (B) à l'UMMTO

Promotrice : Mme BENAHMED DJILALI A.

Maître de Conférences (A) à l'UMMTO

**Promotion : 2016 / 2017**

## *Remerciements*

---

Ce sujet a été proposé par ma promotrice Mme BENAHMED DJILALI Adiba, Je lui exprime mes plus vifs remerciements ainsi que ma profonde gratitude pour avoir orienté, dirigé ce travail et également pour sa compréhension, sa disponibilité et tous ses conseils dans l'élaboration et la conception de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également à Mr OULEHADJ A. qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie de même Mme AIT AIDIR F. qui a accepté d'examiner ce travail, c'est un honneur pour moi de la voir siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur BENZARA A. Professeur à l'Ecole National Supérieur d'Agronomie d'Alger (ENSA), pour son aide précieuse apportée sur le calcul de la DL50 pour l'effet bioinsecticide.

J'adresse un grand merci à Monsieur OUKACHA B. enseignant à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son aide apportée sur l'analyse statistique.

Je remercie vivement tous les ingénieurs des laboratoires ; Microbiologie, LABAB, Physicochimie commun I et II, Entomologie pour leurs conseils et leurs compréhension.

Mes remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Qu'il me soit permis de remercier et d'exprimer ma reconnaissance à ma famille d'être si patiente et qui a supporté mon indisponibilité tout au long de mon cursus.

Je ne peux conclure sans exprimer ma sympathie à toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de ma très chère grand-mère.

Mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

Mes chères sœurs, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

Mon cher frère, pour son appui et son encouragement.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Mohand qui m'a été d'une grande aide et à toute sa famille.

Tous mes amis (es) particulièrement Samira, Hakima et Zineb.

Dalila et toute sa famille

Toutes les personnes m'ayant aidé de près ou de loin.

## *Liste des abréviations*

---

Da : Dalton.

DL50 : Dose létale 50.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

EAG : Equivalent d'Acide Gallique.

IC50 : Concentration inhibitrice 50.

IR : Infra-rouge.

KDa : Kilo-Dalton.

pH : Potentiel Hydrogène.

PM : Poids moléculaire.

PPT : Polyphénols totaux.

TCs : Tanins condensés.

THs : Tanins hydrolysables.

## Liste des tableaux

---

Tableau	Titre	Page
I	Certaines valeurs nutritionnelles de coing.	6
II	Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.	19
III	Evaluation de l'activité antimicrobienne selon le diamètre d'inhibition.	33
IV	Résultats de certains paramètres physico-chimiques de coing.	36
V	Résultats d'analyse phytochimique de coing étudié.	37
VI	Résultats du dosage des composés phénoliques de coing.	37
VII	Rendements d'extraction des tanins de coing selon la méthode d'extraction.	38
VIII	Moyenne des morts de <i>Tribolium confusum</i> ( $\pm$ écart-type) en fonction des facteurs dose et temps.	41
IX	Taux moyen de mortalité (%) de <i>Tribolium confusum</i> en fonction des facteurs dose et temps.	42
X	Moyennes de mortalité, les mortalités corrigées de <i>Tribolium confusum</i> et les probits en fonction des logarithmes décimaux des doses.	43
XI	Temps d'exposition, taux moyen de mortalité, coefficient de corrélation et la variance en fonction de la dose.	47

## Liste des figures

---

Figure	Titre	Page
1	<i>Cydonia oblonga</i> variété <i>maliformis</i> étudiée	3
2	Structure générale de tanins condensés	10
3	Structure générale de tanins hydrolysables	11
4	Exemple de phlorotanins (Trifupalol A)	11
5	Structure de l'acutissimine A	12
6	<i>Cydonia oblonga</i> variété <i>maliformis</i>	19
7	Etapas de préparation de l'infusé.	25
8	Diagramme de dosage des polyphénols totaux	28
9	Diagramme de dosage des flavonoïdes	28
10	Diagramme de dosage des tanins	29
11	Etapas d'extraction des tanins avec les sels à chaud	30
12	Etapas d'extraction des tanins par solvants.	31
13	Espèce adulte de <i>Tribolium confusum</i> et son élevage en masse	34
14	Dispositif expérimental du test par inhalation	34
15	Résultat de l'infra-rouge des deux extraits des tanins	39
16	Résultats de l'activité antimicrobienne d'extraits des tanins.	40
17	Taux de mortalité de <i>Tribolium confusum</i> en fonction des facteurs dose et temps.	43
18	Droite de régression des mortalités corrigées de <i>Tribolium confusum</i> en fonction des logarithmes décimaux des doses.	44
19	Taux de mortalité de <i>T. confusum</i> en fonction du temps à la dose 50µl.	45
20	Taux de mortalité de <i>T. confusum</i> en fonction du temps à la dose 100µl.	45
21	Taux de mortalité de <i>T. confusum</i> en fonction du temps à la dose 200µl.	46
22	Taux de mortalité de <i>T. confusum</i> en fonction du temps pour les trois doses (50µl, 100µl, 200µl).	46

La présente étude se focalise sur l'étude des effets antimicrobiens et bioinsecticide des extraits de tanins de *Cydonia oblonga*. La première partie a porté sur les analyses de caractérisation de fruit à savoir les analyses physico-chimiques, le screening phytochimique et le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, tanins et flavonoïdes). Dans la seconde partie, deux extraits du fruit à l'état frais de *Cydonia oblonga* ont été préparés en utilisant l'eau et le méthanol comme solvants d'extraction.

Finally, l'évaluation de l'effet antimicrobien de ces extraits vis-à-vis des souches pathogènes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* a été réalisée suivie par l'étude de l'effet bioinsecticide de l'extrait issu de l'extraction par les sels à chaud vis-à-vis d'un insecte ravageur des denrées stockées *Tribolium confusum*.

Les résultats obtenus montrent que, la variété étudiée (*Cydonia oblonga maliformis*) est riche en composés phénoliques. Par ailleurs, les deux extraits de tanins obtenus de la même variété ne révèlent aucun d'effet antimicrobien vis-à-vis des souches pathogènes considérées. Par contre, l'extrait par les sels à chaud montre un effet bioinsecticide par inhalation vis-à-vis d'individus adultes de *Tribolium confusum* à des différentes doses (50µl, 100µl, 200µl).

**Mots clés :** *Cydonia oblonga*, tanins, effet antimicrobien, effet bioinsecticide.

This study focuses on the study of the antimicrobial and bioinsecticidal effects of tanins extract from *Cydonia Oblonga*. The first part focused on fruit characterization analyzes, namely physico-chemical analysis, phytochemical screening and the determination of phenolic compounds (total polyphenols, tanins and flavonoids). In the second part, two extracts of the fresh fruit of *Cydonia oblonga* were prepared using saline solution and methanol as solvent of extraction.

Finally, the antimicrobial effect of these extracts on the pathogenic strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* was carried out followed by the study of the bioinsecticidal effect of the aqueous extract against an insect pest of stored commodities *Tribolium confusum*.

The results obtained show that the variety studied (*Cydonia oblonga maliformis*) is rich in phenolic compounds. Moreover, the two extracts of tanins obtained from the same variety reveal no antimicrobial effect with regard to the pathogenic strains considered.

Tanins extracted by saline method showed very interesting insecticide effect on *Tribolium confusum* at the doses (50µl, 100µl, 200µl).

**Keywords :** *Cydonia oblonga*, tanins, antimicrobial effect, bioinsecticidal effect.

### Introduction

I. Généralités sur le coing .....	2
I. 1 Cognassier .....	2
I. 1. 2 Coing .....	2
I. 2 Classification.....	2
I. 3 Principales variétés de coing.....	2
I. 4 Distribution et production .....	3
I. 5 Effets du coing sur la santé .....	3
I. 6 Polyphénols de coing .....	4
I. 7 D'autres caractéristiques de composition .....	5
I. 8 Maladies et ravageurs .....	6
I. 8. 1 Principales maladies.....	6
I. 8. 2 Principaux ravageurs.....	7
II. Généralités sur les tanins .....	8
II. 1. Définition.....	8
II. 2 Structure et classification.....	8
II. 2. 1 Tanins condensées .....	9
II. 2. 2 Tanins hydrolysables .....	10
II.2. 3 Phlorotanins .....	11
II. 2. 4 Tanins complexes .....	12
II. 3 Localisation et distribution chez les végétaux .....	12
II. 4 Facteurs de variation de la teneur en tanins.....	13
II. 4. 1 Espèce et la variété .....	16
II. 4.2 Partie et stade végétal (e).....	13
II. 4. 3 Conditions environnementales .....	14
II. 5 Rôle des tanins chez les végétaux.....	14
II. 6 Propriétés des tanins .....	15
II. 6. 1 Propriétés physico-chimiques.....	15
II. 6. 1. 1 Solubilité.....	15
II. 6. 1. 2 Liaison aux protéines.....	15
II. 6. 1. 3 Liaison aux acides nucléiques .....	16
II. 6. 1. 4 Chélation d'ions métalliques .....	16

II. 6. 1. 5 Interaction avec d'autres macromolécules.....	16
II. 6. 2 Propriétés biologiques .....	16
II. 6. 2. 1 Inhibition des enzymes .....	16
II. 6. 2. 2 Activité anti-oxydante .....	17
II. 6. 2. 3 Effet anticancéreux .....	17
II. 6. 2. 4 Effet antiseptique .....	17
III. Matériels et méthodes .....	18
III. 1 Cadre de l'étude.....	18
III. 2 Matériels et méthodes.....	18
III. 2. 1 Matériels.....	18
III. 2. 1. 1 Equipements et réactifs chimiques .....	18
III. 2. 1. 2 Milieux de culture utilisés .....	18
III. 2. 1. 3 Matériel végétal .....	18
III. 2. 1. 4 Matériel biologique .....	19
III. 2. 2 Méthodes d'analyses .....	20
III. 2. 2. 1 Analyses physico-chimiques .....	20
Détermination de la teneur en eau .....	20
Détermination de la teneur en cendres .....	21
Détermination de pH .....	22
Détermination de l'acidité titrable.....	22
Dosage des sucres.....	23
III. 2. 2. 2 Analyse phytochimique (screening).....	24
III. 2. 2. 3 Analyse quantitative des composés phénoliques.....	27
Extraction .....	27
Dosage .....	27
Dosage des flavonoïdes .....	28
Dosage des tanins .....	29
III. 2. 2. 4 Extraction des tanins .....	29
Extraction par des sels à chaud .....	30
Extraction par des solvants.....	30
Rendement d'extraction .....	31
III. 2. 2. 5 Détermination des groupements fonctionnels par Infra-Rouge .....	32
III. 2. 2. 6 Activité antimicrobienne des extraits de tanins.....	32

Préparation des milieux de culture .....	32
Préparation des cultures microbiennes .....	32
Préparation des solutions à tester .....	32
Antibiogramme.....	32
III. 2. 2. 7 Evaluation de l'effet bioinsecticide de l'extrait de tanins .....	33
Elevage en pratique de <i>Tribolium confusum</i> .....	33
Test par inhalation .....	34
Calcul de la DL50 .....	35
Analyse statistique des résultats .....	35
IV. Résultats et discussion .....	36
IV. 1 Résultats d'analyses physico-chimiques de coing .....	36
IV. 2 Résultats d'analyse phytochimique.....	37
IV. 3 Résultats du dosage des composés phénoliques .....	37
IV. 4 Résultats des rendements d'extraction des tanins .....	38
IV. 5 Résultats de l'infra-rouge.....	38
IV. 6 Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des tanins .....	40
IV. 7 Résultats de l'effet bioinsecticide des tanins de coing sur <i>Tribolium confusum</i> ....	41
IV. 7. 1 Test d'inhalation .....	41
IV. 7. 2 Résultats de la DL50 .....	43
IV. 7. 3 Résultats de l'analyse statistique .....	44
Conclusion.....	48
Références bibliographiques	
Annexes	

L'importance des fruits et des légumes dans la réduction des risques des maladies cardiovasculaires, de vieillissement, et de cancer est bien connue (FATTOUCH et *al*, 2007). Leurs bienfaits pour la santé sont attribués au fort potentiel antioxydant des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans les plantes (SILVA et *al*, 2004).

*Cydonia oblonga*, une plante de la famille des Rosaceae (TORKELSON, 1995 ; MARWAT et *al*, 2009 ; KHOUBNASABJAFARI et JOUYBAN, 2011) est appréciée pour ses usages médicaux, alimentaires, et ornementaux. Le fruit de ladite plante est employé dans l'industrie alimentaire (USMANGHANI et *al*, 1997) comme source de pectines qui lutte contre le syndrome du côlon héritable et l'ulcère peptique (HAMAUZU et *al*, 2008 ; MINAIYAN et *al*, 2012).

En outre, il est riche en vitamine C et différents minéraux tels que le phosphore, le calcium, le potassium, le sodium, et l'azote (ROP et *al*, 2011). Les graines de ce fruit sont traditionnellement utilisées pour le traitement de la diarrhée, de la toux, de la dysenterie, de la constipation, et de la bronchite (NADKARNI, 1976 ; DUKE et *al*, 2002 ; PRAJAPATI et *al*, 2006). Ce fruit est également considéré comme une source économique et naturelle des huiles essentielles, d'acides organiques et de constituants phénoliques (LUTZ-RODER et *al*, 2002 ; SILVA et *al*, 2004 ; OLIVEIRA et *al*, 2007 ; OSMAN et *al*, 2010 ; ERDOGAN et *al*, 2012).

Les tanins des plantes ont montré de potentiels effets antibactériens, antiviraux, et antiparasitaires (DOSS et *al*, 2009). Ces substances montrent une activité antibactérienne contre certains microorganismes tels que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et de *Staphylococcus epidermidis*, en précipitant les protéines microbiennes (SPENCER et *al*, 1988 ; COWAN, 1999 ; SAJID et *al*, 2015 ; SHOBOWALE et *al*, 2013). Une bonne source naturelle et peu coûteuse des polyphénols est le cognassier *Cydonia Oblonga* (COSTA et *al*, 2009 ; OLIVEIRA et *al*, 2012 ; SIQUEIRA et *al*, 2012).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but principal est la confirmation de l'activité antimicrobienne de l'extrait tanique de coing vis-à-vis de trois souches commensales de l'homme ; deux souches bactériennes, une à Gram positif (*Staphylococcus aureus*), une autre à Gram négatif (*Escherichia coli*) et une souche fongique (*Candida albicans*), et l'étude de son effet insecticide vis-à-vis d'un insecte ravageur des denrées alimentaires *Tribolium confusum*.

### I.1. Cognassier

Le cognassier (*Cydonia oblonga*) appartient à la famille des Rosacées unique représentant de son genre *Cydonia* (YUKSEL et al, 2013). C'est un arbre de petite taille (5 à 8 m de haut et 4 à 6 m de large) à feuilles caduques (ORHAN, 2014). Il est originaire du Moyen-Orient (ORHAN, 2014).

Le cognassier fleurit au printemps avec des fleurs blanc-rosé, d'un diamètre de 5 centimètres (GHOLGHOLAB, 1961).

#### I.1.2. Coing

Le coing est le fruit du cognassier (*Cydonia vulgaris* ou *Cydonia oblonga*). C'est un fruit complexe à pépins dérivant d'un ovaire infère (piridion) (AUDREY, 2014).

### I.2. Classification

La classification de coing est donnée comme suit :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Genre : *Cydonia*

Espèce: *C. oblonga* (<http://www.wikipédia.com>).

### I.3. Principales variétés de coing

Par sa forme, le coing ressemble aux pommes et aux poires, de couleur jaune vif à maturité (ORHAN, 2014), d'où la distinction de deux variétés (YUKSEL, 2013) :

- *Cydonia oblonga* var. *maliformis*, fruit en forme de pomme ;
- *Cydonia oblonga* var. *pyriformis*, fruit en forme de poire.

Les fruits de la variété *maliformis* (Figure 1), ont une chair plus dure avec un goût plus astringent par rapport à la variété *pyriformis*.



**Figure 1 :** *Cydonia oblonga* variété *maliformis* étudiée commercialisée dans la région de Tizi-Ouzou

#### **I.4. Distribution et production**

Le coing est indigène en Iran et en Turquie, cultivé en Inde, Afrique de Sud, Moyen-est, et en Europe (YILDIRIM *et al*, 2001; EVANS *et al*, 2002).

C'est en Turquie que la production de coing est la plus importante (22 % de la production mondiale), suivie par la Chine, l'Ouzbékistan, le Maroc, l'Iran, l'Argentine et l'Azerbaïdjan (ORHAN, 2014).

#### **I.5. Effets du coing sur la santé**

Bien que le coing soit une source de vitamine C antioxydante, la majorité de cette dernière est détruite après la cuisson par la chaleur. Ce fruit est riche en pectines substances ayant la propriété de former des gels en emprisonnant l'eau. Ces substances auraient de nombreux bienfaits sur la santé notamment sur la diminution des niveaux de cholestérol sanguin ainsi que de la glycémie (BROUNS *et al*, 2012). Les pectines sont connues par leur capacité de retarder la vidange gastrique et ainsi favoriser la satiété. En outre, leur capacité de former une barrière physique protégeant les cellules intestinales contre les infections microbiennes (WIKIERA *et al*, 2014).

Plusieurs études ont démontré l'effet positif de la consommation de ce fruit sur la prévention du cancer du côlon et des reins (CARVALHO *et al*, 2010).

Naturellement, le coing est peu sucré et très astringent, il est assez peu calorique, riche en polyphénols et en fibres (plus de 6g/100g) insolubles et solubles (pectines), il est connu pour son action antidiarrhéique, protectrice de la muqueuse intestinale et antiseptique.

Le coing est une source de composés phénoliques possédant une activité antibactérienne, antioxydante, et anti-ulcérateur (SILVA *et al.*, 2004 ; WANG *et al.*, 2006 ; FATTOUCH *et al.*, 2007; HAMAUZU *et al.*, 2008 ; MAGALHAES *et al.*, 2009).

L'extrait des feuilles de coing a été démontré efficace contre le diabète, le cancer et l'hémolyse (COSTA *et al.*, 2009 ; ASLAN *et al.*, 2010 ; CARVALHO *et al.*, 2010 ; JOUYBAN *et al.*, 2011).

Le fruit contient également une enzyme, la phénol-peroxydase qui décolore les colorants aromatiques cancérigènes en eaux résiduaires industrielles (NANDI *et al.*, 2009; ARABACI *et al.*, 2014).

Les polysaccharides du coing ont un effet inhibiteur de l'activité de la tyrosine phosphatase (IC50 = 2.07 µg/ml) indiquant leur possibilité à traiter le diabète de type 2 et l'obésité (YILDIRIM *et al.*, 2001).

Les feuilles du cognassier ont diverses applications médicinales telles que l'effet protecteur sur la spermatogenèse dans l'hypercholestérolémie (ASHRAFI *et al.*, 2013), antifongique (HAMIDI *et al.*, 2013), potentiel renoprotectif (JOUYBAN *et al.*, 2011), anti-athérogénique et potentiel hépatoprotectif (KHADEMI *et al.*, 2013), effet antiprolifératif contre le cancer des cellules (CARVALHO *et al.*, 2010), et potentiel antioxydant (COSTA *et al.*, 2009) dû à la présence des molécules bioactives.

