

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département d'agro-alimentaire

MÉMOIRE DE MAGISTER

En sciences agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA QUALITÉ NUTRITIONNELLE
ET À LA VALORISATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU
FRUIT DE GRENADIER (*Punica granatum* L.), DE LA RÉGION DE
LA MITIDJA

Par

Tarek MOUSSAOUI

Devant le jury composé de :

D. KEBOUR	MCA. U de Blida 1	Présidente
L. BOUTEKRABT	Professeur. U de Blida 1	Promotrice
Z. KACI	MAB. U.M.M. Tizi Ouzou	Invitée
A. DOUMANDJI	MCA. U de Blida 1	Examinatrice
A. BITAM	MCA. ENSA. Alger	Examineur

Blida, Avril 2015

RÉSUMÉ

Un intérêt grandissant a été porté ces dernières années et à toute l'échelle internationale, à la découverte des propriétés thérapeutiques et nutritionnelles de la grenade, Cependant, peu d'études ont été réalisées en Algérie sur les caractéristiques des cultivars locaux de ce fruit.

L'objectif de notre travail est de contribuer à la connaissance de la qualité de trois cultivars locaux et sélectionnés de la grenade, notamment : *Bordj-mira n°11*, *Doux de Messaad* et *Doux de Koléa*, en se basant sur leurs compositions physico-chimiques et biochimiques. Les résultats obtenus indiquent que les trois cultivars étudiés ont des qualités intéressantes, sachant que le jus du cultivar *Bordj-mira n°11* a les teneurs en sucres (16.33 g/100 ml), en polyphénols totaux (0.399 g d'ÉAG/100 ml) et en flavonoïdes (0.0135 g d'ÉQ/100 ml) les plus importantes, il présente également le pouvoir antioxydant le plus puissant (71.43 %). Par ailleurs, les cultivars *Bordj-mira n°11* et de *Doux de Koléa*, sont de nature douce (indices de maturité supérieurs à 25), alors que *Doux de Messaad* est de nature aigre-douce (indice de maturité égal à 18.64).

Les pelures des grenades analysées, sont significativement ($p < 0.001$) plus riches en polyphénols que les jus. L'étude par plan factoriel à deux niveaux, de l'extraction hydro-éthanolique de ces polyphénols, montre que l'eau est un solvant efficace pour l'extraction des polyphénols (teneur en polyphénols totaux extraits égale à 11.1 % contre 8.89 % pour l'extrait éthanolique). Cependant, pour obtenir un extrait à la fois riche en polyphénols et de forte capacité antioxydante, il faut travailler avec des mélanges de solvants (eau et éthanol). La meilleure solution : 9.96 % polyphénols totaux et 80.3 % activité antioxydante, est obtenue par le mélange : eau - éthanol, 16 - 84 % V/V. Par ailleurs, la décoction s'est révélée plus rentable que l'infusion et la macération : teneurs en polyphénols obtenues de 1.6 %, 1 % et 1.33 %, respectivement, mais l'activité antioxydante du décocté (74.47 %) est moins prononcée que celle de l'infusé (77.32 %).

L'étude par plan *historical data* de mélanges, de l'effet antioxydant synergique entre les polyphénols des trois cultivars étudiés, nous a amené à

conclure qu'il existe entre les polyphénols de la grenade, des synergies intra- et inter-variétales, avec des valeurs des effets synergiques comprises entre 1.03 et 1.17. Par ailleurs, la synergie antioxydante dépend des profils polyphénoliques qualitatifs des cultivars.

Mots clés :

Fruit du grenadier – cultivars locaux – qualité nutritionnelle – composés phénoliques – valorisation.

ABSTRACT

Over the past years, significant progress has been made, at the entire world in establishing the nutritional and therapeutic properties of pomegranate fruit. But, in our country few studies were conducted to explore the nutritional properties of local pomegranate varieties.

The aim of the present work is to determine the physico-chemical and biochemical composition of three local pomegranate varieties named: *Bordj-mira n°11*, *Doux de Messaad* and *Doux de Koléa*. The results indicate that three pomegranate varieties have interesting qualities, the *Bordj-mira n°11* pomegranate juice has the highest levels of sugar (16.33 g/100 ml), of total polyphenols (0.399 g AGE/100 ml), of flavonoids (0.0135 g QE/100 ml) and the highest antioxidant activity (71.43 %). The maturity index result indicates that, *Bordj-mira n°11* and *Doux de Koléa* are sweet varieties (maturity index are higher than 25), and *Doux de Messaad* is a sour-sweet variety (maturity index equal to 18.64).