### **I.6. Polyphénols de coing**

Le coing est considéré comme une source économique et naturelle de composés phénoliques (SILVA *et al.*, 2004 ; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Selon FATTOUCH *et al.* (2006), les principaux polyphénols présents dans la cuticule et la pulpe du coing sont les acides hydroxycinnamiques, principalement l'acide chlorogénique, et les flavonoïdes. Dans l'extrait de pulpe, les acides chlorogéniques représentent 61% des composés phénoliques, et l'acide 5-Ocaffeyloquinique est le plus abondant (37%), tandis que dans l'extrait de cuticule l'acide chlorogénique représente seulement 13%, avec la rutine comme polyphénol principal (36%). Les flavonols sont présents comme mélange d'aglycones différentes et de quercétine glycosylée et kaempférol. Les flavanols sont essentiellement catéchines et procyanidines. Les flavonols sont presque limités dans la pulpe. Cependant, le profil phénolique du coing peut être influencé par divers facteurs et l'absence de quelques composés peut être acceptée comme possible (FATTOUCH *et al.*, 2006).

WOJDYLO, (2013) a analysé 13 différentes variétés de coing et 5 géotypes différents pour leur contenu en composés phénoliques. Notamment, un total de 26 composés

phénoliques a été identifié dans les 15 variétés, à savoir : 9 épicatechines flavan-3-ols, procyanidine B2, des dimères, trimères et un tétramère de procyanidine, 8 hydroxycinnamates, des dérivés d'acides cafféoylquiniques et coumaroylquiniques, du 9 kaempférol et des dérivés de quercétine. La concentration en polyphénols varie entre 1709,43 mg pour 100 g de poids sec (génotype S1) et 3436,56 mg pour 100 g de poids sec (génotype Leskovac). Les flavan-3-ols sont les polyphénols majoritairement présents dans le coing, à des teneurs élevées variant de 78 à 94 % des composés phénoliques totaux.

### **I.7. D'autres caractéristiques de composition**

Les huiles essentielles, les composés phénoliques, les acides organiques sont présents dans les différentes parties de coing (LUTZ-RODER et *al*, 2002 ; OLIVEIRA et *al*, 2007, 2008 ; OSMAN et *al*, 2010 ; ERDOGAN et *al*, 2012).

Les graines de coing contiennent comme composés phytochimiques actifs, des stérols, des triterpènes, et des tanins qui leur confère leur activité antidiarrhéique (KIRIMER et *al*, 1997 ; AMMAR et *al*, 2009 ; BUDRIESI et *al*, 2010). La présence de différents composés phénoliques, d'acides organiques, et d'acides aminés dans ces graines a été également décrite par SILVA et *al* (2005).

Une analyse des acides organiques présents dans le coing a mis en évidence la présence de 6 principales molécules, à savoir l'acide citrique, ascorbique, malique, quinique et fumarique dans le fruit (SILVA, 2002b).

Il s'agit d'un fruit assez peu chargé en sucres : le coing en renferme en moyenne 6 à 7 g aux 100 g (c'est-à-dire moins que la majorité des fruits, dans lesquels cette teneur atteint plutôt 9 à 12 g). Il s'agit pour l'essentiel de sucres réducteurs (glucose et fructose), avec seulement quelques traces d'amidon.

Les acides aminés majoritairement présents dans le coing sont l'acide aspartique, l'asparagine et la glycine ou l'hydroxyproline (SILVA, 2004b), malgré une faible teneur en protéines (0,48 g pour 100 de fruit), selon la Table de composition nutritionnelle des aliments (CIQUAL, 2016).

Selon ROP et *al* (2011) et SHARMA et *al* (2011), le coing contient l'acide malique ( $1.2 \pm 0.8\%$ ), les sucres réducteurs ( $5.0 \pm 1.0\%$ ), les tanins ( $0.8 \pm 0.02\%$ ), la vitamine C ( $16.8 \pm 0.8$  mg/100 g), la pectine ( $1.8 \pm 0.1\%$ ), et les minéraux comme le potassium ( $248 \pm 0.02$  mg/100 g), le sodium ( $8.0 \pm 0.03$  mg/100 g), le calcium ( $\pm 18.0$  0.02 mg/100 g) et le phosphore ( $26.0 \pm 0.04$  mg/100 g).

Le tableau suivant montre les quantités moyennes, minimales et maximales de certains composants nutritionnels de coing, selon la table de composition nutritionnelle des aliments (CIQUAL, 2016).

**Tableau I :** Certaines valeurs nutritionnelles de coing.

Composants	Quantité moyenne (g/100gMF)	Quantités min-max (g/100gMF)
Eau	83,5	83 - 83,8
Protéines	0,48	0,4 - 0,63
Lipides	0,1	-
Acides gras saturés	0,0085	0,007 - 0,01
Glucides	13,4	-
Sucres	6,3	-
Fibres	1,9	-
Acides organiques	0,46	-
Cendres	0,4	-

Parallèlement à cela, le coing renferme de nombreuses vitamines. Celles-ci sont bien diversifiées. Le taux de vitamine C des végétaux frais, est de  $16,8 \pm 0,8$  mg (ROP et al, 2011). Ce fruit se caractérise par une valeur plus proche à celle de la cerise (8,5mg/100g), et nettement au-dessus de celle de la pêche, de la poire ou de la pomme respectivement (6,6 mg/100g ; 4,62mg/100g ; 6,25mg/100g) (CIQUAL, 2016).

Des vitamines de groupe B sont également présentes, à des taux dans l'ensemble assez proches de ceux des autres fruits frais (0,02 mg aux 100 g pour la vitamine B1, 0,03 mg pour la vitamine B2, 0,2 mg pour la vitamine B3, 0,04 mg pour la vitamine B6 et 3  $\mu$ g pour la vitamine B9) Enfin, il faut noter la présence, en petite quantité, de la vitamine E (0,55 mg aux 100 g).

**I.8. Maladies et ravageurs**

Entomosporiose : maladie fongique. C'est aux feuilles que s'attaque le champignon à l'origine de cette maladie (*Fabraea maculata*), laissant ainsi apparaître des taches brunes après la floraison, avant de se répandre sur l'arbre entier si rien n'est fait. La photosynthèse ainsi perturbée, les fruits grossissent peu et ne parviennent souvent pas à maturité.

Moniliose : causée par un champignon (*Monilia fructigena*). Apparaît subitement, généralement juste avant la récolte, la moniliose se manifeste par des cercles de pustules beiges sur les fruits, dont la peau et la chair sont rapidement contaminées, prenant une couleur marron.

Carpocapse (*Cydia pomonella*) : lépidoptère dont la larve se développe dans le fruit.

Tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) : lépidoptère qui s'attaque aux fruits.

### **II.1. Définition**

A l'origine le mot tanins (ou tannins) faisait référence à des molécules biochimiques apte à transformer la peau en cuir (WHITE, 1957). Une définition plus précise a été proposée par BATE-SMITH et SWAIN en 1962 : «métabolites secondaires, des composés phénoliques hydrosolubles, d'origine végétale, ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Dalton (Da) qui présentent, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines» (PARIS et HURABIELLE, 1981 ; MANGAN *et al*, 1988 ; ZHU *et al*, 1997 ; AGANGA et MOSASE, 2001 ; PERONNY, 2005 ; KAMRA *et al*, 2006 ; STEVANOVIC et PERRIN, 2009).

Même si valable, cette définition a été complétée grâce aux méthodes d'analyses récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, ils sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20000 Da et sont responsables de l'astringence de certains aliments (HASLAM, 1998 ; HAGERMAN, 2002). Leur facilité de combinaison aux protéines (MANGAN, 1988 ; MCSWEENEY *et al*, 2001 ; MAKKAR, 2003) ainsi qu'à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes , pour former avec eux des complexes stables (HASLAM, 1998) est due à leurs groupements hydroxyles phénoliques (KHENAKA, 2011).

### **II.2. Structure et classification**

Une étape importante de la recherche sur les tanins est franchie en 1920 lorsque FREUDENBERG les répartit, selon un critère de structure, en deux classes, condensés et hydrolysables (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; BRUNETON, 1999 ; GHESTEM *et al*, 2001 ; HAGERMAN, 2002). Certains auteurs définissent deux classes supplémentaires des tanins, les phlorotanins (MCINNES *et al*, 1984) et les tanins complexes (WILFRED et RALPH, 2006).

### **II.2.1. Tanins condensés**

Les tanins condensés (TCs) encore nommés tanins catéchiques ou proanthocyanidines sont des polyphénols de structure voisine de celle des flavonoïdes (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; BRUNETON, 1999). Ils constituent la classe de tanins la plus répandue dans le monde végétal, aussi bien chez les Angiospermes que les Gymnospermes (LEOD, 1974) et les Ptéridophytes (LAURENT, 1975).

La nomination «proanthocyanidine» est due au fait que les TCs se dégradent par HCl (5M) en milieu alcoolique pour former des pigments anthocyanidines de couleur rouge (STEVANOVIC et PERRN, 2009) en plus d'un précipité de polymère insolubles, les phlobaphènes (FALCAO et *al*, 2011).

Leur structure chimique est basée sur un système d'hétérocycles, comme unité de base (ou monomère), le noyau flavane (polymères d'unités flavanniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8). Les monomères précurseurs de ces molécules sont les flavan-3ols (catéchine et épicatechine) et/ou les flavan-3,4 diols (proanthocyanes) (KHANBABAEA et REE, 2001), liés par des liaisons de type C-C (type B) ou C-O-C (type A) (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; JEAN-BLAIN, 1998 ; BRUNETON, 1999 ; FEUCHT et TREUTTER, 1999 ; SCHOFIELD et *al*, 2001).

Il est admis que, ces tanins sont constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4- diols), on peut les qualifier encore de tanins flavaniques (RICHTER, 1993). Inversement aux homopolymères présentant uniquement une classe de flavan-3ols dans leur structure (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; HAGERMAN, 2002) les hétéro-polymères contiennent des monomères de différentes classes (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; HEDQVIST et *al*, 2000).

En fonction du degré de polymérisation, nous distinguons généralement les oligomères, comprenant 2 à 10 monomères, des polymères contenant plus de 10 monomères et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique (OKAMURA et *al*, 1993 ; AGANGA et MOSASE, 2001 ; PERONNY, 2005).

Ils sont beaucoup moins toxiques que, les tanins hydrolysables car non hydrolysables et peu absorbés par la muqueuse digestive en raison de leur poids moléculaire élevé (HAGERMAN, 1992).

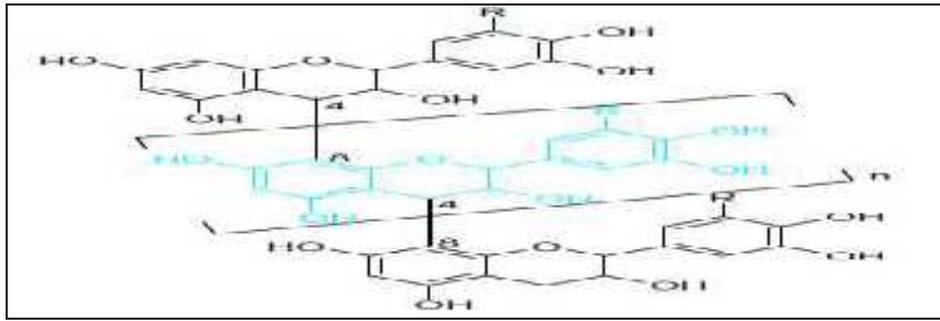


Figure 2 : structure générale de tanins condensés (GILBERT et NORRIS, 1968).

### II.2.2. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables THs sont des oligo- ou poly-esters de sucre simple, en général le glucose ou le xylose, et de molécules d'acides phénoliques (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; JEAN-BLAIN, 1998 ; BRUNETON, 1999 ; MUELLER-HARVEY, 2001 ; STEVANOVIC et PERRIN, 2009). Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides ou alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle la tannase), pour libérer des oses et des acides phénoliques (LEINMULLER et *al*, 1991 ; GHESTEM, 2001), selon la nature de ces derniers. Les THs sont classés en tanins gallique ou gallotanins possèdent un acide gallique, alors que, les tanins éllagiques ou ellagitanins ont un acide hexahydroxyphénique (PARIS et HURABIELLE, 1981 ; HAGERMAN, 2002). Quelques auteurs définissent deux classes supplémentaires de tanins hydrolysables : les taragotanins (l'acide gallique et l'acide quinique comme noyau) et les caffétanins (intégrant l'acide caféique et l'acide quinique).

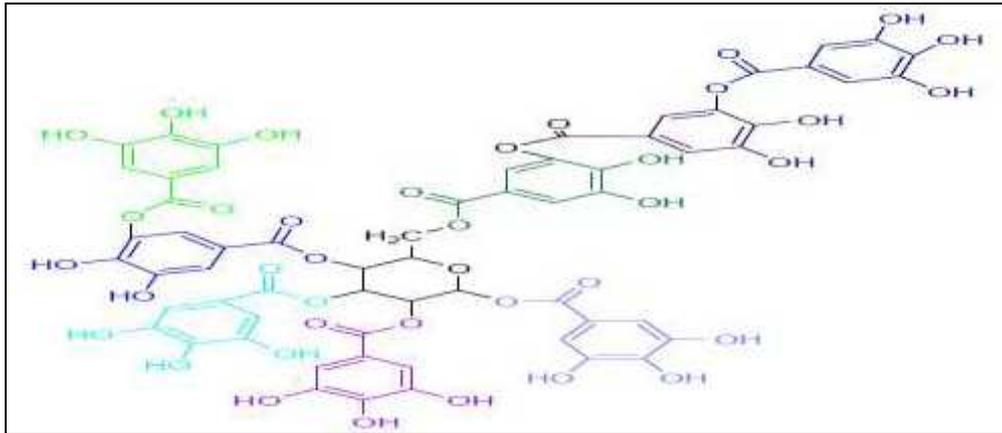
Contrairement aux TCs, les THs ont une distribution taxonomique plus restreinte, ils ne sont présents que chez les Dicotylédones et sont plus facilement hydrolysables par les microorganismes (STEVANOVIC et PERRIN, 2009).

En général, les THs ont un faible PM. Cependant, des couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères de PMs importants, cas des tanins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre les molécules d'acide gallique (MUELLER-HARVEY, 2001). Seules les molécules de triesters ou de PMs supérieurs présentent les propriétés classiques des tanins (BRUNETON, 1999).

Ces tanins peuvent être parfois à l'origine de sévères intoxications souvent mortelles chez les mammifères herbivores. Cette nocivité proviendrait du fait que, les tanins hydrolysables (de faible poids moléculaire) peuvent être hydrolysés puis les composés dérivés peuvent être absorbés au niveau de la muqueuse intestinale et circuler dans le sang, provoquant ainsi d'intoxications, lors d'ingestion trop massive (JEAN BLAIN, 1998), et

provoquant des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les moutons (ZHU et *al*, 1992) ou les bovins (PLUMLEE et *al*, 1998).

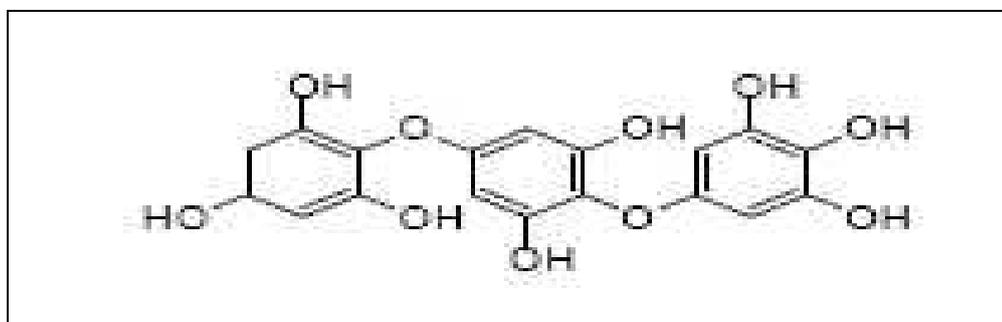
Les THs (Figure 3) ont déjà été employés avec succès comme substituants partiels du phénol dans la fabrication de résines de type phénol-formaldéhyde. Cependant, du fait de la basse réactivité de ce type de tanins avec le formaldéhyde, leur intérêt du point de vue industriel est assez limité pour les colles (KULVIK, 1977).



**Figure 3** : structure générale de tanins hydrolysables (GILBERT et NORRIS, 1968).

### II.2.3. Phlorotanins

Les phlorotanins (Figure 4) sont des oligomères ou polymères de phloroglucinol. Les phlorotanins se trouvent exclusivement dans les algues brunes, comme *Bifurcaria*, *Carpophyllum*, *Cystophora*, *Cystoseira*, *Eisenia*, *Fucus* et *Sargassum spp* (RAGAN et GLOMBITZA, 1986). Ils constituent plus de 15% de la matière sèche d'algues brunes. Le poids moléculaire varie entre 126 et 650 KDa (KOIVIKKO, 2008). L'une des caractéristiques des phlorotanins est leur élasticité à une variété de facteurs environnementaux (lumière, salinité,...) (JORMALAINEN et *al*, 2003).

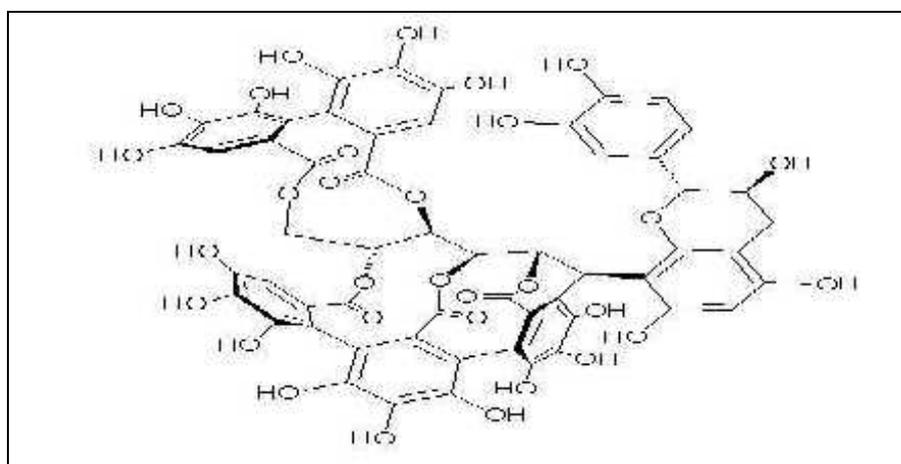


**Figure 4** : exemple de phlorotanins (Trifuhalol A) (KOIVIKKO, 2008).

#### **II.2.4. Tanins complexes**

Les tanins complexes sont des tanins hydrolysables (gallotanins ou ellagitanins) reliés à un groupement flavonoïde par une liaison C-glycosidique (MALIK, 2009). Les tanins complexes peuvent se former dans le vin élevé en barrique lorsque les flavonoïdes entrent en contact avec les tanins hydrolysables libérés par le bois. L'acutissimine A (Figure 5) est la plus connue des tanins complexes (SAUCIER et *al*, 2006), elle a pour structure une unité ellagitanin C-glycosidiques connectées à une unité flavan-3-ol, la catéchine (JOURDES, 2003).