Pomegranate peels have significantly ($p < 0.001$) more polyphenols than juices. The study of peel polyphenol extraction was done by using a two levels full factorial design. The results indicate that water is an efficient solvent to extract peel polyphenols (polyphenols extracted yield equal to 11.1 % versus 8.89 % for ethanolic extract). But in order to obtain at the same time a rich polyphenolic extract with higher antioxidant activities, we have to use a mixture between water and ethanol as extraction solvents. The best solution: 9.96 % of polyphenol extracted yield with 80.3 % antioxidant activity was obtained from extraction by using water - ethanol mixture at 16 - 84 % (v/v), as extraction solvent. In other hand, decoction extraction is revealed more efficient than infusion and maceration extractions: polyphenol extracted yield equal to 1.6 %, 1 % and 1.33 %, respectively. But the antioxidant activity of decoction extract (74.47 %) is less important than that resulted by infusion extraction (77.32 %).

By using *historical data* mixture design to study antioxidant synergistic effects between various polyphenolic extracts of three studied varieties, we have

concluded that synergistic effects exist between polyphenols of the same variety (intra-varietal synergism) and between those obtained from two or three varieties (cross-varietal synergism), where values of synergistic effect was varied within 1.03 to 1.17. We can also see that synergistic effect depend on qualitative polyphenolic profiles that characterize another difference between varieties.

Keys words:

Pomegranate fruit – local varieties – nutritional quality – phenolic compounds – valorisation.

الملخص

تحظى فاكهة الرمان خلال السنوات الأخيرة باهتمام متزايد، من أجل معرفة المزيد عن خصائصها الغذائية والعلاجية اللافتة. وبالرغم من ذلك، قليلة هي الدراسات التي أجريت على أصناف الرمان المزروعة محليا.

نهدف من خلال هذا العمل، إلى معرفة خصائص الجودة لثلاثة أصناف محلية من فاكهة الرمان، زرعت في حقل واحد وسميت على النحو التالي: برج ميرة، حلو مسعد وحلو القليعة.

تبين النتائج المتحصل عليها من خلال التحاليل الفيزيائية والكيميائية للأصناف الثلاثة، أنها تتميز بخصائص مثيرة للاهتمام، علما أن عصير فاكهة برج ميرة هو الذي يحتوي على أكبر قدر من السكريات (16.33%)، من المركبات الفينولية عامة (0.399%) ومن المركبات الفلافونوية (0.0135%). كما أن هذا العصير يتميز بأفضل خاصية مضادة للأكسدة (71.43%). من ناحية أخرى، تم تصنيف برج ميرة وحلو القليعة ضمن الرمان الحلو (معياري النضج يتجاوز 25)، بينما ينتمي صنف حلو مسعد إلى الرمان "الحلو- الحامض"، أو الرمان المز (معياري النضج يساوي 18.64).

تعتبر قشور الرمان مصدرا غنيا جدا بالمركبات الفينولية الفعالة. وعليه تم استعمال طريقة تصميم التجارب لدراسة عملية استخلاص هذه المركبات بأقل تكلفة. تشير النتائج المتحصل عليها من خلال ذلك، أنه يمكن اعتبار الماء وسطا محلا فعالا مقارنة بكحول " الإيثانول" فقط من أجل استخلاص المركبات الفينولية، غير أنه ومن أجل الحصول على مستخلصات غنية بالمركبات الفينولية وذات خصائص مضادة للأكسدة قوية، يجب استخدام وسائط محللة تحتوي على مزيج من الماء والإيثانول. والحل المثالي لذلك هو استخدام مزيج مكون من 84% إيثانول و16% ماء، للحصول على كمية 9.96% من المركبات الفينولية، فعاليتها المضادة للأكسدة تقدر بـ 80.3%. من ناحية أخرى، تعتبر عملية الاستخلاص بواسطة النقع مع الغليان أفضل مقارنة مع النقع من دون غليان، لاستخلاص الكثير من المركبات الفينولية. غير أن ذلك قد ينقص من فعالية هذه المركبات المضادة للأكسدة. ونقترح على ضوء هذه التجارب استخدام عملية النقع في الماء المغلي سابقا وليس في طور الغليان لاستخلاص المركبات الفينولية من قشور الرمان.

باستعمال طريقة تحليل المعطيات التجريبية للخليط، تم اكتشاف تأثيرات إيجابية مشتركة على النشاط المضاد للأكسدة، بين المركبات الفينولية لمختلف الأصناف المدروسة (عصائر وقشور)، وذلك داخل الصنف الواحد أو بين صنفين أو ثلاثة أصناف مختلفة من فاكهة الرمان (تأثيرات إيجابية مشتركة مقدرة من 1.03 إلى 1.17). وتبين أيضا أن هذه التأثيرات المشتركة تخضع للطبيعة الكيميائية للمركبات الفينولية المدروسة.

الكلمات الدالة :

فاكهة الرمان - أصناف محلية - الجودة الغذائية - المركبات الفينولية - التثمين.

REMERCIEMENTS

Au premier lieu, je remercie le bon Dieu qui m'a donnée la patience, la volonté et tous ce qu'il fallait pour pouvoir terminer ce travail.

Mes remerciements les plus distingués et chaleureux vont à ma promotrice, Mme. BOUTEKRABT L, Professeur de l'université de Blida 1, pour la gentillesse, le soutien de toute sorte et l'encouragement, qui m'a accordé. Je tiens Mme à vous présenter mes profondes gratitude pour votre patience pendant les périodes de retard que j'ai fait. Je tiens également à remercier Mme. KACI Z, MAB à l'université de Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou. Merci Mme pour tous les efforts et tous les services que vous m'avais fournie durant ce travail.