Leur nom provient de leur capacité à réagir positivement aux tests colorimétriques caractéristiques des tanins hydrolysables et condensés. Ils sont également appelés flavano-ellagitanins (MALIK, 2009).



**Figure 5 :** structure de l'acutissimine A (JOURDES, 2003).

#### **II.3. Localisation et distribution chez les végétaux**

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées, les rosacées (GHESTERM et *al*, 2001).

Selon KHANBABAE et REE (2001), les tanins peuvent se produire dans la quasi-totalité des parties de la plante, on les retrouve dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines avec une différence de distribution à travers ceux-ci. Les tanins sont majoritairement stockés dans les tissus épidermiques et subépidermiques, mais peuvent être aussi présents dans le péricarpe des fruits et des racines. Dans une même espèce végétale synthétisant les deux classes de tanins (hydrolysables et condensés), la distribution de ces derniers est notée dans des organes différents de la plante (JEAN-BLAIN, 1998). De même, au niveau cellulaire, les THs sont majoritairement présents dans les parois cellulaires

et les espaces intracellulaires, alors que, les TCs sont surtout stockés dans des vacuoles intracellulaires sous forme libre et, en proportion variable, liée aux fibres des parois cellulaires ou aux protéines cellulaires (TERRILL *et al*, 1992b ; FRUTOS *et al*, 2002).

### II.4. Facteurs de variation de la teneur en tanins

Le taux de tanins varie considérablement entre les différentes espèces végétales et au sein de la même espèce, cette variation dépend de facteurs intrinsèques tels l'espèce et la variété, le stade de développement végétatif (degré de maturité) et de facteurs extrinsèques, comme les conditions environnementales (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; JEAN-BLAIN, 1998 ; NORTON, 1999 ; WATERMAN, 1999).

#### II.4.1. Espèce et la variété

Au sein d'une même famille, les espèces végétales peuvent présenter des différences de teneur et de nature des tanins. Prendre comme exemple des légumineuses, la concentration en TCs diffère largement : 0,3g TCs/Kg de la MS dans le trèfle, 30g TCs/Kg MS dans le sainfoin (KOUPAI-ABYAZANI *et al*, 1993 ; MARAIS *et al*, 2000), 35g TCs/Kg MS dans le sulla (HOSKIN *et al*, 2000).

Au sein d'un même genre, des variations sont observées entre espèces. FOO *et al* (1996, 1997) ont mesuré des teneurs en TCs différentes entre le lotier pédonculé (*Lotus pedunculatus*) (77g TCs/Kg MS) et le lotier corniculé (*Lotus corniculatus*) (48g TCs/Kg MS).

Enfin, des variations de concentration en TCs ont été observées entre les diverses variétés d'une même espèce de lotier corniculé (*L.corniculatus*) (HEDQVIST *et al*, 2000) ou de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) (BARRAU, 2004).

#### II.4.2. Partie et stade végétal(e)

Les différents organes de la plante présentent des teneurs en tanins variables. Cette teneur est également influencée par le stade végétatif (JEAN-BLAIN, 1998).

En général, les plus fortes concentrations sont mesurées dans les fruits, les fleurs et les feuilles, et dérisoirement dans les tiges. Par exemple, BARRAU (2004) a montré que, les feuilles, les fleurs et les tiges de sainfoin contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tanins.

D'après SKADHAUGE *et al* (1997), il y a une corrélation entre la teneur en tanins et le degré de maturité, ainsi dans le grand trèfle (*Lotus uliginosus*, syn. *L. pedunculatus*), la teneur des feuilles en tanins augmente avec la maturité. A l'opposé de SKADHAUGE et ses collaborateurs (1997), MAKKAR *et al* (1991) ont prouvé une diminution de la teneur en

tanins des feuilles de chêne entre avril et septembre (avec le mûrissement) avec une modification de leur structure (augmentation du degré de polymérisation).

### **II.4.3. Conditions environnementales**

BENNICK (2002) et LEINMÜLLER et *al* (1991) ont signalé que, la synthèse des tanins est généralement augmentée en réponse à un stress environnemental suscité par différents facteurs, tel qu'un stress hydrique, déficience en éléments nutritifs, un ensoleillement trop fort (température élevée), et l'intensité lumineuse. Ainsi, la teneur en TCs est plus élevée dans les feuilles d'*Eucalyptus* qui se développe sous une déficience nutritive ou sous une forte lumière (LAWELER et al, 1997).

Un stress engendré par l'agression des végétaux par des herbivores ou des pathogènes induit une synthèse accrue de métabolites secondaires et un stockage important de tanins, en particulier des TCs, au niveau de la zone attaquée (WOODWARD et COPPOCK, 1995 ; FEUCHT et *al*, 1997).

Après une longue période de sécheresse, FEUCHT et *al* (1997) ont observé une augmentation de 7,4 fois de la teneur en flavan-3-ols dans des feuilles jaunissantes par rapport aux feuilles vertes. Une étude de CADOT et MIÑANA CASTELLO (2006) sur les grains de raisin (*Vitis vinifera*) a aussi montré que, la teneur en flavan-3-ols et la distribution des TCs dans les tissus dépendaient de l'exposition à la lumière et des conditions climatiques.

### **II.5. Rôle des tanins chez les végétaux**

Les tanins sont des métabolites secondaires des végétaux (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; BRUNETON, 1999), c'est à dire des substances non-essentiels pour la croissance de la plante. Par contre, ils jouent un rôle dans la défense des plantes face aux agressions.

D'après ROBBINS et *al* (1987) qui décrivent les tanins comme de vrais «boucliers », ces premiers sont utilisés par les plantes pour se défendre des insectes et des champignons. Leur forte caractéristique d'astringence rend la plante difficilement assimilable par les animaux. De même JEAN-BLAIN (1998) et BENNICK (2002) affirment que, la présence des tanins rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation, ce qui conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'une prédation excessive.

Certains scientifiques ont également confirmé le fait que, les tanins constituent un moyen de défense des plantes contre les agressions des prédateurs tels les insectes et les mammifères herbivores (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; WOODWARD et

COPPOCK, 1995 ; FEUCHT *et al*, 1997). Cependant, AYRES *et al.* (1997) ont signalé que, l'ingestion de ces métabolites affectait l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages. Un autre exemple de défense des plantes contre les attaques de certains pathogènes a été observé par FEUCHT et TREUTTER (1999) et COLLINGBORN *et al* (2000). Par exemple, une accumulation de tanins a été observée dans les zones d'invasion de la plante par des bactéries, des champignons ou par des nématodes, ce qui en inhiberait leur développement.

## **II.6. Propriétés des tanins**

La structure chimique des tanins leur permettent la formation des complexes avec de nombreuses macromolécules telles les protéines et les hydrates de carbone, ou encore avec les ions métalliques, ce qui leur confèrent une gamme de propriétés physico-chimiques dont découlent d'autres biologiques (MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; BRAVO, 1998).

### **II.6.1. Propriétés physico-chimiques**

#### **II.6.1.1 Solubilité**

La solubilité des tanins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation (JEAN-BLAIN, 1998 ; BRUNETON, 1999). Les tanins sont également solubles dans l'acétone et les alcools mais insolubles dans les solvants organiques. C'est pour cette raison que, l'extraction des tanins est généralement réalisée par une solution acétone-eau ou méthanol-eau (MAKKAR, 2000).

#### **II.6.1.2 Liaison aux protéines**

La grande affinité des tanins pour les protéines est connue depuis des siècles, le tannage du cuir est une pratique très ancienne qui la montre bien (DOAT, 1978 ; ZIMMER et CORDESSE, 1996 ; TONDI, 2009). En plus, de leurs liaisons directes avec les protéines, formant des complexes insolubles à pH physiologique (pH 7 à 7.4) (ZIMMER et CORDESSE, 1996 ; BRUNETON, 1999), les tanins établissent des ponts entre ces dernières, ce qui entraîne leur précipitation (ZIMMER et CORDESSE, 1996; BRUNETON, 1999).

La complexation tanins-protéines dépend des deux molécules en cause (HAGERMAN, 1992 ; MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; WATERMAN, 1999 ; PONCET-LEGRAND *et al*, 2006 ). Concernant les tanins, leur fixation aux protéines dépend de leur composition chimique (BRAVO, 1998 ; FEUCHT et TREUTTER, 1999 ; WATERMAN, 1999 ; BENNICK, 2002), mais un PM trop élevé et l'encombrement stérique associé, limitent cette fixation (HAGERMAN, 1992 ; MUELLER-HARVEY et ALLAN, 1992 ; JEAN-BLAIN, 1998 ). Pour les protéines, ces dernières se complexent fortement aux tanins lorsque

elles représentent une conformation ouverte et un PM supérieur à 20 kDa et surtout si elles sont riches en acides aminés hydrophobes (proline et hydroxy-proline) (LEINMULLER *et al.*, 1991 ; HAGERMAN, 1992 ; MUELLER-HARVEY *et* ALLAN, 1992 ; ZIMMER *et* CORDESSE, 1996 ; JEAN-BLAIN, 1998 ; MAKKAR, 2003).

Enfin, la formation et la stabilité des complexes tanins/protéines dépendent également des conditions environnementales telles le pH, la température, la force ionique ou la présence de molécules compétitrices. Notamment, la complexation des protéines serait maximale à pH proche de leur pH isoélectrique (JONES *et* MANGAN, 1977; HAGERMAN, 1992).

### **II.6.1.3 Liaison aux acides nucléiques**

Les tanins peuvent aussi se combiner avec les acides nucléiques (MUELLER-HARVEY *et* ALLAN, 1992). En 2006, LABIENIEC *et* GABRYELAK ont démontré que, la complexation des dérivés de l'acide tanique avec l'ADN entraînant des modifications conformationnelles.

### **II.6.1.4 Chélation d'ions métalliques**

Les tanins ont la capacité de chélater les ions ferriques et cuivriques. Ainsi, l'acide tanique chélate les ions ferriques par ces groupements gallates ce qui limite l'absorption intestinale du fer non-hémique (HAGERMAN, 2002).

### **II.6.1.5 Interaction avec d'autres macromolécules**

En plus de leur affinité pour les protéines, les tanins peuvent interagir avec de nombreux types de molécules. Ils peuvent se combiner aux alcaloïdes, à la gélatine *et* aux pectines ainsi qu'aux polysaccharides (DOAT, 1978 ; ZIMMER *et* CORDESSE, 1996 ; TONDI, 2009).

## **II.6.2. Propriétés biologiques**

### **II.6.2.1 Inhibition des enzymes**

Cette propriété est l'une des conséquences de la liaison des tanins avec les protéines. L'inactivation des enzymes peut être directe, par fixation aux sites actifs, ou indirecte par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tanins sur l'enzyme ( ZIMMER *et* CORDESSE, 1996). Dans ce cas les tanins ont un rôle protecteur pour les végétaux, en dénaturant les enzymes digestives des herbivores.

### **II.6.2.2 Activité anti-oxydante**

Grâce à leurs fonctions phénoliques qui ont un fort caractère nucléophile, les tanins présentent des propriétés antioxydantes par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydants (BRUNETON, 1999 ; FEUCHT et TREUTTER, 1999 ; HASSIG et *al*, 1999 ; LIM et *al*, 2007). Les tanins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres, tels le fer et le cuivre sous forme libre, sont des espèces chimiques instables et très réactives. Ils s'attaquent à l'ADN et perturbent le processus de réplication, induisant des mutations cancérigènes. Ainsi, des activités antimutagènes et anticancéreuses ont été attribuées à certains tanins en raison de leur propriété antioxydante (CHUNG et *al*, 1998 ; JUNG et ELLIS, 2001 ; RICHELLE et *al*, 2001).

### **II.6.2.3 Effet anticancéreux**

Les proanthocyanidines, pris à faibles doses et à long terme procurent une protection contre le cancer du côlon (NOMOTO et *al*, 2004). Mais d'une façon générale, les tanins ; hydrolysables comme condensés; ne font qu'augmenter la résistance contre les différents cancers, ils ont même une action anticancéreuse qui diminue, et parfois même, élimine totalement les tumeurs.

### **II.6.2.4 Effet antiseptique**

L'activité antiseptique des tanins a été largement décrite (CHUNG et *al*, 1998 ; BRUNETON, 1999). Certaines drogues à tanins présenteraient des effets antimicrobiens (CHUNG et *al*, 1998 ; HATANO et *al*, 2005 ; SONG et *al*, 2006), antifongiques (BABA-MOUSSA et *al*, 1999 ; BRUNETON, 1999) ou antiviraux (CHUNG et *al*, 1998 ; YAMAGUCHI et *al*, 2002 ; SONG et *al*, 2005). Néanmoins, les applications actuelles en thérapeutique restent restreintes (BRUNETON, 1999).

### **III.1 Cadre de l'étude**

Cette étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques communs (I et II) d'Analyses Physico-chimiques, de LABAB, d'Entomologie Appliquée II et de Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO) durant la période Mars- Juin 2017.

Les principaux objectifs ambitionnés à travers cette étude sont :

1. Caractérisations physico-chimique et phytochimique de coing ;
2. Extraction des tanins à partir de coing par deux méthodes différentes avec les sels à chaud et avec des solvants ;
3. Détermination de l'effet antimicrobien des extraits des tanins de coing contre deux souches bactériennes (l'une à Gram négatif et l'autre à Gram positif) et une souche fongique ;
4. Détermination de l'effet bioinsecticide par inhalation d'extrait des tanins issu de l'extraction par les sels à chaud contre les adultes d'un insecte ravageur des denrées stockées (*Tribolium confusum*).

### **III.2. Matériel et méthodes**

#### **III.2.1. Matériel**

##### **III.2.1.1. Equipements et réactifs chimiques**

Tous les appareillages, verreries, solvants et réactifs chimiques utilisés dans ce travail sont résumés dans l'annexe 1.

##### **III.2.1.2. Milieux de culture utilisés**

Différents milieux de culture, provenant du laboratoire de Microbiologie UMMTO, ont été utilisés pour tester l'activité antimicrobienne de l'extrait de tanins des coings.

- a). Gélose de Mueller Hinton (MH) ;
- b). Gélose Sabouraud.

##### **III.2.1.3. Matériel végétal**

Pour la réalisation de ce travail, le fruit du coing à l'état frais (Figure 6) a été acheté du marché RAHMA de la région de Tizi-Ouzou durant la période de Mars- Avril 2017.

Ce fruit est connu pour sa richesse en tanins et en autres éléments nutritionnels y compris les minéraux, les oligo-éléments, les vitamines et les fibres.



Figure 6 : *Cydonia oblonga* variété *maliformis* (originale, 2017).

#### III.2.1.4. Matériel biologique

➤ *Souches microbiennes utilisées*

Deux bactéries et une moisissure ont été utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne des extraits de tanins de coing (Tableau II).

Tableau II : Souches utilisées pour l'activité antimicrobienne

Souches utilisées	Type	Provenance
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram Positif	Laboratoire de Microbiologie UMMTO
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram Négatif	
<i>Candida albicans</i>	Levure	

➤ *Tribolium confusum*

L'espèce de *Tribolium confusum* utilisée est composée d'adultes d'insectes qui proviennent des élevages de masse réalisés avec de la semoule comme substrat alimentaire au sein du laboratoire d'entomologie II.

### III.2.2 Méthodes d'analyses

#### III.2.2.1. Analyses physico-chimiques

##### ❖ Détermination de la teneur en eau

###### ➤ Principe

La teneur en eau a été déterminée sur un échantillon de coing frais, des parcelles de ce dernier ont été introduites dans des creusets propres pour leur faire subir un séchage dans une étuve réglée à  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min. L'opération est répétée jusqu'à avoir un poids constant (AUDIGIE et *al*, 1978).

###### ➤ Mode opératoire

- 1- Peser séparément 5g du coing frais découpé en parcelles quasiment de même taille dans des creusets propres ;
- 2- Les creusets pesés sont mis dans l'étuve pendant 15 min à  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ;
- 3- Retirés de l'étuve pour refroidir, et les mettre dans un dessiccateur pour éviter toute réhydratation ;
- 4- Après refroidissement, les creusets sont pesés avec le fruit séché à l'aide d'une balance de précision (Sartorius BP121S) ;
- 5- L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

###### ➤ Expression des résultats

La teneur en eau (%) du fruit a été déterminée selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{M1 - M2}{PE} \times 100$$

Soit :

H(%) : teneur en eau ;

M1 : masse en g de l'échantillon avant séchage ;

M2 : masse en g de l'échantillon après séchage jusqu'à poids constant ;

PE : masse en g de la prise d'essai.

La moyenne des pourcentages d'eau de 03 essais dans les mêmes conditions a été déterminée. A partir de la teneur en eau le taux de la matière sèche (MS) a été calculé selon la formule suivante :

$$MS(\%) = 100 - H(\%)$$

Soit :

MS(%) : taux de la matière sèche ;

H(%) : taux d'humidité.

❖ **Détermination de la teneur en cendres**

➤ **Principe**

L'échantillon de coing est calciné à 550°C dans un four à moufle (Nabertherm B170) jusqu'à la destruction de toute la matière organique et l'obtention de cendres de couleur grise claire ou blanchâtre, de poids constant (LINDEN, 1981; LAURENT, 1991).

➤ **Mode opératoire**

- 1- Peser les creusets propres et vides à 0,001g de précision ;
- 2- Ajouter séparément 5g d'échantillon dans les creusets ;
- 3- Placer les creusets dans un four à moufle à 550°C pendant 5h jusqu'à l'obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre ;
- 4- Retirés du four, les creusets sont placés dans un dessiccateur pour le refroidissement, puis pesés à 0,001g de précision.

➤ **Expression des résultats**

La teneur en matière organique est calculée par la formule suivante :

$$MO(\%) = \frac{M1 - M2}{PE} \times 100$$

Soit :

MO(%) : teneur en matière organique ;

M1 : masse en g de l'échantillon avant calcination ;

M2 : masse en g de l'échantillon après calcination ;

PE : masse en g de la prise d'essai.

Trois essais ont été effectués de la même manière afin de déterminer un pourcentage moyen. La teneur en cendres est calculée comme suit :

$$Cd(\%) = 100 - MO(\%)$$

Soit :

Cd(%) : teneur en cendres ;

MO(%) : teneur en matière organique.

❖ **Détermination de pH**

➤ **Principe**

Le pH définit l'acidité du produit considéré, cette mesure s'effectue en utilisant un pH-mètre, à l'aide d'une électrode de verre combinée trempant dans une solution aqueuse de coing à un rapport de 1/5 (Coing/Eau distillée) (ANRICHI *et al*, 2001).

➤ **Mode opératoire**

- 1- Ajouter 10ml d'eau distillée chaude à 2g d'échantillon ;
- 2- Broyer le mélange et laisser refroidir ;
- 3- Etalonner le pH-mètre, en utilisant la solution tampon ;
- 4- La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH-mètre dans un volume permettant son immersion ;
- 5- Noter ensuite la valeur affichée par le pH mètre.

Trois essais ont été réalisés. L'électrode a été rincée avant et après chaque mesure.

❖ **Détermination de l'acidité titrable**

➤ **Principe**

L'acidité titrable est déterminée par neutralisation de l'acide présent dans une quantité connue de coing en utilisant une base (NaOH). L'évaluation se fait par titrage en utilisant un indicateur de couleur ; phénophtaléine (NIELSEN, 2010).

➤ **Mode opératoire**

- 1- Peser 25 g de l'échantillon broyé ;
- 2- Placer l'échantillon dans une fiole conique avec 50 ml d'ED chaude récemment bouillie et refroidie, bien mélanger ;
- 3- Chauffer le mélange au bain-marie pendant 30 min ;
- 4- Refroidir, transvaser quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'ED récemment bouillie et refroidie et bien mélanger puis filtrer ;
- 5- Prendre un volume  $V_0=25$  ml auquel on ajoute 0,25 à 0,5 ml de phénophtaléine ;
- 6- Tout en agitant, verser à l'aide d'une burette la solution NaOH (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante pendant 30 secondes ;
- 7- Faire la lecture sur la burette graduée pour avoir le volume de NaOH ayant décoloré la solution.

➤ **Expression des résultats**

L'acidité titrable est exprimée en gramme d'acide citrique pour 100g d'échantillon. Cette première a été déterminée selon la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{250 \times V1 \times 100}{(M \times V0 \times 10)} \times 0.07$$

Soit :

V0 : volume de la prise d'essai, en millilitres ;

V1 : volume de la solution d'hydroxyde de sodium (0.1N) en millilitres ;

M : masse fraîche prélevée, en gramme ;

0.07 : facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

❖ **Dosage des sucres**

Dans ce dosage, deux catégories de sucres sont mis en évidence à savoir ; les sucres totaux et les sucres réducteurs.

✓ **Préparation du filtrat 1**

Mélanger 10g de coing broyé avec 2,5ml d'acétate de zinc et ajuster le volume à 66ml avec l'eau distillée. Après agitation laisser reposer pendant 15min et ajuster avec l'eau distillée à 100ml. Homogénéiser et filtrer sur un papier filtre et récupérer le filtrat (filtrat 1).

✓ **Préparation du filtrat 2**

5ml de HCL concentré sont ajoutés à 50ml du filtrat 1. Le mélange est chauffé au bain-marie à 70C° pendant 5min. La solution est neutralisée avec la solution de NaOH en présence de phénophtaléine à 1%.

➤ **Teneur en sucres totaux**

**Mode opératoire**

- 1- 5ml de chacune des deux solutions Fehling A et Fehling B ont été prélevés dans un bécher, la solution ainsi obtenue est ajustée à 100ml avec l'eau de robinet ;
- 2- Chauffer jusqu'à ébullition, la solution est titrée avec le filtrat 2 jusqu'à la disparition de la couleur bleue ;
- 3- Deux gouttes du bleu de méthylène sont ajoutées jusqu'à l'apparition de la couleur marron cuivrée ;
- 4- Le titrage est arrêté et le volume du filtrat 2 utilisé est noté (V2).

**Expression des résultats**

La quantité des sucres totaux recherchée dans la prise d'essai est donnée par la formule suivante :

$$ST(\%) = \frac{500}{V(V_2 - 0.05)} \times 10$$

Soit :

ST : quantité de sucres totaux en pourcentage ;

V : volume de la prise d'essai (ml);

V2 : volume du filtrat 2 utilisé pour le titrage (ml).

➤ **Teneur en sucres réducteurs**

**Mode opératoire**

- 1- 5ml de chacune des deux solutions Fehling A et Fehling B ont été prélevés dans un bécher, la solution ainsi obtenue est ajustée à 100ml avec l'eau de robinet ;
- 2- Chauffer jusqu'à ébullition, la solution est titrée avec le filtrat 1 jusqu'à la disparition de la couleur bleue ;
- 3- Deux gouttes du bleu de méthylène sont ajoutées et le titrage est poursuivi jusqu'à l'apparition de la couleur marron cuivrée ;
- 4- Le titrage est arrêté et le volume du filtrat 1 utilisé est noté (V1).

**Expression des résultats**

La quantité des sucres réducteurs dans la prise d'essai est donnée selon la formule suivante :

$$SR = \frac{240}{V(V_1 - 0.05)}$$

Soit :

SR : la quantité de sucres réducteurs (%) ;

V : le volume de la prise d'essai (ml) ;

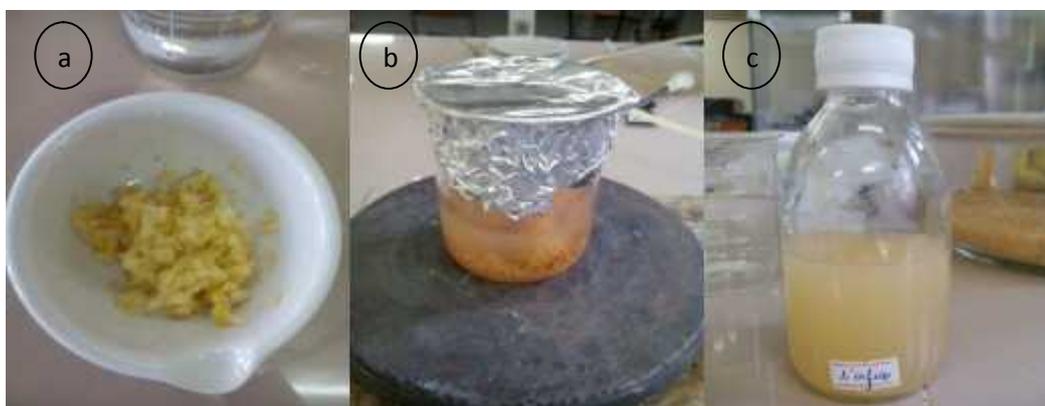
V1 : le volume du filtrat dépensé pour le titrage (ml).

### **III.2.2.2 Analyse phytochimique (screening)**

Il s'agit des tests qualitatifs basés sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Ces tests mettent en évidence les différents groupes chimiques et métabolites secondaires constituant notre échantillon (HAMIDI et *al*, 2013). L'analyse est faite selon la méthodologie standard du screening phytochimique (KUMAR et *al*, 2010 ; DOHOU et *al*, 2013).

#### **✓ Préparation de l'infusé**

20g de coing sont macérés dans 100ml d'eau distillée. Porter à l'ébullition pendant 15min. Après filtration, le filtrat est ajusté à 100ml d'eau distillée. L'infusé ainsi obtenu (Figure 7) est utilisé pour la recherche de certains composés chimiques.



**Figure 7** : étapes de préparation de l'infusé.

a) : broyage des morceaux de coing, b) : chauffage, c) : filtration

#### **➤ Recherche des anthocyanes**

Ajouter quelques gouttes d'HCl à 5ml d'infusé introduites dans un Erlenmeyer. Une réaction positive donne une coloration rouge en présence des anthocyanes.

#### **➤ Recherche des leuco-anthocyanes**

Ajouter 20ml de la solution (propanol / HCl) (V/V) à 2g de coing broyé. Mettre le mélange au bain-marie bouillant pendant quelques minutes. Une coloration rouge de la solution révèle la présence des leuco-anthocyanes.

#### **➤ Recherche des tanins**

A 5ml d'infusé, sont ajoutées quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (5%). La présence des tanins est détectée par une coloration bleue noire de la solution.

➤ **Recherche des tanins galliques**

Saturer l'infusé par l'acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), puis on lui ajoute quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$ . La réaction est dite positive lorsque la coloration bleue foncée apparaît

➤ **Recherche des flavonoïdes**

A 5ml d'infusé, sont ajoutés 5ml d'HCl, un copeau de Mg et 1ml d'alcool isobutanol. La coloration rouge orangée de la solution révèle la présence des flavonoïdes.

➤ **Recherche des quinones libres**

Ajouter à 2g de coing broyé, 2ml d'HCl (1N) et 20ml de chloroforme. Laisser le mélange reposer pendant 3h. Après la filtration de mélange, ajouter au filtrat 5ml d'ammoniaque (1/2). La réaction est positive lorsque la coloration rouge violette apparaît.

➤ **Recherche des saponosides**

Dans deux tubes à essai, on met séparément 5ml d'HCl à 0,1N et 5ml de NaOH à 0,1N. Par la suite, on introduit dans chacun 2 à 3 gouttes d'infusé. Suite à une agitation verticale de 30s, on laisse reposer nos tubes pendant 15min. Une réaction positive est déterminée par la présence d'une mousse persistante. Deux cas sont possibles :

**1<sup>er</sup> cas** : si on obtient le même volume de mousse dans les deux tubes, notre échantillon contient des saponines stéroïdiennes ;

**2<sup>ème</sup> cas** : si il y'aura formation d'une mousse quelque fois plus grande par stabilité et par volume en milieu basique, notre échantillon contient des saponines triterpéniques.

➤ **Recherche des alcaloïdes**

A 5g de coing broyé, sont ajoutées 20ml d'ammoniaque (1/2) et 50ml d'une solution d'éther-chloroforme (3/1). Mélanger puis filtrer. Le filtrat ainsi obtenu est épuisé par HCl (2N). L'identification des alcaloïdes a été réalisée par le réactif Dragendorff qui donne un précipité rouge en présence de ces premiers.

➤ **Recherche des glucosides**

Ajouter quelques gouttes d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 2g de coing broyé. Une coloration rouge brique ensuite violette se manifeste en présence des glucosides.

➤ **Recherche des coumarines**

**Préparation de l'extrait**

Ajouter 2g de coing broyé à 20 ml de la solution (alcool éthylique- eau distillée). Bouillir le mélange pendant 15min à reflux. Filtrer puis refroidir.

### **Identification**

Ajouter à 5ml de filtrat, 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10% jusqu'à l'obtention d'un milieu faiblement acide. L'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines.

### **III.2.2.3. Analyse quantitative des composés phénoliques**

#### **❖ Extraction**

Pour extraire les polyphénols totaux des coings, l'extraction solide-liquide selon le protocole proposé par OWEN et JOHNS (1999) a été adoptée. Le principe de cette technique c'est que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide et dissoudre le principe actif pour l'entraîner à l'extérieur.

Le solvant utilisé pour l'extraction l'éthanol pur à 96%. 1g de coing broyé est laissé macérer dans 20ml de solvant pendant 5 jours avec agitation périodique. Après filtration des extraits, les filtrats sont récupérés et concentrés au rotavapeur à 60°C.

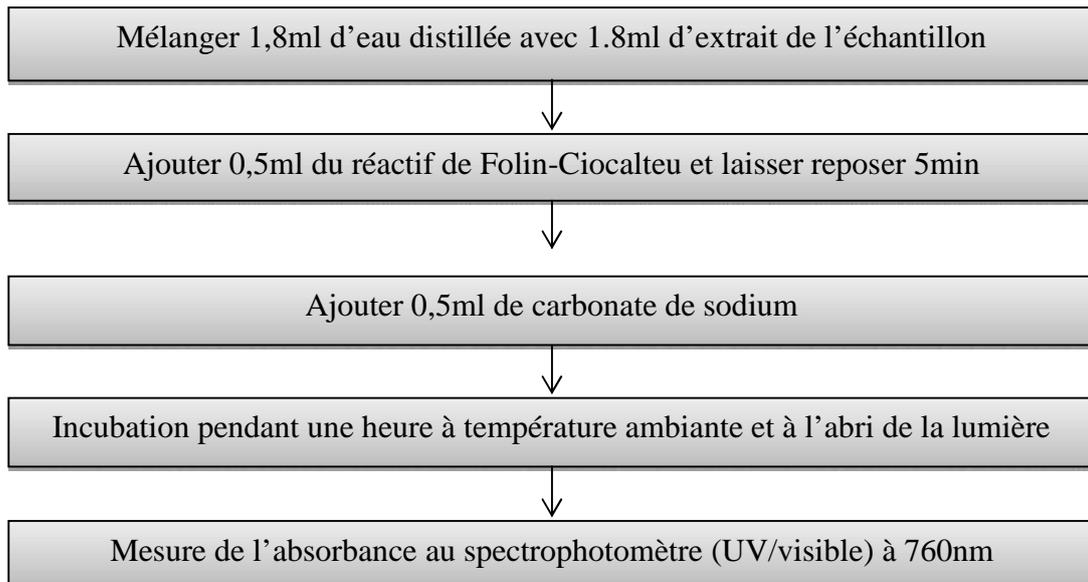
#### **❖ Dosage**

##### **➤ Principe**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu (ABDELHAMMED, 2009). Ce réactif de couleur jaune due au mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMoO_{40}$ ). Après oxydation des polyphénols, ces derniers sont réduits en oxyde de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ), ce qui provoque le changement de la couleur du réactif dont l'intensité dépend de la quantité de polyphénols dans le milieu (BIOZOT et CHARPENTIER, 2006).

##### **➤ Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait de coing a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette technique est détaillée dans l'organigramme de la Figure (8).



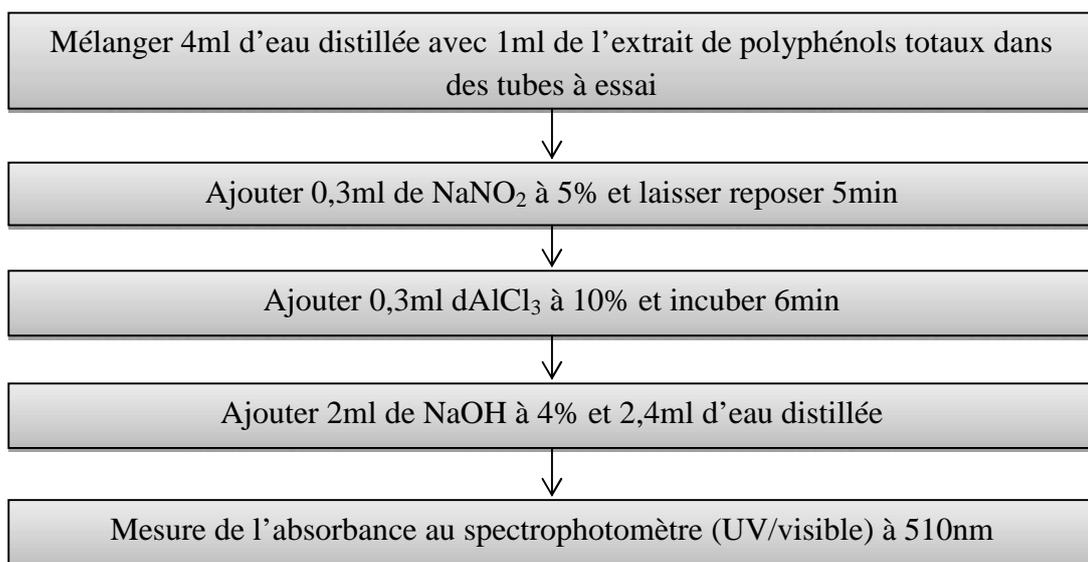
**Figure 8 :** diagramme de dosage des polyphénols totaux (ABDELHAMEED, 2009).

➤ **Expression des résultats**

La quantité de polyphénols de l'extrait de coing est estimée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en milligramme d'Equivalent d'Acide Gallique par gramme du poids sec du fruit (mg EAG/g MS).

❖ **Dosage des flavonoïdes**

Le même extrait de coing est utilisé pour le dosage de flavonoïdes. La méthode proposée par KOSALEC et *al.* (2004) a été utilisée dans la présente étude. Les étapes suivies sont décrites dans le diagramme suivant :



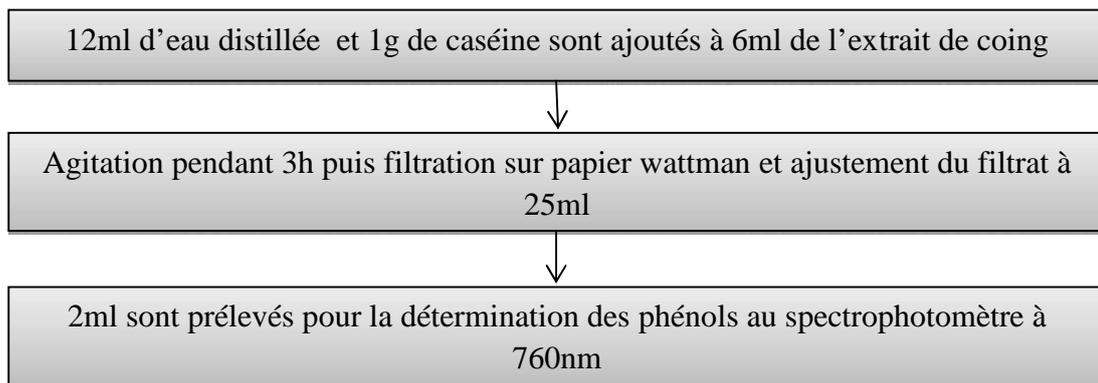
**Figure 9 :** diagramme de dosage des flavonoïdes (KOSALEC et *al.*, 2004).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant la quercitine comme standard (Annexe 5). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de quercitine /g du poids sec du fruit.

❖ **Dosage des tanins**

Le dosage des tanins est réalisé suivant la technique de précipitation à la caséine (Figure 10), en utilisant l'extrait de coing.



**Figure 10** : diagramme de dosage des tanins (BIAYEM, 2002).

➤ **Expression des résultats**

La quantité des tanins est donnée par la différence entre la quantité des polyphénols totaux et la quantité des phénols totaux qui sont obtenus après fixation des tanins sur la caséine.

**III.2.2.4. Extraction des tanins**

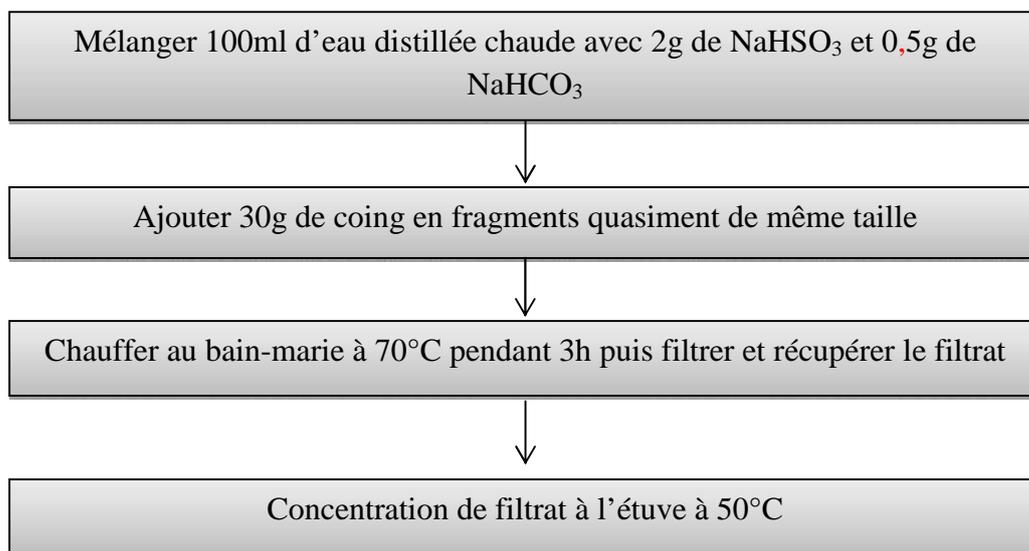
Les tanins sont obtenus de la matière végétale par extraction. En plus du temps d'extraction et du matériel et produits utilisés, la composition des extraits ainsi que les quantités extraites varient en fonction de la méthode d'extraction choisie.