Mes sincères remerciements vont également à tous les membres du jury : à la présidente du jury Mme. KEBBOUR D., MCA à l'université de Blida 1, à l'examinatrice Mme. DOUMANDJI A., MCA à l'université de Blida 1, et à l'examineur et mon ancien enseignant de biochimie, Mr. BITAM A., MCA à l'école nationale supérieure d'agronomie d'Alger. Je vous remercie Mr et Mmes d'avoir examiné mon mémoire, et être membres du jury de ma soutenance. « *Vous me faites honneur de juger ce travail et je vous en remercie* ».

Ce travail a été réalisé dans l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne, de Tsselet El merja, Alger. Je voudrais remercier Mr le directeur général de l'institut et Mme RAJI. H, chef de laboratoire agro-alimentaire de l'institut, pour m'avoir accepté ma demande de stage pratique, ainsi que pour le temps étendu qui mon assuré afin de terminer mes expériences pratiques en laboratoire.

Je voudrais ensuite remercier toute l'équipe du laboratoire agro-alimentaire de l'ITAFV, surtout Melle. LAIDOUDI D et Mme. MELLAHI N, que j'ai eu la chance de travailler en collaboration avec elles. Mes remerciements et mes expressions amicales passent aux autres laborantins de l'ITAFV, avec qui j'ai passé de très bons moments.

Je tiens ensuite à remercier Mr. MEHDI, le directeur d'études au sein de l'institut national de formation professionnelle en industrie agro-alimentaire, de Blida.

Mes remerciements chaleureux à mes camarades de promotion en particulier BOUCHEKIOUA H, KECHACHA I et BOUZAR A.C.

Et la famille, la dernière citée mais celle qui a le plus de place dans mon cœur. Je sais que ce mémoire ne serait pas terminé sans vous. Je vous remercie pour le soutien durant les moments difficiles.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien involontairement, merci !

Je dédie ce modeste travail, à toute ma famille

À mes ami(e)s les proches ainsi que les loins

À titre d'un document éducatif, je dédie ce mémoire

À l'ensemble des étudiants de la filière agro-alimentaire.....

Tarek

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.	
REMERCIEMENTS.	
TABLES DES MATIÈRES.	
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX.	
INTRODUCTION.	6
1. GÉNÉRALITÉS SUR L'ESPÈCE GRENADIER (<i>Punica granatum</i> L.) ET SON FRUIT, LA GRENADE.	9
1.1. Étymologie et historique de (<i>Punica granatum</i> L.).	9
1.2. Caractéristiques botaniques de (<i>Punica granatum</i> L.).	10
1.3. Récolte et conservation des grenades.	23
1.4. Utilisations alimentaires de la grenade.	25
1.5. Production de la grenade dans le monde et en Algérie.	25
2. LA GRENADE UN ALIMENT-SANTÉ, SA COMPOSITION, SA VALEUR NUTRITIONNELLE ET SES EFFETS SANITAIRES.	26
2.1. Composition physico-chimique de la grenade.	26
2.2. Composition et valeur nutritionnelle de la grenade.	27
2.3. Composés phénoliques de la grenade.	29
2.4. Principales données scientifiques sur l'efficacité nutritionnelle de la grenade.	36
2.5. Travaux pour la valorisation des polyphénols de grenade.	44
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.	46
3.1. Problématique.	46
3.2. Matériel.	48
3.3. Méthodes d'analyses.	49
3.3.1. Caractérisation physico-chimique et biochimique de la pulpe des grenades.	49
3.3.2. Extraction et caractérisation des jus.	51
3.3.3. Analyses des composés phénoliques des jus.	58
3.3.4. Analyses de l'activité antioxydante des jus.	64
3.3.5. Valorisation des pelures des grenades (co-produit) par l'extraction des polyphénols.	69
3.3.6. Valorisation des polyphénols de la pelure par analyse des éventuels effets antioxydants synergique entre les extraits.	80
3.3.7. Analyses statistiques.	84
4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.	85