Dans le présent travail deux techniques d'extraction ont été utilisées et comparées afin de mieux comprendre les avantages et les inconvénients de chacune et de choisir celle qui convient à la suite du travail.

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les tanins de toute dégradation éventuelle, en particulier de la lumière (GARCIA PEREZ, 2008). Cependant, la verrerie d'extraction a été entièrement recouverte de feuilles d'aluminium.

❖ **Extraction par des sels à chaud**

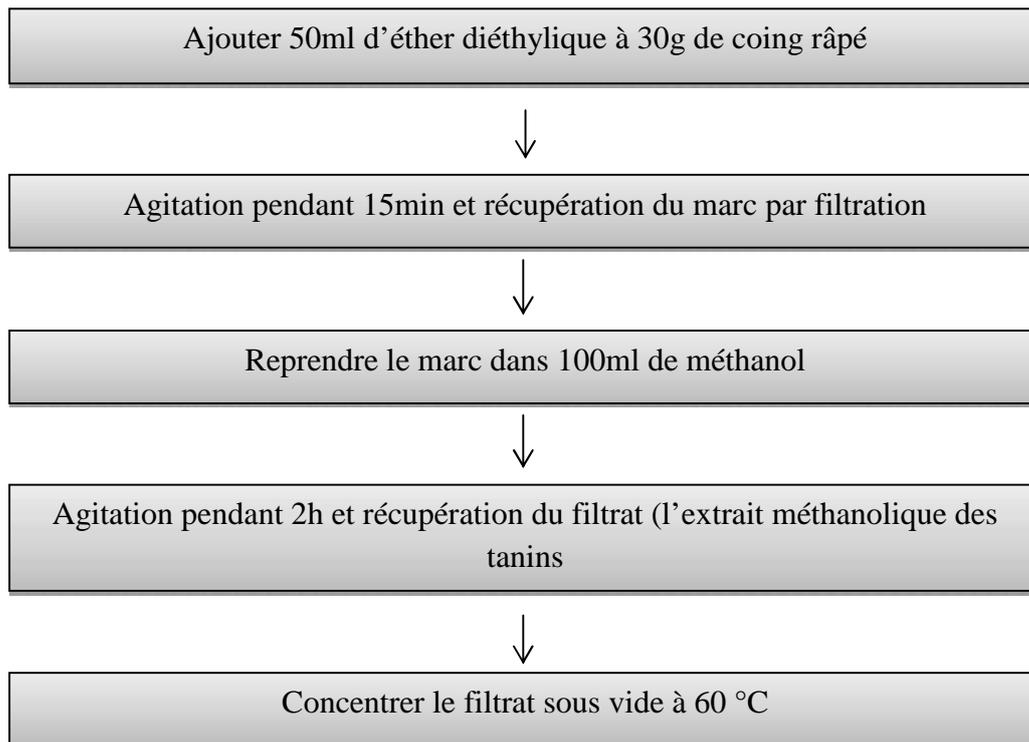
L'extraction a été réalisée dans de l'eau chaude. Des sels sont ajoutés (2% de bisulfite de sodium et 0.5% de bicarbonate de sodium) afin de limiter des réactions d'auto-condensations des tanins (VOULGARIDIS *et al*, 1985 ; BIAYEM, 2002 ; BERTAUD *et al*, 2012) (Figure 11).



**Figure 11** : étapes d'extraction des tanins avec des sels à chaud (BIAYEM, 2002).

❖ **Extraction par des solvants**

Plusieurs solvants ou leurs mélanges peuvent être utilisés pour l'extraction des tanins. Dans cet essai l'extraction a été faite en réalisant deux types de macération; la première, dans l'éther diéthylique pour éliminer les phénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique, la deuxième, dans le méthanol pour récupérer l'extrait méthanolique des tanins (BRUNETON, 1999 ; BIAYEM, 2002). Les étapes sont expliquées dans le diagramme de la Figure (12).



**Figure 12:** Etapes d'extraction des tanins par solvants (BYAYEM, 2002)

#### ❖ Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du liquide, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de l'échantillon soumis à l'extraction. Le rendement est calculé pour les deux extraits issus des deux techniques d'extraction selon la formule donnée par FALLEH et ses collaborateurs en 2008 :

$$R(\%) = \frac{M_{ext}}{M_{ech}} \times 100$$

Soit :

R(%) : rendement en pourcentage ;

M<sub>ext</sub> : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g ;

M<sub>ech</sub> : la masse de l'échantillon utilisé en g.

L'extraction a été réalisée en triplicat, la moyenne des trois essais a été calculée pour chaque extrait.

### **III.2.2.5. Détermination des groupements fonctionnels par Infra-Rouge**

Cette analyse a été réalisée au niveau de l'Université de Boumerdès, avec un spectre de rhamnolipides. Il sert à indiquer la composition des tanins obtenus après extraction.

### **III.2.2.6. Activité antimicrobienne des extraits de tanins**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été déterminée par la technique de diffusion sur un milieu gélosé en utilisant des disques stériles (SACCHETTI *et al*, 2005 ; CELIKTAS *et al*, 2007).

#### **❖ Préparation des milieux de culture**

Le protocole de préparation des deux géloses (Mueller Hinton et Sabouraud) est détaillé dans l'annexe (2).

#### **❖ Préparation des cultures microbiennes**

Des colonies bien isolées issues des cultures sont étalées sur de la gélose MH pour les bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) et sur la gélose Sabouraud pour la souche fongique (*Candida albicans*).

#### **❖ Préparation des solutions à tester**

Trois concentrations différentes ont été préparées et testées pour évaluer l'activité antimicrobienne des deux extraits de tanins ; des quantités de 0,5g, 1g, 1,5g d'extrait ont été dissoutes chacune dans 5ml du solvant d'extraction (méthanol pour l'extrait méthanolique et l'ED pour l'extrait avec les sels à chaud).

#### **❖ Antibiogramme**

##### **➤ Principe**

Le principe de cette technique repose sur la diffusion d'un composé antimicrobien sur milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antimicrobienne est appréciée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de croissance microbienne produite autour des disques après incubation.

##### **➤ Mode opératoire**

- 1- Couler aseptiquement les milieux de culture gélosés préliquifiés (MH, Sabouraud) dans des boîtes de Pétri. Laisser refroidir et solidifier les milieux coulés ;
- 2- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne ;

- 3- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en réalisant des stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois ;
- 4- Recharger l'écouvillon à chaque ensemencement d'une boîte de Pétri. Réutiliser le même écouvillon pour la même souche ;
- 5- Déposer séparément sur la gélose, à l'aide d'une pince stérile, Un disque d'antibiotique comme témoin positif et trois disques Wattman stériles, l'un comme témoin négatif et les deux autres à imbiber avec 20µl de la solution d'extrait à tester. L'opération est faite trois fois pour chaque concentration et chaque microorganisme ;
- 6- Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et mises à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 27°C pendant 48h pour la souche fongique.

Le tableau suivant représente l'évaluation de l'activité antimicrobienne selon le diamètre d'inhibition, suggérée par PONCE et al (2003).

**Tableau III :** Evaluation de l'activité antimicrobienne selon le diamètre d'inhibition

Observation	Signe	Diamètre d'inhibition
Non sensible	(-)	8 mm
Sensible	(+)	8 à 14 mm
Très sensible	(++)	15 à 20 mm
Extrêmement sensible	(+++)	20 mm

#### **III.2.2.7. Evaluation de l'effet bioinsecticide de l'extrait de tanins**

L'effet bioinsecticide de l'extrait de tanins sur *Tribolium confusum*, l'extrait issu de l'extraction avec des sels à chaud a été évalué.

##### **❖ Elevage en pratique de *Tribolium confusum***

La procédure de l'élevage est comme suit :

- 1- Conserver la semoule dans un réfrigérateur pendant au moins 24h, puis la remettre à température ambiante ;
- 2- Verser la semoule préalablement réfrigérée dans des bocaux sur une hauteur de quelques centimètres puis étiqueter-les (espèce, date) ;
- 3- Introduire les adultes de *Tribolium confusum* dans les bocaux fermés avec des couvercles en tissu perforé par des élastiques ;
- 4- Etiqueter les bocaux et placer-les dans une étuve à 30°C et H= 70 ± 5% (Figure 13).



**Figure 13** : espèce adulte de *Tribolium confusum* et son élevage en masse (Originale, 2017).

Afin d'éviter le phénomène de surpopulation, un transfert régulier des adultes dans de nouveaux bocaux a été réalisé permettant ainsi d'assurer de nouvelles infestations. Des tamisages réguliers ont été effectués pour récupérer des individus âgés de 7 jours.

#### ❖ Test par inhalation

L'effet par inhalation de l'extrait de tanins a été étudié sur les individus de *Tribolium confusum* âgés de 7 jours en adoptant la méthode décrite par PAPACHRISTOS et STAMOPOULOS (2002).

Dans des petits flacons (6,5cm de longueur sur 3,5cm de largeur) (Figure 14), des disques de papier filtre (2,5cm) sont suspendus par un fil au centre de la face interne des couvercles. 20 individus sont introduits dans chaque boîte. Des doses d'extrait aqueux de tanins : 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, correspondant à des concentrations de 0,01g, 0,02g, 0,04g de tanins respectivement, obtenues à partir d'une solution de concentration de 2 g par 10 ml de diméthylsulfoxyde DMSO, sont injectées sur les disques. Parallèlement des témoins n'ayant pas reçu d'extrait sont réalisés. Trois répétitions ont été faites pour chaque dose et pour les témoins. L'observation de la mortalité et le dénombrement se fait jusqu'à la mort totale des individus.



**Figure 14** : dispositif expérimental du test par inhalation (Originale, 2017).

**❖ Calcul de la DL50**

Avant de calculer la DL50, le pourcentage de mortalité observée est corrigé par rapport au témoin selon la formule d'ABBOT (1925) qui est la suivante :

$$MC\% = \left( \frac{M2 - M1}{100 - M1} \right) \times 100$$

Soit :

MC% : pourcentage de mortalité corrigée ;

M1 : pourcentage de mortalité chez les insectes témoins ;

M2 : pourcentage de mortalité chez les insectes traités.

**❖ Analyse statistique des résultats**

Une analyse statistique des résultats obtenus pour l'effet bioinsecticide a été réalisée avec l'Excel (version 2010) pour chaque dose (50µl, 100µl, 200µl). Cependant, le coefficient de corrélation a été calculé pour déduire la relation entre les mortalités observées des insectes traités et leurs temps d'exposition à la dose testée d'extrait, le taux moyen de mortalité et la variance ont été également déterminés pour estimer le degré de dispersion des mortalités observées au cours du temps par rapport au taux moyen de mortalité enregistré pour chaque dose (50µl, 100µl, 200µl).

A la fin, une analyse globale des résultats obtenus pour l'ensemble des doses testées a été faite pour comparer et comprendre la relation entre la dose testée et les mortalités enregistrées avec le temps.

#### **IV.1. Résultats d'analyses physico-chimiques du coing**

Les résultats de quelques paramètres physico-chimiques étudiés pour notre fruit (coing) sont résumés dans le tableau IV. Ils sont présentés sous forme de moyenne de trois essais  $\pm$  écart-type (ET).

**Tableau IV** : résultats de certains paramètres physico-chimiques de coing

Paramètres	Teneur moyenne $\pm$ ET
Taux d'humidité (%)	82,186 $\pm$ 3,737
Matière sèche (%)	17,814 $\pm$ 3,737
Teneur en cendres (%)	0,46 $\pm$ 0,133
Matière organique (%)	99,533 $\pm$ 0,133
pH	4,793 $\pm$ 0,361
Acidité titrable (g/100g MS)	0,373 $\pm$ 0,005
Teneur en sucres totaux (%)	4,379 $\pm$ 0,375
Teneur en sucres réducteurs (%)	1,912 $\pm$ 0,297

Il ressort du tableau IV que, le coing est très riche en eau avec une valeur de 82%, cette teneur reste légèrement inférieure à celle mentionnée dans la table de composition nutritionnelle des aliments CIQUAL (2016) qui est de 83,5 % en moyenne.

On déduit aussi d'après ce tableau que, le coing est pauvre en cendres. En comparant avec la valeur donnée par OSCANE et *al* (2005) sur *Crataegus azarolus* (Azérolier ou Epine d'Espagne) soit 3,52% de matière minérale est nettement supérieure à la notre (0,46%).

Le coing utilisé dans notre étude est légèrement acide (4,7) comparant aux valeurs trouvées par GUISTADO et *al* (2009) sur plusieurs cultivars (pH autour de 3,7).

D'après les résultats obtenus pour les sucres, notre fruit apporte plus de 4% de sucres, dont 1.9% de sucres réducteurs. Il est assez peu chargé en sucres par rapport à la majorité des fruits, dans lesquels cette teneur atteint plutôt 9 à 12 % en moyen, soit 11,3% pour la pomme (SOUCI et *al*, 1994).

La teneur en sucres réducteurs (1,912  $\pm$  0,297%) est nettement inférieure à celle trouvée par ROP et *al* (2011) sur le même fruit qui est de 5  $\pm$  1%.

#### **IV.2. Résultats d'analyse phytochimique**

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau V et l'annexe (2).

**Tableau V** : résultats de l'analyse phytochimique de coing étudié

Composés	Quantité
Leuco-anthocyanes	(+++)
Anthocyanes	(-)
Tanins	(+++)
Tanins galliques	(+++)
Flavonoïdes	(++)
Quinones libres	(-)
Saponosides	(-)
Alcaloïdes	(++)
Glucosides	(+++)
Coumarines	(-)

(+++): Abondance ; (++) : moyenne ; (+) : faible ; (-) : absence.

Les résultats de ce tableau révèlent que, le coing possède des métabolites secondaires, les plus réputés sont les leuco-anthocyanes, les tanins, les tanins galliques et les glucosides. On en trouve aussi les flavonoïdes et les alcaloïdes mais en quantités moins importantes que les premiers. Nous constatons l'absence des anthocyanes, les quinones libres, les saponosides et les coumarines.

#### **IV.3. Résultats du dosage des composés phénoliques**

Les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de coing analysé sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau VI** : résultats du dosage des composés phénoliques de coing.

Composés phénoliques	Teneurs
Polyphénols totaux (mg EAG/g MF)	96,82 ± 1,66
Flavonoïdes (mg de Quercetine/g MF)	22,13 ± 1,92
Tanins (mg EAG/g MF)	42,11 ± 3.96

Selon les résultats enregistrés dans le tableau ci-dessus on déduit que, le coing est riche en composés phénoliques notamment en tanins ( $42,11 \pm 3.96$ ).

La teneur en Polyphénols Totaux de coing ( $96, 82 \pm 1,66$ ) le positionne devant la pomme, que d'après BRAT et *al* (2006) renferme en moyenne 180 mg EAG pour 100g de fruit frais et  $406,1 \pm 34,5$  EAG/kg MF selon MURIEL (2008).

Des études faites par AGANGA et MOSASE (2003), PEDNEAULT et *al* (2001) et GIDDEY (1982) ont montré que, les facteurs extrinsèques (géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols.

#### **IV.4. Résultats des rendements d'extraction des tanins**

Les résultats comparatifs des rendements d'extraction des tanins par les deux méthodes sont précisés dans le tableau VII.

**Tableau VII :** rendements d'extraction des tanins de coing selon la méthode d'extraction.

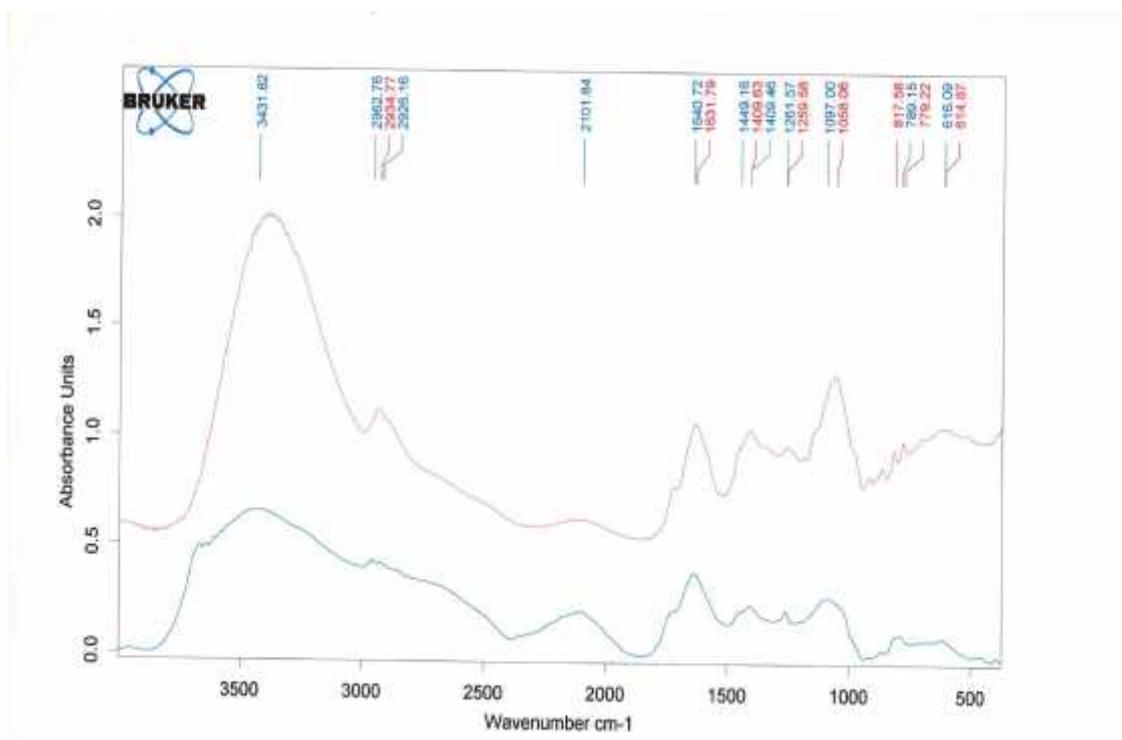
Type d'extraction	Rendement (%)
Extraction avec les sels à chaud	$7,33 \pm 0,83$
Extraction avec le méthanol	$9,66 \pm 0,866$

D'après les résultats obtenus, on constate que, l'extraction avec le méthanol constitue la meilleure technique d'extraction par rapport à celle avec les sels à chaud, avec un rendement de 9,66% pour la première et 7,33% pour la deuxième.