4.1.	Composition physico-chimique et biochimique des grenades.	85
4.2.	Composition physico-chimique et biochimique des jus.	89
4.3.	Corrélations entre les caractéristiques étudiées	106
4.4.	Extraction des polyphénols de la pelure.	110
4.5.	Étude de l'effet antioxydant synergique par plan de mélange.	131
	CONCLUSION.	149
	APPENDICES.	
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Photographie de la grenade et ses nombreux grains.	9
Figure 1.2	Aspects des fleurs (A), des baies (B) et des arilles (C) du grenadier commun ou (<i>Punica granatum</i> L.).	11
Figure 1.3	Stades de développement des fruits.	15
Figure 1.4	Évolution des teneurs en acidité titrable (A) et en sucres totaux (B) des arilles, durant le développement et la maturation de la grenade.	17
Figure 1.5	Représentation schématique des mécanismes de la maturation d'un fruit climactérique.	19
Figure 1.6	Variation de la teneur en protéines des arilles de la grenade durant la maturation.	22
Figure 1.7	Variation des polyphénols totaux et de la capacité antioxydante de jus de grenade durant la maturation.	22
Figure 1.8	Variation de la teneur en anthocyanines de jus de la grenade durant la maturation.	23
Figure 2.1	Photographie des arilles de la grenade.	26
Figure 2.2	Classification des quelques métabolites secondaires.	30
Figure 2.3	Les indole-amines de la grenade.	32
Figure 2.4	Exemples de stérols de la grenade.	33
Figure 2.5	Terpènes de la grenade.	33
Figure 2.6	Structure de quelques anthocyanines de jus de grenade.	33
Figure 2.7	Structure de quelques flavonoïdes de la grenade.	34
Figure 2.8	Structures de quelques acides phénoliques et de tannins ellagiques de la grenade.	35
Figure 2.9	Structure de l'acide punicoïque des pépins de la grenade.	36
Figure 2.10	Origines et cibles des ROS.	38
Figure 2.11	Action des antioxydants au cours du métabolisme des ROS.	39
Figure 2.12	Comparaison de la teneur en polyphénols et de l'activité antioxydante, entre le jus de grenade et d'autres boissons.	40
Figure 2.13	Mécanismes d'actions de la grenade sur les maladies cardiovasculaires.	42

Figure 2.14	Photographie de la plaque d'athérome chez des souris complémentées en jus de grenade et autres non complémentées.	42
Figure 3.1	Schéma représentant les deux sections de notre étude.	47
Figure 3.2	Carte de la région de Mitidja de la wilaya de Blida.	48
Figure 3.3	Les dérivés furanes formés par déshydratation des sucres.	54
Figure 3.4	Interaction des ions Cu ⁺⁺ avec les liaisons peptidiques.	56
Figure 3.5	Acides aminés à noyaux phénoliques réagissant avec le réactif du Folin-Ciocalteu.	56
Figure 3.6	Réaction chimique entre l'acide L-ascorbique et l'indicateur coloré DCIP.	57
Figure 3.7	Exemples de tannins hydrolysables.	60
Figure 3.8	Réaction entre les galloyl-esters des tannins hydrolysables et l'iodate de potassium.	60
Figure 3.9	Structure de l'acide tannique.	61
Figure 3.10	Réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH.	67
Figure 3.11	Schématisation des étapes de l'extraction solide-liquide.	70
Figure 3.12	Domaine de variation du facteur.	74
Figure 3.13	Représentation géométrique du domaine expérimental d'un plan factoriel complet à deux niveaux.	75
Figure 3.14	Critères utilisés pour choisir <i>à priori</i> le bon solvant.	78
Figure 4.1	Comparaison des poids moyens et des rendements en pulpes des trois cultivars.	87
Figure 4.2	Comparaison entre la teneur en PPT des jus et des pelures.	97
Figure 4.3	Comparaison entre l'activité anti-radicalaire des jus et des extraits des pelures.	102
Figure 4.4	Cibles et actions des radicaux libres dans la cellule.	104
Figure 4.5	Schéma du transfert d'électron et d'hydrogène et de stabilisation du noyau phénolique.	104
Figure 4.6	Tracé de probabilité pour la réponse PPT.	112
Figure 4.7	Diagramme de Pareto de la réponse PPT.	113
Figure 4.8	Tracé des valeurs PPT prédites en fonction des valeurs actuelles.	113
Figure 4.9	Représentation de l'effet du temps d'extraction sur les PPT.	114
Figure 4.10	Représentation de l'effet de l'hydromodule sur les PPT.	115

Figure 4.11	Représentation de l'effet de la concentration de l'éthanol dans le solvant sur PPT.	115
Figure 4.12	Effets comparés du temps d'extraction entre une extraction aqueuse et éthanolique.	116
Figure 4.13	Surface de réponses PPT en fonction du temps d'extraction et de l'hydromodule (interaction AB).	117
Figure 4.14	Représentations des réponses PPT en fonction de la concentration en éthanol et d'hydromodule (interaction BC).	118
Figure 4.15	Représentations des PPT en fonction du temps d'extraction et de la concentration de l'éthanol (interaction AC).	120
Figure 4.16	Tracé de probabilité pour la réponse AA.	122
Figure 4.17	Diagramme de Pareto pour la réponse AA.	123
Figure 4.18	Tracé des réponses AA prédites en fonction des réponses actuelles.	123
Figure 4.19	Effet de l'hydromodule (B) sur AA.	124
Figure 4.20	Effet du temps d'extraction sur la réponse AA.	125
Figure 4.21	Variation de l'effet de l'éthanol sur AA en fonction de l'hydromodule.	125
Figure 4.22	Courbes d'isoréponses et de surface de réponses de AA en fonction de l'hydromodule et de la concentration en éthanol.	126
Figure 4.23	Comparaison des effets de l'éthanol sur AA en fonction de l'hydromodule et du temps d'extraction.	127
Figure 4.24	Corrélation entre PPT et AA.	129
Figure 4.25	Effet synergique du cultivar BM.	132
Figure 4.26	Effets synergiques du cultivar DM.	132
Figure 4.27	Effets antagonistes du cultivar DK.	133
Figure 4.28	Tracé des réponses ME prédites en fonction de celles actuelles.	138
Figure 4.29	Structures générales des acides hydroxybenzoïques (A) et des acides hydroxycinnamiques (B).	140
Figure 4.30	Structure générale des flavonoïdes.	141
Figure 4.31	Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.	141
Figure 4.32	Structure de la quercétine.	142
Figure 4.33	Courbe du mélange binaire (AD).	143

Figure 4.34	Courbe du mélange binaire (BE).	143
Figure 4.35	Courbe isoréponses du mélange (BE).	144
Figure 4.36	Courbe isoréponses du mélange (AD).	145
Figure 4.37	Courbe isoréponses du mélange (BD).	146
Figure 4.38	Courbe isoréponses du mélange (CD).	146
Figure 4.39	Courbe isoréponses du mélange binaire de jus (BM et DM).	147
Tableau 1.1	Classification botanique de (<i>Punica granatum</i> L.), établie par Linné en 1753.	10
Tableau 1.2	Classification des variétés de la grenade selon l'indice de maturité.	12
Tableau 1.3	Tableau récapitulatif de quelques variétés de grenade.	13
Tableau 1.4	Liste des variétés algériennes du grenadier, autorisées à la commercialisation.	13
Tableau 1.5	Évolution des principaux constituants physiques de la grenade durant la maturation.	21
Tableau 2.1	Variabilité de la composition physico-chimique des grenades.	27
Tableau 2.2	Composition et valeur nutritionnelle de la grenade.	28
Tableau 2.3	Composition nutritionnelle de jus de grenade frais.	29
Tableau 2.4	Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme.	32
Tableau 2.5	Concentration et demi-vie des principaux ROS.	37
Tableau 2.6	Travaux de valorisation des polyphénols de la grenade.	44
Tableau 3.1	Description des facteurs numérique ou continus étudiés.	78
Tableau 3.2	Matrice d'expériences du plan factoriel complet à deux niveaux.	80
Tableau 3.3	Points de distinction entre la méthode de Peyrat-Maillart <i>et al</i> et notre méthode pour la détermination du (ME).	81
Tableau 3.4	Matrice d'expériences du plan de mélange historical data.	84
Tableau 4.1	Classification de caractéristiques étudiées en rapport avec la qualité d'un cultivar.	86
Tableau 4.2	Caractéristiques pomologiques des trois cultivars.	86

Tableau 4.3	Teneurs en eau et en cendres des trois cultivars.	88
Tableau 4.4	Rendements en jus des trois cultivars.	89
Tableau 4.5	Taux des solides solubles, de l'acidité titrables et les pH des jus.	90
Tableau 4.6	Classification des trois cultivars en fonction de l'indice de maturité.	91
Tableau 4.7	Teneurs en sucres totaux des jus étudiés.	92
Tableau 4.8	Teneurs des jus en protéines.	94
Tableau 4.9	Teneurs en vitamine C des jus étudiés.	94
Tableau 4.10	Teneurs en polyphénols totaux des trois cultivars.	96
Tableau 4.11	Teneurs en flavonoïdes des trois cultivars.	98
Tableau 4.12	Teneurs en tannins hydrolysables des trois cultivars.	99
Tableau 4.13	Teneurs en anthocyanines des trois cultivars.	100
Tableau 4.14	Activités anti-radicalaires des trois cultivars.	101
Tableau 4.15	Pouvoir réducteur des trois cultivars.	103
Tableau 4.16	Table de composition des trois cultivars.	105
Tableau 4.17	Matrice des corrélations entre les caractéristiques des jus.	107
Tableau 4.18	Matrice des corrélations entre les caractéristiques de la pelure.	108
Tableau 4.19	Matrice des corrélations entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des grenades étudiées.	109
Tableau 4.20	Table de l'ANOVA pour la réponse (PPT).	110
Tableau 4.21	Critères d'ajustement du modèle postulé pour la réponse PPT.	112
Tableau 4.22	Table de l'ANOVA de la réponse AA.	121
Tableau 4.23	Critères d'ajustement du modèle postulé pour AA.	121
Tableau 4.24	Solutions optimales choisies.	130
Tableau 4.25	Comparaison entre valeurs prédites et valeurs expérimentales.	130
Tableau 4.26	Comparaison entre la macération, la décoction et l'infusion aqueuses des pelures de la grenade.	131
Tableau 4.27	Valeurs de (ME) des mélanges des extraits des pelures.	134
Tableau 4.28	Matrice d'expériences du plan de mélange historical data.	136
Tableau 4.29	Table de l'ANOVA de la réponse ME.	136
Tableau 4.30	Critères d'ajustement du modèle quadratique.	137
Tableau 4.31	Coefficients des corrélations entre les six constituants et la réponse ME.	139
Tableau 4.32	Solutions optimales de l'effet synergique.	148
Tableau 4.33	Comparaison entre les valeurs prédites et expérimentales de (ME).	148