Dans ce cas, la différence dans les taux d'extraction peut s'expliquer par la méthode d'extraction puisque le type, la variété et la maturité du fruit sont les mêmes.

#### **IV.5. Résultat de l'Infra-Rouge**

La figure ci-dessous présente les différents groupes fonctionnels constituant les deux extraits de tanins étudiés.



**Figure 15** : résultat de l'Infra-Rouge des deux extraits de tanins ; extrait issu de l'extraction avec les sels à chaud (en bleu) et extrait méthanolique (en rouge).

L'analyse IR (Figure 16) montre une différence dans la position et l'intensité des pics des deux pâtes de tanins analysées. Les pics de la pâte de tanins issus de l'extraction par solvant sont plus intenses que ceux de la deuxième pâte. Cette différence est attribuée aux conditions d'extraction et la pureté des deux pâtes.

Nous constatons une bande à  $3431\text{ cm}^{-1}$  approximativement caractéristique pour les deux pâtes de tanins analysées. Cette bande est attribuée à la structure du groupe hydroxyle (O-H). En effet, la présence des groupes hydroxyles indique la teneur en humidité absorbée par les deux pâtes.

Les spectres IR indiquent aussi une bande caractéristique à  $2926$  et à  $2934\text{ cm}^{-1}$  approximativement pour les deux pâtes de tanins analysées. Cette bande est attribuée à la structure de groupe amino acide. Dans cette région les groupes amines absorbent les ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{HSO}_3^-$ . Ceci explique la faible quantité des groupements amines dans la pâte de tanins issue de l'extraction par solvant.

Les amides sont caractérisés par les vibrations relatives aux groupements C-N et N-H qui absorbent essentiellement aux alentours de  $1425$  et  $1640\text{ cm}^{-1}$  respectivement. Les deux pâtes de tanins possèdent le groupement amide (bandes caractéristiques à  $1640\text{ cm}^{-1}$  et à  $1631\text{ cm}^{-1}$  approximativement). La poudre de tanins issue de l'extraction par sel renferme des amides

situés à 1640 et 1409  $\text{cm}^{-1}$ . Egalement, la 2eme pâte renferme des amides situés à 1631 et à 1409  $\text{cm}^{-1}$ .

Egalement, les deux pâtes de tanins analysées renferment de groupements éthers situés à 1259  $\text{cm}^{-1}$ , des hydrocarbures acétyléniques (non symétriques) situés à 789 et à 779  $\text{cm}^{-1}$  et le groupement carbonyle C=H situés à 616 et à 617  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **IV.6. Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de tanins**

La figure (16) représente les résultats d'antibiogramme des tanins vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* respectivement.



**Figure 16** : résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de tanins

a) : *Staphylococcus aureus* ( = 0mm), b) : *Escherichia coli* ( = 0mm), c) : *Candida albicans* ( = 0mm).

Les résultats obtenus ne révèlent aucune zone d'inhibition vis –à-vis des souches testées. La prolifération des germes testés peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- 1- Une faible concentration des doses testées en tanins,
- 2- La non purification des tanins obtenus (présence des sucres responsables de la prolifération des germes).
- 3- La nature des tanins obtenus : selon LEOD (1974), les microorganismes peuvent présenter diverses actions en présence d'un milieu contenant des tanins, ces comportements dépendent également des types de tanins, les tanins condensés ont un effet inhibiteur plus marqué sur l'activité microbienne que les tanins hydrolysables.
- 4- La résistance des germes aux tanins : les microorganismes peuvent présenter des mécanismes de défense inactivant les tanins, voire les dégrader et les utiliser. REED (1995) a mis en évidence des modifications du glyco-calix des bactéries en présence de

tanins. Cependant, des glycoprotéines particulières sont synthétisées bloquant les tanins, à l'image des protéines salivaires riches en proline.

**IV.7. Résultats de l'effet insecticide des tanins de coing sur *Tribolium confusum***

**IV.7.1. Test d'inhalation**

Les résultats obtenus montrent qu'une mortalité totale des adultes de *T. confusum* est enregistrée après 1 heure et 55min d'exposition en utilisant l'extrait de tanins de coing à la dose 50µl, après 1 heure et 20min la mortalité est observée pour la dose 100µl et au bout de 25min en testant la dose de 200µl, par contre la mortalité est de 0% chez les témoins (Tableaux VIII et IX).

**Tableau VIII** : moyenne des morts de *T. confusum* ( $\pm$  écart type) en fonction des facteurs dose et temps.

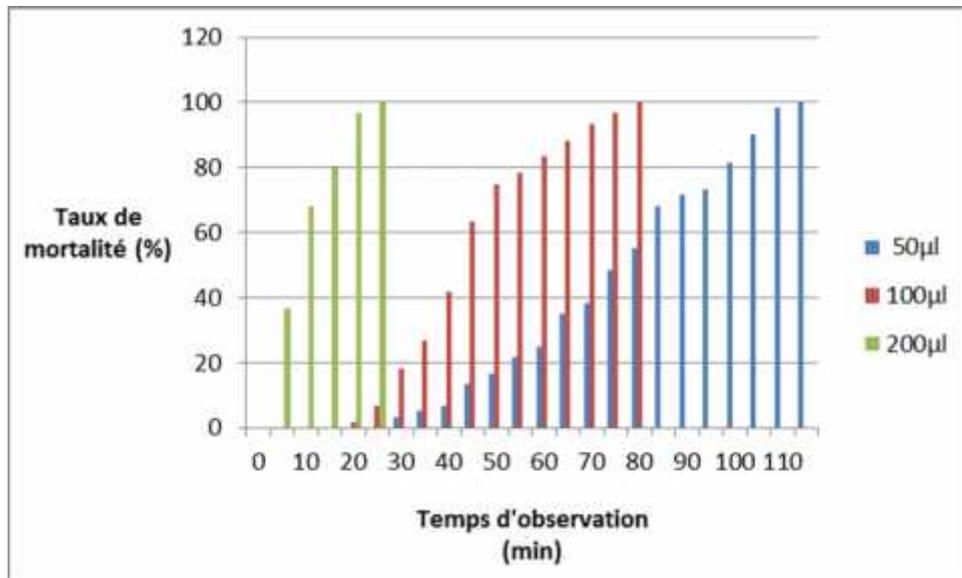
Doses ( $\mu$ l) \ Temps (min)	50	100	200
0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	7,33 $\pm$ 1,527
10	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	13,66 $\pm$ 2,516
15	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	16 $\pm$ 2
20	0 $\pm$ 0	0,33 $\pm$ 0,577	19,33 $\pm$ 0,577
25	0 $\pm$ 0	1,33 $\pm$ 0,577	20 $\pm$ 0
30	0,66 $\pm$ 1,154	3,66 $\pm$ 0,577	
35	1 $\pm$ 1	5,33 $\pm$ 0,577	
40	1,33 $\pm$ 1,154	8,33 $\pm$ 1,154	
45	2,66 $\pm$ 1,527	12,66 $\pm$ 1,527	
50	3,33 $\pm$ 0,577	15 $\pm$ 1,732	
55	4,33 $\pm$ 0,577	15,66 $\pm$ 1,527	
60	5 $\pm$ 1	16,66 $\pm$ 1,527	
65	7 $\pm$ 0	17,66 $\pm$ 1,154	
70	7,66 $\pm$ 1,154	18,66 $\pm$ 1,527	
75	9,66 $\pm$ 1,527	19,33 $\pm$ 1,154	
80	11 $\pm$ 2	20 $\pm$ 0	
85	13,66 $\pm$ 1,154		
90	14,33 $\pm$ 1,154		

95	14,66 ± 1,527		
100	16,33 ± 3,055		
105	18 ± 1,732		
110	19,66 ± 0,577		
115	20 ± 0		

**Tableau IX :** taux moyen de mortalité (%) de *T. confusum* en fonction des facteurs dose et temps

Temps (min) \ Dose (µl)	Dose (µl)		
	50	100	200
0	0	0	0
5	0	0	36,65
10	0	0	68,3
15	0	0	80
20	0	1,65	96,65
25	0	6,65	100
30	3,3	18,3	
35	5	26,65	
40	6,65	41,65	
45	13,3	63,3	
50	16,65	75	
55	21,65	78,3	
60	25	83,3	
65	35	88,3	
70	38,3	93,3	
75	48,3	96,65	
80	55	100	
85	68,3		
90	71,65		
95	73,3		
100	81,65		
105	90		

110	98,3		
115	100		



**Figure 17 :** taux de mortalité de *Tribolium confusum* en fonction des facteurs dose et temps.

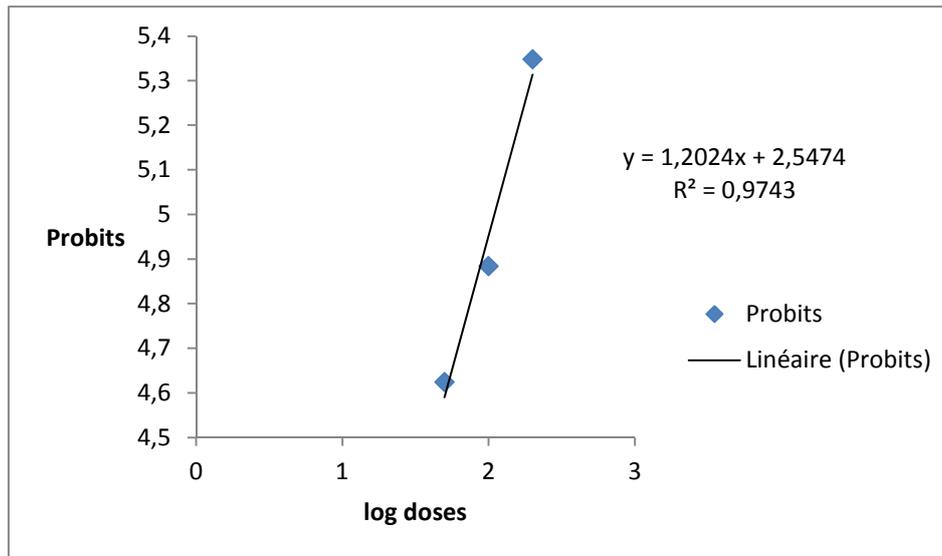
#### IV.7.2. Résultat de la DL50

Le tableau suivant rassemble les valeurs des moyennes de mortalités, des mortalités corrigées et des probits relatives aux logarithmes décimaux des doses testées (50µl, 100µl, 200µl).

**Tableau X :** moyennes de mortalités, les mortalités corrigées et les probits en fonction des logarithmes décimaux des doses.

Log doses	Moyennes de mortalités (%)	Mortalités corrigées (%)	Probits
1,69897	35,4729	35,4729	4,6241
2	45,4735	45,4735	4,8842
2,30103	63,6	63,6	5,348

La figure (18) représente la droite de régression des mortalités corrigées de *T. confusum* en fonction des logarithmes décimaux des trois doses (50µl, 100µl, 200µl).



**Figure 18 :** droite de régression des mortalités corrigées de *T. Confusum* en fonction des logarithmes décimaux des doses.

Selon l'équation de la droite de régression :

$$y = 1,2024x + 2,5474$$

On remplaçant «y» par 5 (le probit qui correspond à 50% de mortalité), nous trouvons la valeur de x qui correspond au logarithme décimal de la DL50 ensuite on a obtenu la DL50 qui est de 109,64µl d'extrait de tanins.

#### IV.7.3 Résultats de l'analyse statistique

Le taux moyen de mortalité et le coefficient de corrélation ainsi que la variance ont été calculés pour chaque dose. Une analyse globale des trois doses a été réalisée à la fin. Les figures (19, 20, 21) représentent le taux de mortalité en fonction du temps pour les doses (50µl, 100µl, 200µl) respectivement.

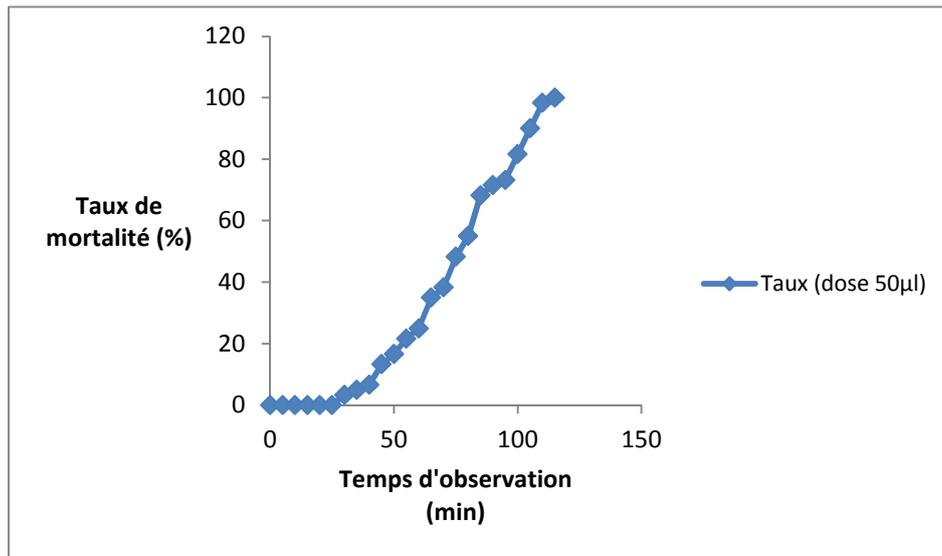


Figure 19 : taux de mortalité de *T. confusum* en fonction du temps à la dose 50µl

D'après la figure ci-dessus, la longévité des individus fut statique jusqu'à 25min où elle s'est diminué linéairement avec l'augmentation du taux de mortalité pour atteindre un taux de 100% après 115min.

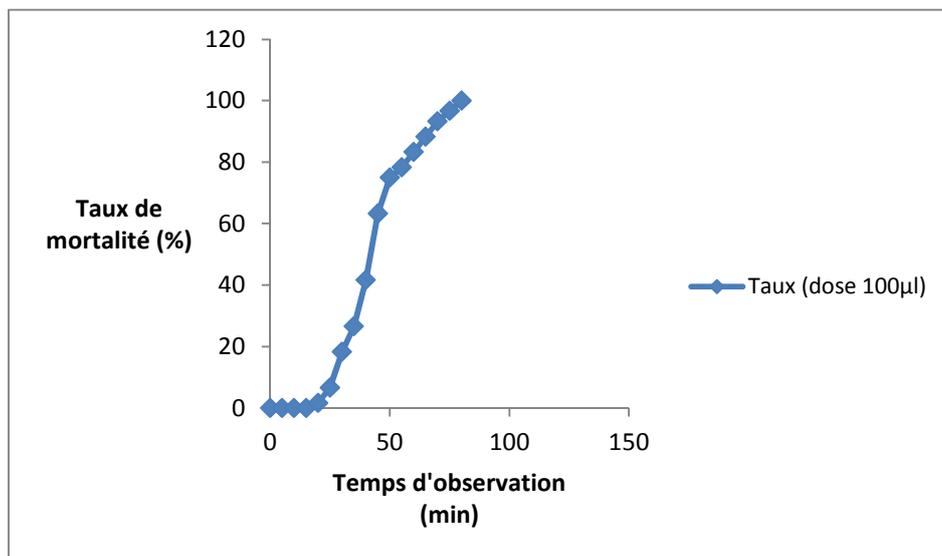
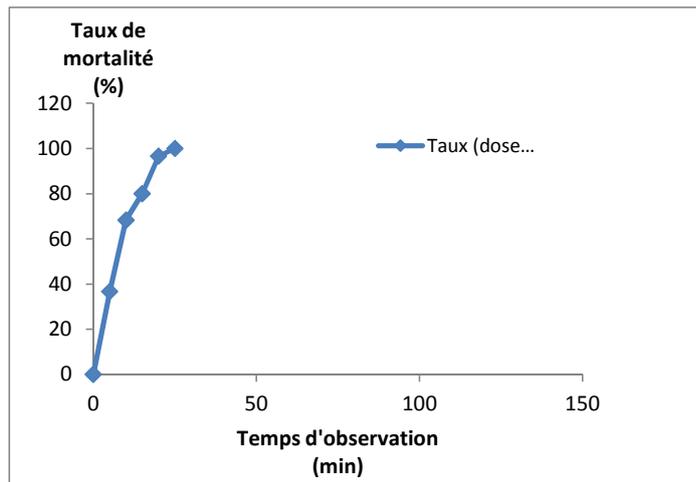


Figure 20 : taux de mortalité de *T. confusum* en fonction du temps à la dose 100µl.

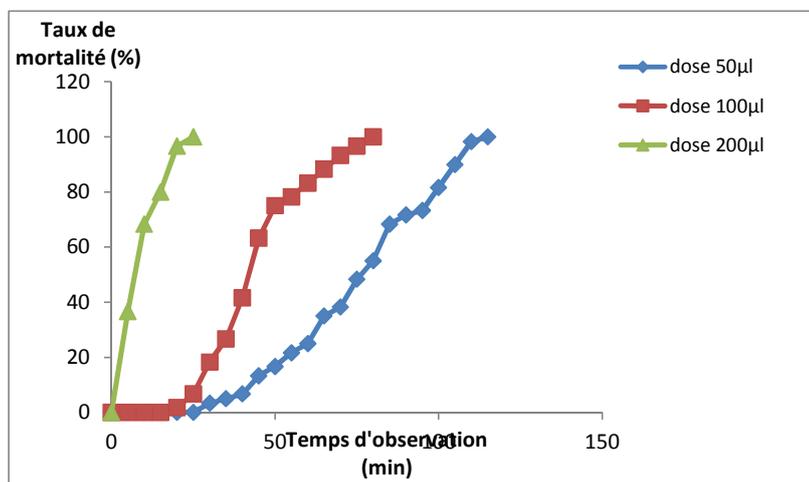
Le taux de mortalité des adultes de *T. confusum* s'est augmenté progressivement à partir de 20 min. La mortalité totale des individus est enregistrée après 85 min d'exposition à l'extrait de tanins à la dose 100µl.



**Figure 21 :** taux de mortalité de *T. confusum* en fonction du temps à la dose 200µl.

La mortalité des adultes de *T. confusum* est enregistrée directement après l'exposition aux tanins à la dose 200µl, une mortalité totale a été obtenue après 25 min.

Une analyse globale et comparative des résultats obtenus pour les trois doses a été réalisée. La figure 22 montre l'évolution du taux de mortalité en fonction du temps pour chacune des trois doses testées (50µl, 100µl, 200µl).



**Figure 22 :** taux de mortalité de *T.confusum* en fonction du temps pour les trois doses (50µl, 100µl, 200µl).

Plusieurs variables ont été prises en considération pour comparer les résultats de l'effet bioinsecticide des trois doses de l'extrait testées, à savoir le temps d'exposition des individus

à la dose, le taux moyen de mortalité enregistré, le coefficient de corrélation et la variance (Tableau XI).

**Tableau XI** : temps d'exposition, taux moyen de mortalité, Coefficient de corrélation et la variance en fonction de la dose.

Dose ( $\mu$ l)	Temps d'exposition (min)	Taux moyen de mortalité (%)	Coefficient de corrélation	Variance
50	115	35	0,96261694	0,121162395
100	85	45	0,96906494	0,154224356
200	25	64	0,95593925	0,124659583

D'après la figure (22) et le tableau (XI), on déduit qu'il y'a une relation linéaire positive des taux de mortalité enregistrés avec les temps d'exposition des adultes de *T. confusum* aux différentes doses de l'extrait de tanins.

On observe depuis la figure (22) que, la pente caractéristique de la dose 200 $\mu$ l est plus inclinée par rapport à celle de la dose 100 $\mu$ l, de même cette dernière par rapport à la pente caractéristique de la dose 50 $\mu$ l. Ce qui est logique vu que le temps d'exposition à l'extrait (le nombre d'observation) diminue d'une manière significative de la dose 50 $\mu$ l (115 min) à 200 $\mu$ l (25 min).

Les variances enregistrées pour les trois doses diffèrent légèrement. Ce qui révèle la similarité de distribution des taux de mortalité par rapport au taux moyen de mortalité enregistrés au cours du temps pour chaque dose.

Le présent travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne et de l'effet bioinsecticide d'un fruit de la famille des rosaceae à savoir *Cydonia oblonga* connu sous le nom commun le coing. A cet effet, plusieurs analyses de caractérisation ont été réalisées sur ce fruit à savoir le screening phytochimique, la caractérisation physico-chimique, l'extraction et le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, tanins) et enfin l'évaluation des effets antimicrobien et bioinsecticide de ces derniers.

L'analyse phytochimique révèle que, le coing (*Cydonia oblonga*) est riche en métabolites secondaires (polyphénols, tanins et flavonoïdes), reconnus pour leurs propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes.

Par ailleurs, l'étude de l'activité antimicrobienne montre que, les extraits de tanins issus des deux extractions (avec les sels à chaud et avec solvants) ne présentent aucun spectre d'action sur les microorganismes pathogènes testés tel que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Ce qui nécessite éventuellement l'augmentation de la dose de tanins ou la purification de ces derniers.

L'extrait de tanins obtenu par les sels à chaud a un effet bioinsecticide par inhalation vis-à-vis d'individus adultes de *Tribolium confusum*, il diminue la longévité de cet insecte à des doses différentes (50µl, 100µl, 200µl). Cependant, d'autres études peuvent s'effectuer pour mettre en valeur l'importance des tanins dans la lutte contre d'autres ravageurs des denrées alimentaires par différents modes.

## Références bibliographiques

---

- **AGANGA A.A., MOSASE K.W. (2001)**. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 91:107-113.
- **AMMAR S., EDZIRI H., MAHJOUB M. A., CHATTER R., BOURAOUI A., MIGHRI Z. (2009)**. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine* 16, 1156–1161. 10.1016/j.phymed.2009.03.012.
- **ARABACI G., USLUOGLU A. (2014)**. The enzymatic decolorization of textile dyes by the immobilized polyphenol oxidase from Quince leaves. *Sci. World J.* 2014:685975. 10.1155/2014/685975.
- **ASHRAFI H., GHABILI K., ALIHEMMATI A., JOUYBAN A., SHOJA M. M., ASLANABADI S., et al. (2013)**. The effect of quince leaf (*Cydonia oblonga* Miller) decoction on testes in hypercholesterolemic rabbits: a pilot study. *Afr. J. Tradit. Complement. Alter. Med.* 10, 277–282. 10.4314/ajtcam.v10i2.12.
- **ASLAN M., ORHAN N., ORHAN D.D., ERGUN F. (2010)**. Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 128, 384–389. 10.1016/j.jep.2010.01.040.
- **AUDIGIE C., FIGARELLA J., ZONSZAIN F. (1978)**. Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). Paris, 247.
- **AYRES M.P., CLAUSEN P.H., MACLEAN S.F., REDMAN A.M. et REICHART P.B. (1997)**. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78 (6), 1696-1712.
- **BABA-MOUSSA F., AKPAGANA K et BOUCHET P. (1999)**. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacology* 66 (3), 335-338.
- **BARRAU E. (2004)**. Etude de l'activité anthelminthique du sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) sur les parasites gastro-intestinaux de la chèvre. Toulouse, France.
- **BATE-SMITH E.C., SWAIN T. (1962)**. Flavonoid compounds. In : H.S. Mason, A.M. Florkin (eds), *Comparative biochemistry*, 755-809. *Academic Press, New York*.
- **BENNICK A. (2002)**. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13 (2), 184-196.
- **BOIZOT N et CHARPENTIER J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. Pp 79-82. (Cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

## Références bibliographiques

---

- **BRAVO L. (1998)**. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Review* 56, 317-333.
- **BROUNS F., THEUWISSEN E., ADAM A., BELL M., BERGER A., MENSINK R.P. (2012)**. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women. *Eur J Clin Nutr.* May;66(5):591-9.
- **BRUNETON J. (1999)**. Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- **BUDRIESI R., IOAN P., MICUCCI M., MICUCCI E., LIMONGELLI V., CHIARINI A. (2010)**. Stop Fitan: antispasmodic effect of natural extract of chestnut wood in guinea pig ileum and proximal colon smooth muscle. *J. Med Food* 13, 1104–1110. 10.1089/jmf.2009.0210.
- **CADOT Y., MIÑANA CASTELLO M.T.C., M. (2006)**. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera L. cv Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2), 65-75.
- **COLLINGBORN F.M.B., GOWEN S.R. et MUELLER-HARVEY I. (2000)**. Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5297-5301.
- **CARVALHO M.1., SILVA B.M., SILVA R., VALENTÃO P., ANDRADE P.B, BASTOS M.L. (2010)**. First report on *Cydonia oblonga* Miller anticancer potential: differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* Mar 24; 58(6):3366-70.
- **CHUNG K.T., WEI C.I. et JOHNSON M.G. (1998)**. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Techn.* 9, 168-175.
- **COSTA R.M., MAGALHAES A.S., PEREIRA J.A., ANDRADE P.B., VALENTAO P., CARVALHO M., et al. (2009)**. Evaluation of free radical-scavenging and anti-hemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem. Toxicol.* 47, 860–865. 10.1016/j.fct.2009.01.019.
- **COWAN M., (1999)**. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Clin. Microbiol. Rev.*12, 564–582.
- **DOAT J. (1978)**. Les tannins dans les bois tropicaux. *Bois et Foret des Tropiques* 182: 37–54.

## Références bibliographiques

---

- DOHOU N., YAMNIK., GMIRAN., IDRISSE HASSANI L.M. (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychroides*. *Acta Botanica Malacitana*, 29:233- 239.
- DOSS A., MUBARACK H.M., DHANABALAN R. (2009). Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian J. Sci. Technol.* 2, 41–43.
- DUKE J.A., BOGENSCHUTZ-GODWIN M.J., DUCELLIAR J., DUKE P.A.K. (2002). *Handbook of Medicinal Herbs*, 2nd Edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- EVANS W.C., EVANS D., TREASE G.E. (2002). *Trease and Evans pharmacognosy*, 15th Edn. New York, NY: WB Saunders.
- ERDOGAN T., GONENÇ T., HORTOGLU Z. S., DEMIRCI B., BA ER K. H. C., KIVÇAK B. (2012). Chemical composition of the essential oil of quince (*Cydonia Oblonga* Miller) leaves. *Med. Aromat. Plants* 1:134 10.4172/2167-0412.1000e134.
- FALCÃO L., ARAÚJO M.E.M. (2011). Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. *J. Cult. Herit.* 12: 149–56.
- FATTOUCH S., CABONI P., CORENEO V., TUBERESSO C., ANGIONI A., DESSI S., MARZOUKI N., CABRAS P. (2006). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblonga* miller). pulp and peel phenolic extracts, *J.Agr.food.chem.*
- FATTOUCH S., CABONI P., CORONEO V., TUBEROSO C.I., ANGIONI A., DESSI S *et al.* (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolc extracts. *J. Agric. Food Chem.* 55, 963-969. 10. 1021/jf062614e.
- FEUCHT W., TREUTTER D et CHRIST E. (1997). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.* 17, 335-340.
- FEUCHT W et TREUTTER D. (1999). The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, PRESS et BOCA RATON (Eds.), pp. 307-338.
- FOO L.Y., NEWMAN R., WAGHORN G., MC NABB W.C. et ULYATT M.J. (1996). Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 41, 617-624.
- FRUTOS P., HERVÁS G., RAMOS G., GIRÁLDEZ F.J. et MANTECÓN A.R. (2002). Condensed tannins content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*, 95: 215-226.
- FREUDENBERG K. (1920). *Die Chemie der Natürlichen Gerbstoffe*. J. Springer: Berlin.

## Références bibliographiques

---

- **GHESTEM A., SEGUIN E., PARIS M et ORECCHIONI A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed TEC&DOC. Paris. pp275. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- **GHOLGHOLAB H. (1961).** Ghiah (in Farsi). Tehran: Tehran University Press.
- **GIDDEY C (1982).** Les produits à humidité intermédiaire : Cas particulier du problème de la conservation des produits à humidité intermédiaire .*Ed.APRIA. Paris. 1982. pp : 21-28.*
- **GILBERT B.L., NORRIS D.M., (1968).** Achemical basis for bark beetle (scolytus) distinction between host and non-host trees. *J Insect physiol.* Vol. (14): 1063-1068.
- **HAGERMAN A.E. (1992).** Tannin protein interactions. In: Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry, HO, LEE et HUANG (Eds.), *American chemical society, Washington DC, pp. 236-247.*
- **HAGERMAN A.E. (2002).** Tannin Chemistry ([www.users.muohio.edu/hagermae](http://www.users.muohio.edu/hagermae)).
- **HAMAUZU Y., IRIE M., KONDO M., FUJITA T. (2008).** Anti-ulcerative properties of crude polyphenols and juice of apple and Chinese quince extracts. *Food Chem.* 108, 488–495. 10.1016/j.foodchem.2007.10.084.
- **HAMIDI H.F., MOEZZI A., KHOUZANI M.A., MAHMOUDJANLOU Y., NIKNEJAD F., FARAMARZI M.A. (2013).** Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Res. J. Chem. Environ.* 17, 76–81.
- **HÄSSIG A., SCHWABL H et STAMPFLI K. (1999).** Flavonoids and tannins: plantbased antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses* 52, 479-481.
- **HASLAM E. (1998).** Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. *Cambridge University Press, Cambridge (UK).*
- **HATANO T., KUSUDA M., INADA K., OGAWA T.O., SHIOTA S., TSUCHIYA T et YOSHIDA T. (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66 (17), 2047-2055.
- **HEDQVIST H., MUELLER-HARVEY I., REED J.D., KRUEGER C.G et MURPHY M. (2000).** Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 41-56.
- **HOSKIN S.O., WILSON P.R., BARRY T.N., CHARLESTON W.A. et WAGHORN G.C. (2000).** Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus sp.*) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.* 68 (3), 223-230.
- **JEAN-BLAIN C. (1998).** Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.* 149, 911-920.

- **JONES W.T. et MANGAN W.T. (1977).** Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Sci. Food Agric.* 28 (2), 126-136.
- **JOURDES M. (2003).** Réactivité, synthèse, couleur et activité biologique d'ellagitannins C-glycosidiques et flavano-ellagitannins. Université Bordeaux I, Bordeaux.
- **JOUYBAN A., SHOJA M.M., ARDALAN M.R., KHOUBNASABJAFARI M., SADIGHI A., TUBBS R.S., et al (2011).** The effect of quince leaf decoction on renal injury induced by hypercholesterolemia in rabbits: a pilot study. *J. Med. Plants Res.* 5, 5291–5295.
- **JUNG Y.D et ELLIS L.M. (2001).** Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Path.* 82, 309-316.
- **KAMRA D.N., AGARWAL N., CHAUDHARY L.C. (2006).** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* Vol. (1293) : 156–163.
- **KHADEMI F., DANESH B., NEJAD M.D., RAD J.S. (2013).** The comparative effects of atorvastatin and quince leaf extract on atherosclerosis. *Iran. Red Cres. Med. J.* 15, 639–643. 10.5812/ircmj.4030.
- **KHANBABAE K et REE T.R. (2001).** Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry.* 18: 641-649. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- **KHOUBNASABJAFARI M., JOUYBAN A. (2011).** A review of phytochemistry and bioactivity of quince (*Cydonia oblonga* Mill). *J. Med. Plants Res.* 5, 3577–3594.
- **KHENAKA K. (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 81p.
- **KOIVIKKO R. (2008).** Brown algal phlorotanins improving and appluing chemical methods, Turun Yliopiston Julkaisuja Annales Universitatis Turkuensis, SARJA-SER. A I OSA-TOM, 318, pp 1-61.
- **KIRIMER N., TUNALIER Z., CAN B.K.H., CINGI I. (1997).** Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta Med.* 63, 556–558. 10.1055/s-2006-957765.
- **KOUPAI-ABYAZANI M.R., MUIR A.D., BOHM B.A., TOWERS G.H.N et GRUBER M.Y. (1993).** The proanthocyanidines polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34, 113-117.

- **KULVIK E. (1976)**. "Chestnut wood tannin extract in plywood adhesives," *Adhesives Age*, vol. 19, pp. 19-21.
- **KULVIK E. (1977)**. "Chestnut wood tannin extract as a cure accelerator for phenol-formaldehyde wood adhesives," *Adhesives Age*, vol. 20, pp. 33-34.
- **KUMAR., KARTHIK L., BHASKARA RAO KV. (2010)**. Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves – an in vitro study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 141-144.
- **LABIENIEC M et GABRYELAK T. (2006)**. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *J. Photochem. Photobiol.* 82 (1), 72-78.
- **LAURENT S. (1975)**. Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tanins chez quelques Ptéridophytes. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 83, 735-752.
- **LAWELER I. R., FOLEY W. J., WOODROW I. E et CORK S. J. (1997)**. The effects of elevated CO<sub>2</sub> atmospheres on the nutritional quality of *Eucalyptus* foliage and its interaction with soil nutrient and light availability. *Oecologia*. 109: 59-68.
- **LEINMÜLLER E., STEINGASS H et MENKE K.H. (1991)**. Tannins in Ruminant feed stuff. Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- **LEOD M.N. (1974)**. Plant tannins. Their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Rev.* 44, 803-815.
- **LIM Y.Y., LIM T.T et TEE J.J. (2007)**. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. 103, 1003-1008.
- **LUTZ-RODER A., SCHNEIDER M., WINTERHALTER P. (2002)**. Isolation of two new ionone glucosides from quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaves. *Nat. Prod. Lett.* 16, 119–122. 10.1080/10575630290020028.
- **MAGALHÃES A.S., SILVA B.M., PEREIRA J.A, ANDRADE P.B, VALENTÃO P, CARVALHO M. (2009)**. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chem Toxicol.* Jun. 47(6):1372-7. doi: 10.1016/j.fct.2009.03.017. Epub Mar 21.
- **MAKKAR H.P., DAWRA R.K et SINGH B. (1991)**. Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *J. Sci. Food Agric.* 54, 513- 519.
- **MAKKAR H.P.S. (2003)**. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research.* 49 : 241-256.

- **MALIK G. (2009)**. Vers la synthèse totale d'ellagitannins c-arylglicosidiques : une approche biomimétrique visant la vascaline, Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, pp 1-343.
- **MANGAN J.L. (1988)**. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr. Res. Rev.* 1 : 209- 231.
- **MARAIS J.P.J., MUELLER-HARVEY I., BRANDT E.V et FERREIRA D. (2000)**. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *J. Agric. Food Chem.* 48, 3440-3447.
- **MARWAT S.K., KHAN M.A., KHAN M.A., AHMAD M., ZAFAR M., FAZAL-UR-REHMAN., SULTANA S. (2009)**. Fruit plant species mentioned in the Holy Qura'n and Ahadith and their ethnomedicinal importance. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5, 284–295.
- **MCINNES A.G., RAGAN M.A., SMITH D.G., WALTER J.A. (1984)**. High-molecular-weight phloroglucinol-based tannins from brown algae: structural variants. *Hydrobiologia.* 116/117:597–602.
- **MCSWEENEY C.S., PALMER B., MCNEILL D.M et KRAUSE D.O. (2001)**. Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology.* 91: 83-93.
- **MINAIYAN M., GHANNADI A., ETEMAD M., MAHZOUNI P. (2012)**. A study of the effects of *Cydonia oblonga* Miller (*Quince*) on TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Res. Pharm. Sci.* 7, 103–110.
- **MUELLER-HARVEY I et MC ALLAN A.B. (1992)**. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* 1, 151-217.
- **MUELLER-HARVEY I. (2001)**. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 3-20.
- **MURIEL COLIN-HENRION. (2008)**. de la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel caractérisation physique et sensorielle des produits transformés 225 : 169.
- **NADKARNI K.M. (1976)**. Indian Materia Medica with Ayurvedic, Unani-tibbi, Siddha, Allopathic, Homeopathic, Naturopathic & Home Remedies, Appendices & Indexes, 3rd Edn. Bombay: Popular Prakashan.
- **NANDI B.K., GOSWAMI A., PURKAIT M.K. (2009)**. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin. *J. Hazard. Mat.* 161, 387–395. 10.1016/j.jhazmat.2008.03.110.

## Références bibliographiques

---

- **NOTOMO H., LIGO M., HAMADA H., KOJJIMA S., ISUDA H. (2004).** Chemoprevention of colorectal cancer by group seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr. Cancer.* 49 (1): 81 – 8.
- **NORTON B.W. (1999).** The significance of tannins in tropical animal production. In: *Tannins in livestock and human nutrition, ACIAR proceedings N.92* (BROOKER, ed.), pp.14-23 Adelaide, Australia.
- **OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y. (1993).** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem*, 33:557-561.
- **OLIVEIRA A.P., PEREIRA J.A., ANDRADE P.B., VALENTAO P., SEABRA R.M., SILVA B.M. (2007).** Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves, *J. Agric. Food Chem.* 55, 7926–7930. 10.1021/jf0711237.
- **OLIVEIRA A.P., COSTA R.M., MAGALHÃES A.S., PEREIRA J.A., CARVALHO M., VALENTÃO P., ANDRADE P.B., SILVA B.M. (2012).** Targeted metabolites and biological activities of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Food Res. Int.* 46, 496–504.
- **ORHAN E., NARDEMIR G., AGAR G., ERCISLI S. (2014).** Genetic variation among quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes sampled from the Coruh valley in Turkey. *Genet Mol Res.* Jan 21; 13(1):445-9.
- **OSMAN A.G., KOUTB M., SAYED A.E.D.H. (2010).** Use of hematological parameters to assess the efficiency of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf extract in alleviation of the effect of ultraviolet-A radiation on African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Photochem. Photobiol. B.* 99, 1–8. 10.1016/j.jphotobiol.2010.01.002.
- **OWEN P L., JOHNS T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol. 64. Pp. 149-160.
- **OZCAN M., HACISEFEROGULLARI H., MARACOGLU T., ARSLAN D. (2005).** Hawthorn (*crataegus spp.*) fruit: some phesical and chemical properties. *Journal of food Enginnering*, 68: 409-413.
- **PAPACHRISTOS D.P., STAMOPOULOS D.C. (2002).** Reppellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oils vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Stored Products Research.* 38: 117-128.
- **PARIS M et HURABIELLE. (1981).** Abrégé de matière médicale. *Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson.* Paris.pp: 102-103-104-107.