INTRODUCTION

Dans l'histoire de l'humanité, le lien entre alimentation et santé, est reconnu depuis très longtemps, puisque les anciens médecins avaient l'habitude de traiter leurs patients avec des herbes et des aliments, soupçonnés d'avoir des propriétés médicinales. Ces dernières années, la consommation d'aliments végétaux a fait l'objet d'un regain d'intérêt, et nous observons à l'heure actuelle, qu'une image positive est en train d'évoluer, dans l'esprit du consommateur, à l'égard des bienfaits sanitaires de cette catégorie d'aliments.

Ce phénomène social est certainement lié, grâce aux progrès scientifiques, à la prise de conscience quant à la relation entre la qualité nutritionnelle des aliments d'origine végétale et la santé de l'homme. En effet, dans une revue scientifique récente, concernant l'association entre la consommation de fruits et légumes et le risque de quelques maladies chroniques, il s'est montré clairement que, la consommation régulière des fruits et légumes favorise l'amélioration de l'état de santé. Il existe à ce titre, une évidence convaincante sur le lien entre l'augmentation des apports journaliers en fruits et légumes, et la diminution des risques de l'hypertension, des maladies cardiovasculaires et de l'arrêt cérébral ; une évidence possible quant à la prévention de la prise de poids et une évidence probable que le risque du cancer soit en général inversement lié à la consommation de fruits et légumes. Cela confirme l'utilité de cette approche nutritionnelle en tant qu'une stratégie pour l'amélioration de la santé publique [1].

Les bienfaits santé ainsi constatées, ne sont pas attribués uniquement aux éléments nutritifs majeurs, dont glucides, lipides, protéines, eau, vitamines et minéraux, mais également aux composés mineurs dits « bioactifs », tels que les polyphénols qui sont doués d'activités biologiques et thérapeutiques diverses [2]. Par ailleurs, les polyphénols ou « composés phénoliques » qui constituent le principe actif de plusieurs plantes médicinales [3], sont retrouvés dans la plupart des organes végétaux consommés d'habitude par l'homme : dans les grains (café, cacao, riz, soja, etc.), dans les fruits (grenade, raisin, olive, etc.), dans les feuilles

(thé, nombreuses épices, etc.) et dans d'autres organes comme les bulbes de l'oignon et les tubercules de la patate douce [2]. De ce fait, ce sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation [4].

La grenade est l'un des aliments les plus riches en antioxydants phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques et tannins hydrolysables), qui assurent la neutralisation des radicaux libres et la protection de l'organisme des maladies sévères, comme les maladies cardio-vasculaires et le cancer [5]. Par ailleurs, le jus de grenade a le potentiel antioxydant le plus élevé comparativement à d'autres types de boissons riches en polyphénols, notamment le vin rouge et le thé vert [6,7]. À cause de leurs bienfaits sur la santé, l'exploitation commerciale de la grenade et des produits dérivés, a connue une croissance remarquable, surtout durant ces dix dernières années [5].

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est devenu ces dernières années une culture fruitière de haute valeur, suite à une demande accrue par les consommateurs [8] ; et malgré qu'elle soit peu exigeante, cette culture n'est pas très développée en Algérie, devant d'autres grandes cultures fruitières telle que, l'olivier, la vigne, le figuier, les agrumes et le palmier dattier [9,10]. De nombreuses variétés de grenade, de qualités très différentes, sont cultivées dans notre pays, mais on ne connaît que leurs appellations locales (*Lahlou, Elmouze, etc.*)[9]. Nous manquons alors de connaissances sur les caractéristiques nutritionnelles de nos variétés dites autochtones, comparativement aux autres pays producteurs.

C'est dans un vaste concept, de caractérisation et de valorisation de nos ressources agricoles, dans le domaine de « nutrition et transformation des aliments », que s'inscrit notre travail. Pour cela et après une synthèse bibliographique, des aspects botaniques du grenadier, nutritionnels et thérapeutiques de la grenade. Nos efforts ont porté sur l'étude expérimentale des polyphénols et de la qualité nutritionnelle de la grenade, en réalisant :

- La caractérisation physico-chimique et biochimique de trois cultivars autochtones du fruit de grenadier, cultivés ensemble dans un seul verger, et qui ont bénéficiés des travaux d'identification préalables ;

- L'étude de l'extraction par solvants des polyphénols des pelures du fruit, en utilisant les plans d'expériences ;
- L'évaluation de l'effet antioxydant synergique entre les polyphénols du fruit.

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS SUR L'ESPÈCE GRENADIER (*Punica granatum* L.) ET SON FRUIT, LA GRENADE

1.1. Étymologie et historique de (*Punica granatum* L.)