- **PERONNY S. (2005)**. La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemurcatta*). Thèse de doctorat, 151p.
- **PLUMLEE K.H., JOHNSON B et GALEY F.D. (1998)**. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10 (3), 263-267.
- **PRAJAPATI N. D., PUROHIT S. S., SHARMA A. K., KUMAR T. (2006)**. A Handbook of Medicinal Plants. *Jodhpur: Agrobios, Section II.* 86.
- **PONCET-LEGRAND C., EDELMANN A., PUTAUX J.L., CARTALADE D., SARNI-MANCHADO P et VERNHET A. (2006)**. Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 20, 687-697.
- **RAGAN M.A., GLOMBITZA K.W. (1986)**. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 4, 129-241.
- **REED J.D. (1995)**. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73, 1516- 1528.
- **RICHELLE M., TAVAZZI I et OFFORD E. (2001)**. Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao, and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3438-3442.
- **RICHTER G. (1993)**. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. *Ed. Presses Polytechniques et Universitaire, Romandes.* Suisse. 526 p.
- **ROBBINS C.T., HANLEY T.A., HAGERMAN E.A., HJELJORD O., BAKER D.L., SCHWARTZ C.C., MAUTZ W.W. (1787)**. Role of tanins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability, *Ecology*, vol. 68(1), 98-107.
- **ROP O., BALIK J., REZNICEK V., JURIKOVA T., SKARDOVA P., SALAS P., et al (2011)**. Chemical characteristics of fruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Miller) cultivars. *Czech J. Food Sci.* 29, 65–73.
- **SAJID S.M., ZUBAIR M., WAQAS M., NAWAZ M., AHMAD Z. (2015)**. A review on quince (*Cydonia oblonga*): a useful medicinal plant. *Global Veterinaria* 14, 517–524.
- **SAUCIER C., JOURDES M., GLORIES Y., QUIDEAU S. (2006)**. Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54, (19), 7349-7354.
- **SCHOFIELD P., MBUGUA D.M., PELL A.N. (2001)**. Analysis of condensed tannins: A review *Animal Feed Sciences and Technical.* 91: 21-40.

## Références bibliographiques

---

- SHARMA R., JOSHI V.K., RANA J. C. (2011). Nutritional composition and processed products of Quince (*Cydonia oblonga* Mill). *Indian J. Nat. Prod. Res.* 2, 354–357.
- SHOLOWALE O.O., OGBULIE N.J., ITOANDON E.E., ORESEGUN M.O., OLATOPE S.O.A. (2013). Phytochemical and antimicrobial evaluation of aqueous and organic extracts of calotropis procera ait leaf and latex. *Niger. Food J.* 31, 77–82.
- SILVA B. M., ANDRADE P. B., MENDES G. C., SEABRA R. M., FERREIRA M. A. (2002B). Study of the organic acids composition of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2313–2317. 10.1021/jf011286.
- SILVA B.M., ANDRADE P.B., GONCALVES A.C., SEABRA R.M., OLIVERIA M.B., FERREIRA M.A. (2004b). Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). *Eur. Food Res. Technol.* 218, 385–389. 10.1007/s00217-003-0845-6.
- SILVA B.M., ANDRADE P.B., VALENTÃO P., FERRERES F., SEABRA R.M., FERREIRA M.A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and Jam: antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* Jul 28; 52(15):4705-12.
- SILVA B.M., ANDRADE P.B., FERRERES F., SEABRA M.R., OLIVEIRA M.B.P.P., MARGARIDA A.F. (2005). Composition of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Nat. Prod. Res.* 19, 275–281. 10.1080/14786410410001714678.
- SIQUEIRA C.F., VASCONCELOS CABRAL D.L., SOBRINHO T.P., CAVALCANTI DE AMORI E.L., MELO J., ARAUJO T., ALBUQUERQUE U.P. (2012). Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. *J. Evid. Based Complement. Alternet. Med.* 1–7.
- SKADHAUGE B., GRUBER M.Y., THOMSEN K.K. et VON WETTSTEIN D. (1997). Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissue. *Am. J. Bot.* 84: 494-503.
- SONG J.H., KIM S.K., CHANG K.W., HAN S.K., YI H.K. et JEON J.G. (2006). *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives Oral Biology.* 51 (12), 1131-1140.
- SOUCI SW., FACHMANN W., KRAUT H (1994). La composition des aliments, Tableaux des valeurs nutritives (5ème édition). *CRC Press, Ed Medpharm.*

## Références bibliographiques

---

- **SPENCER C.M., CAI Y., MARTIN R., GAFFNEY S.H., GOULDING P.N., MAGNOLATO D., LILLEY T.H., HASLAM E. (1988).** Polyphenol complexation – some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27, 2397–2409.
- **STEVANOVIC T., PERRIN D. (2009).** Chimie du bois, 1ère édition, Italie, *presses polytechniques et universitaires romandes*, CH-1015 Lausanne, pp 1-241.
- **TERRILL T.H., ROWAN A.M., DOUGLAS G.B. et BARRY T.N. (1992b).** Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *J. Sci. Food. Agric.* 58, 321-329.
- **TONDI G. (2009).** Développement de résines de polycondensation à base de tanins pour produits industriels écologiques et innovateurs - Mousses rigides et produits de préservation du bois. Thèse, Université Henri Poincaré, Nancy, France.
- **TORKELSON A.R. (1995).** The Cross Name Index to Medicinal Plants. *London: CRC Press.*
- **USMANGHANI K., SAEED A., ALAM M.T. (1997).** Indusynic Medicine. Karachi: University of Karachi Press.
- **WANG X., JIA W., ZHAO A. (2006).** Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine. *Phytother. Res.* 20, 335–341. 10.1002/ptr.1892.
- **WATERMAN P.G. (1999).** The tannins - An overview. In: *Tannins in Livestock and Human Nutrition. Proceedings of an International Workshop*, BROOKER (Ed.), Adelaide, Australia, pp. 10-13.
- **WHITE T. (1957).** Tannins. Their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.* 8, 377-385.
- **WIKIERA A., IRLA M., MIKA M. (2014).** Health-promoting properties of pectin. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. Jan 2;68(0):590-6.
- **WILFRED V et RALPH N. (2006).** Phenolic compound biochemistry Ed Springer .USA. 24p.
- **WOJDYLO A., OSZMIANSKI J., BIELICKI P. (2013).** Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of *Quince* (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2762–2772. 10.1021/jf304969b.
- **WOODWARD, A. et COPPOCK, D.L. (1995).** Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems* 32 (2), 147-161.
- **YAMAGUCHI K., HONDA M., IKIGAI H., HARA Y et SHIMAMURA T. (2002).** Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1). *Antiviral Res.* 53 (1), 19-34.

## ***Références bibliographiques***

---

- **YILDIRIM A., OKTAY M., BILALOGLU V. (2001).** The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk. J. Med. Sci.* 31, 23–27.
  - **YÜKSEL C., MUTAF F., DEMIRTAŞ., ÖZTÜRK G., PEKTAŞ M., ERGÜL A. (2013).** Characterization of Anatolian traditional quince cultivars, based on microsatellite markers. *Genet Mol Res.* Nov 22; 12(4):5880-8.
  - **ZHU J., FILIPPICH L.J. et AL SALAM M. (1992).** Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 53 (3), 280-292.
  - **ZHU M., PHILLIPSON J.D., GREENGRASS P.M., BOWERY N.E., CAI Y. (1997).** Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein. *Phytochem.* 44 : 441-447.
  - **ZIMMER N. et CORDESSE R. (1996).** Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9 (3), 167-179.
- .

Annexe 1

Tableau 1 : matériels, solvants et réactifs utilisés dans ce travail.

Appareillages	Verrerie	Autres	Solvants et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitateur</li> <li>- Autoclave</li> <li>- Bain-marie</li> <li>- Balance de précision</li> <li>- Etuves</li> <li>- Four à moufle</li> <li>- pH-mètre</li> <li>- Réfrigérateur</li> <li>- Spectrophotomètre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Béchers</li> <li>- Boîtes de Pétri</li> <li>- Burettes</li> <li>- Erlenmeyers</li> <li>- Entonnoirs</li> <li>- Eprouvettes</li> <li>- Fioles jaugées</li> <li>- Flacons en verre</li> <li>- Pipettes graduées</li> <li>- Tubes à essaies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anse de platine</li> <li>- Barreaux magnétique</li> <li>- Bec bunsen</li> <li>- Boîtes de pétri</li> <li>- Creusets en porcelaine</li> <li>- Cuves</li> <li>- Disques stériles (papiers Wattman)</li> <li>- Embouts en plastique stériles</li> <li>- Micro pipette</li> <li>- Mortier</li> <li>- Papiers absorbants</li> <li>- Papier aluminium</li> <li>- Papiers filtres</li> <li>- Pince</li> <li>- Pipettes Pasteur</li> <li>- Spatules</li> <li>- Tamis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acétate de sodium</li> <li>- Acétate de zinc</li> <li>- Acide chlorhydrique</li> <li>- Acide gallique</li> <li>- Acide sulfurique</li> <li>- Chlorure d'aluminium</li> <li>- Alcool isobutanol</li> <li>- Ammoniaque</li> <li>- Bicarbonate de sodium</li> <li>- Bisulfite de sodium</li> <li>- Bleu de méthylène</li> <li>- Caséine</li> <li>- Chloroforme</li> <li>- Eau distillée</li> <li>- Eau de javel</li> <li>- Eau physiologique stérile (9g/l)</li> <li>- Ethanol</li> <li>- Ether diéthylique</li> <li>- Chlorure de fer</li> <li>- Hydroxyde de potassium</li> <li>- Hydroxyde de sodium</li> <li>- Magnésium</li> <li>- Méthanol</li> <li>- NaNO<sub>2</sub></li> <li>- Phénophtaléine</li> <li>- Propanol</li> <li>- Réactif de Dragendroff</li> <li>- Réactif de Folin-Ciocalteu</li> </ul>

## **Annexe 2**

### **Protocole de préparation des milieux de culture utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne**

#### **➤ Gélose Sabouraud**

65g de poudre de gélose Sabouraud sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange est agité avec chauffage jusqu'à dissolution complète. La solution ainsi obtenue est répartie dans des flacons propres et ces derniers sont stérilisés à l'autoclave à 121°C.

#### **➤ Gélose de Mueller Hinton**

38g de poudre de gélose MH sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange est agité avec chauffage jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est réparti dans des flacons propres et stérilisés à l'autoclave à 121°C.

Annexe 3 : Résultats des tests de l'analyse phytochimique



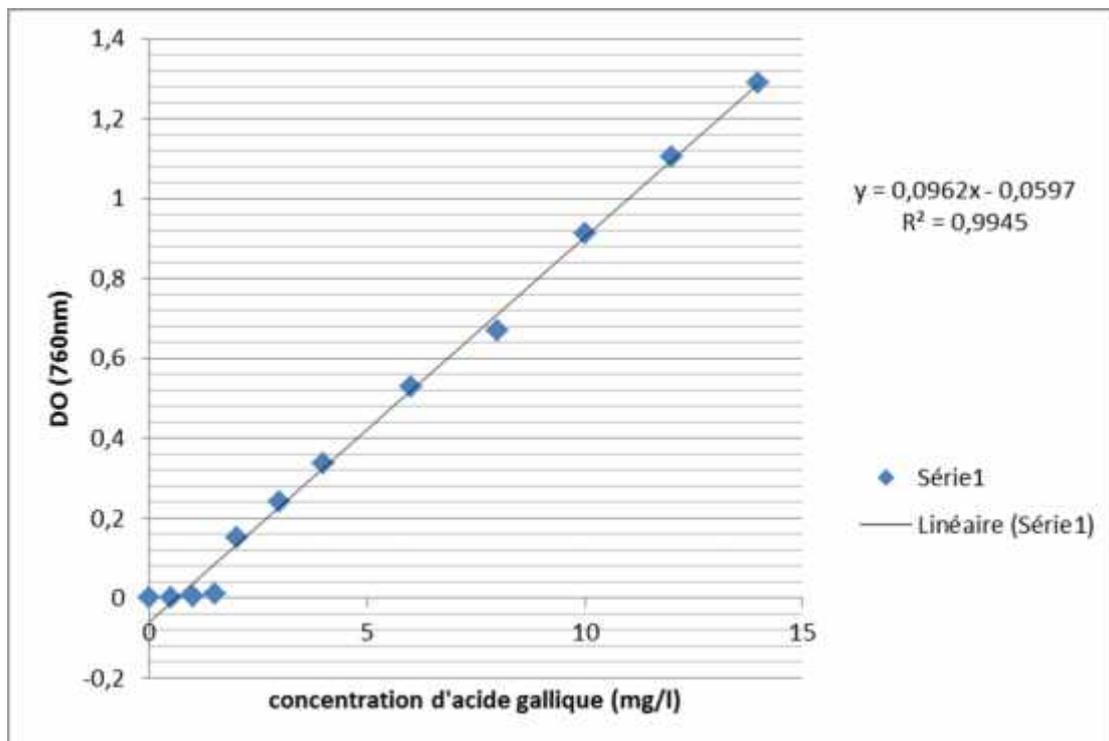
Figure 2 : résultats de l'analyse phytochimique de coing.

## Annexe 4

### Préparation de la gamme d'étalonnage des polyphénols

Dissoudre 200mg d'acide gallique dans 100ml d'éthanol, soit une solution mère (S1) ensuite, réaliser, pour cette dernière, une série de dilution comme suit :

- 1- Ajouter 5ml d'eau distillée à 5ml de la solution mère (S1) pour obtenir la dilution S1/2 ;
- 2- Ajouter 5ml d'eau distillée à 5ml de la solution S1/2 pour obtenir la dilution S1/4 ;
- 3- Procéder de la même manière pour les autres dilutions ;
- 4- A l'abri de la lumière, ajouter à chacune des dilutions réalisées 0,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu ;
- 5- Laisser agir 5min ;
- 6- Ajouter à chacune des solutions 0,5ml de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%) ;
- 7- Incuber à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 1heure ;
- 8- Mesurer l'absorbance à 760nm contre un blanc (sans acide gallique).



**Figure 1** : courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.

Annexe 5

Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Ce dosage a été réalisé suivant la méthode d'AlCl<sub>3</sub>. Les résultats sont exprimés en mg de Quercitine qui est utilisé comme standard par gramme d'extrait en utilisant la courbe ci-dessous :

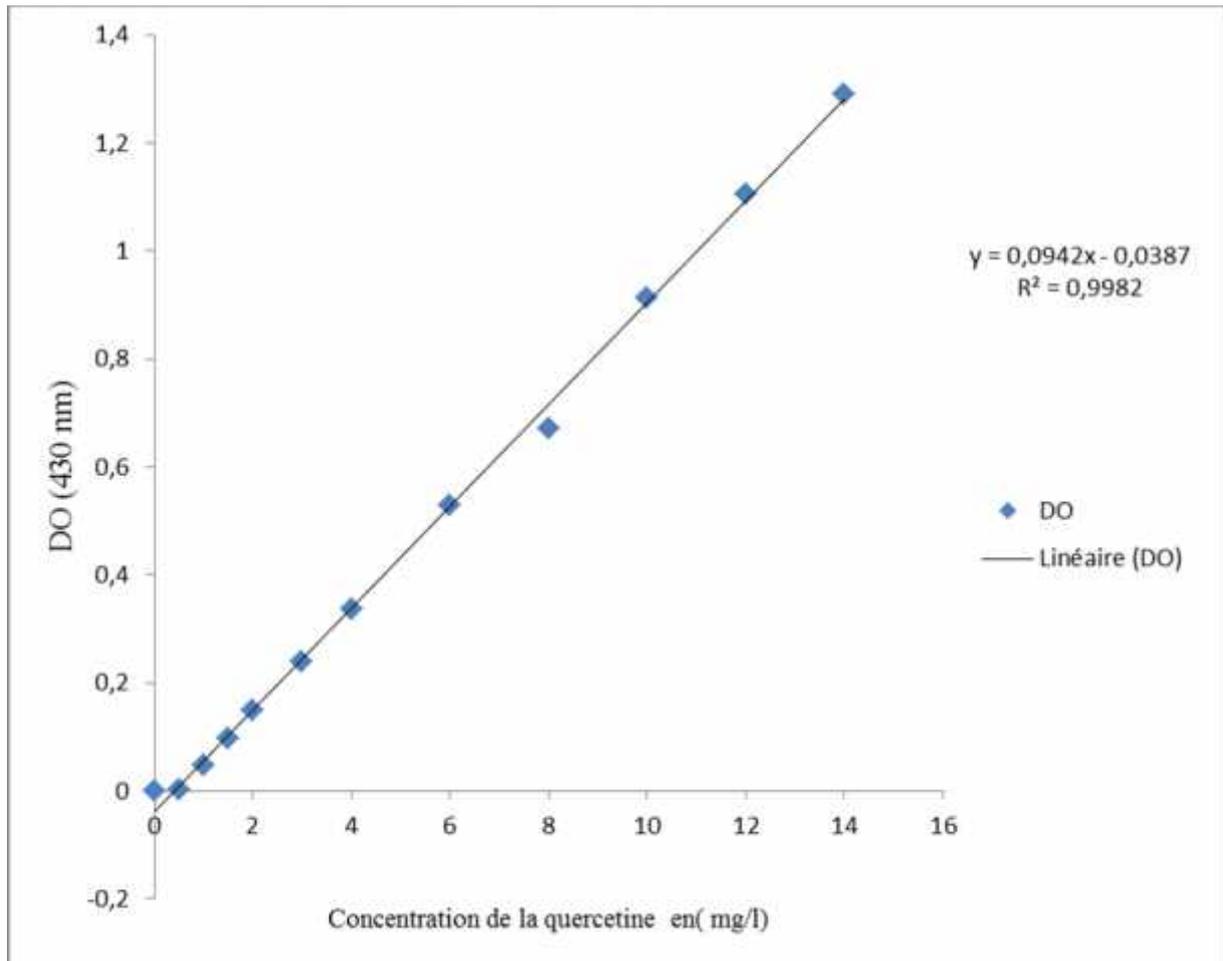


Figure 2 : courbe de dosage des flavonoïdes en équivalent de Quercitine.

**Annexe 6**

**Tableau :** Table de transformation des pourcentages en probits.

<b>%</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>0</b>	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
<b>10</b>	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
<b>20</b>	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
<b>30</b>	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
<b>40</b>	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
<b>50</b>	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
<b>60</b>	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
<b>70</b>	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
<b>80</b>	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
<b>90</b>	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
<b>99</b>	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,75	7,75	7,88	8,09