Le grenadier est un petit arbre fruitier ou arbuste appartenant à la famille des Punicacés, qui comprend trois espèces différentes : *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*, cette dernière est l'espèce la plus commune [11]. Le grenadier est originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de manière spontanée depuis plus de 4000 ans [12]; il s'est ensuite cultivé dans la région méditerranéenne et dans les zones tempérées et chaudes de tous les continents : comme le Proche orient, la Chine, l'Inde, le Chili, l'Argentine, l'Afrique tropicale et aux Etats-Unis, surtout au niveau des zones arides de la Californie et d'Arizona [13].

Le nom du genre, *Punica*, a été donné par les romains à la ville de Carthage, où poussaient les meilleurs grenadiers [12] ; la grenade par ailleurs porte le nom de *pomme punique*, ou pomme de Carthage. Aussi, la grenade porte quelquefois les noms suivants : *pomme vénitienne*, *pomme grenade*, *balauste*, *miougane* et *granate*. Le nom *granatum*, issue du latin *granatus*, fait référence à la multiplicité des grains contenus dans le fruit [11] (figure 1.1).

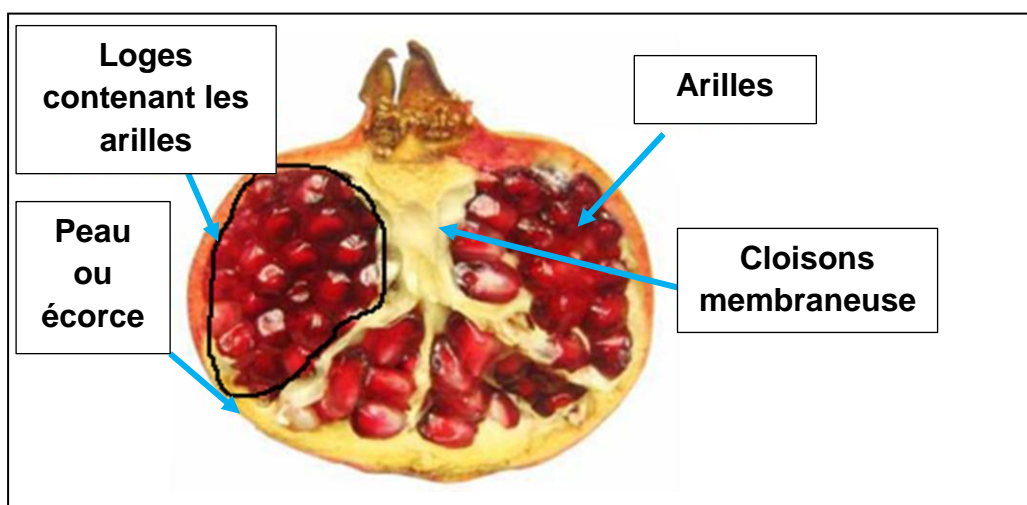


Figure 1.1 : Photographie de la grenade et ses nombreux grains [11]

Utilisé en médecine, de manière traditionnelle et empirique, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires, le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, sur les plans médical, cosmétologique et alimentaire [11]. En effet et durant cette dernière décennie, plusieurs études sur les propriétés antioxydantes, anti-cancéreuses, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antidiabétiques et d'autres, des constituants phytochimiques du grenadier, ont été publiées, en mettant le point sur la possibilité d'usage de ces constituants dans le traitement et/ou la prévention des maladies telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'hypertension, le diabète, les infections bactériennes et bien d'autres [14,15,16].

1.2. Caractéristiques botaniques de (*Punica granatum* L.)

1.2.1. Place dans la systématique

En 1753, le grenadier (*Punica granatum* L.), a été classé par Carl von Linné¹ (1707-1778) comme suit [11] :

Tableau 1.1 : Classification botanique de (*Punica granatum* L.), établie par Linné en 1753 [11].

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i>

Depuis cette classification, d'autres classements taxonomiques du genre *Punica* ont été proposés, dans lesquels une confusion existe concernant le classement de ce genre soit dans la famille des Punicaceae, des Lythraceae ou des Myrtaceae [17].

1. Carl von Linné : le naturaliste suédois qu'a établie le système de la nomenclature binomiale des espèces.

Plus tard en 2003, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, a été établie par le groupe AGP (*Angiosperm Phylogeny Group*), et révisée en 2009, en donnant naissance à la classification AGP III qui situe finalement le grenadier (*Punica granatum* L.) dans la famille des Lythracées qui comporte 30 genres et 600 espèces [11,17].

1.2.2. Anatomie

Le grenadier est un petit arbre ou arbuste, qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs mesurant 3 cm de diamètre, sont de couleur rouge, pourpre ou grenat, d'aspect froissé et portées par un court pédoncule. Elles se trouvent soit, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches (figure 1.2 A) ; leur ouverture se fait de mai à juillet [18].

Le fruit du grenadier, appelé la grenade, est une baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'une orange, elle mesure entre 2 et 12 cm de diamètre. C'est un fruit très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau de teinte blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge (figure 1.2 B). La baie de grenade renferme de nombreuses graines ou arilles (environ 600), contenues dans des loges et séparées par des cloisons membraneuses (figure 1.1). Toutes ces graines de couleur rouge et de teinte variable (figure 1.2 C), possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit. L'épicarpe ou l'écorce du fruit est de consistance dure et de saveur amère et astringente [18,11,12].

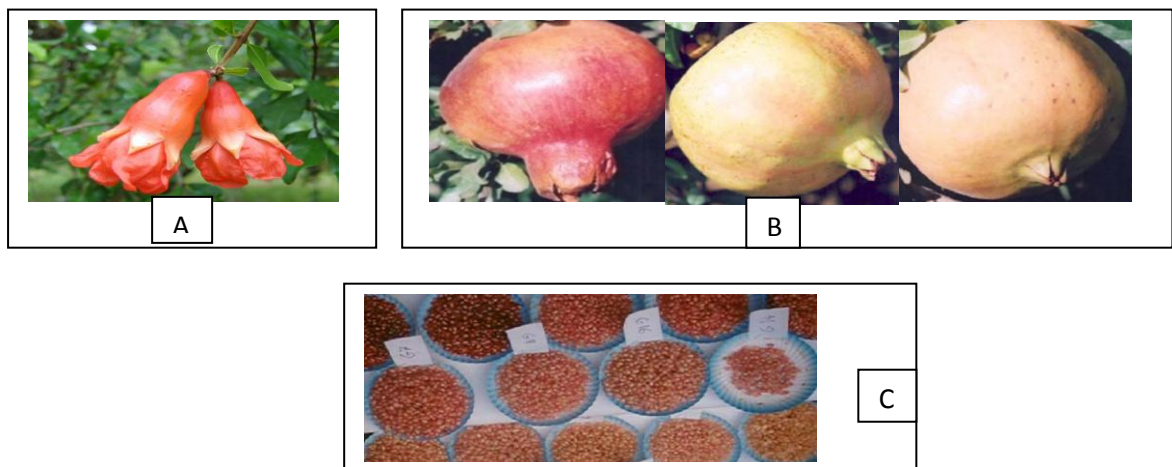


Figure 1.2 : Aspects des fleurs (A), des baies (B) et des arilles (C) du grenadier commun ou (*Punica granatum* L.). (A) d'après Wald. (2009) [11] ;(B) et (C) d'après Oukabli *et al.* (2003) [18].

1.2.3. Variétés du grenadier commun (*Punica granatum* L.)

D'après Wald. (2009) [11], le grenadier commun est cultivé pour ses gros fruits comestibles. Il existe toutefois des grenadiers dépourvus de fruits, utilisés dans la décoration des jardins, car ils possèdent de très belles fleurs colorées et d'une grande valeur ornementale. Parmi ces dernières variétés du grenadier, on distingue les grenadiers à fleurs simples, à fleurs doubles et les grenadiers nains ou (*Punica nana* L.), qui donnent des fleurs de couleurs rouges, jaunes ou blanches [19].

Les variétés du fruit, sont classés selon l'acidité de la pulpe, en deux grands groupes : les grenades présentant des arilles douces, destinées à la consommation en frais et sont mieux appréciées lorsque les pépins ou situés à l'intérieur des arilles, sont de texture tendre ; et les grenades acides avec des grains généralement durs, servent généralement à la transformation industrielle [18].

Dans les publications des travaux récents, sur les caractéristiques physico-chimiques des grenades, une classification plus précise est adoptée, dans laquelle les variétés des grenades sont classées en trois catégories (tableau 1.2), en fonction du rapport du taux des solides solubles (TSS) sur le taux d'acidité titrable de la pulpe [TSS/AT]. Ce rapport distinctif a été appelé, indice de maturité [20,21,22].

Tableau 1.2 : Classification des variétés de la grenade selon l'indice de maturité [21].

Variété	Indice de maturité (IM)
Variété douce	IM entre 31 et 98
Variété aigre-douce	IM entre 17 et 24
Variété aigre	IM entre 5 et 7

Parmi les cultivars de la grenade les plus communs dans le monde, Caliskan et Bayazit. (2012) [23] distinguent : '*Hicaznar*' en Turquie, '*Malas Yazdi*' en Iran, '*Bagua*' en Inde, '*Manafaluty*' en Egypte, '*Mollar de Elche*' en Espagne et '*Wonderful*' aux États-Unis.

Dans le tableau ci-après, l'auteur a rassemblé quelques variétés de la grenade et ses caractéristiques (nom de la variété, sa date de maturité, sa qualité gustative et l'aspect externe des fruits et des arilles), dans une liste non exhaustive.

Tableau 1.3 : Tableau récapitulatif de quelques variétés de grenade [11].

Zone géographique	Variétés	Maturation des fruits	Aspects des fruits	Graines ou arilles	Qualités gustatives
Espagne	<i>Blanca</i>	Septembre/octobre	Peau lisse	roses	Pulpe juteuse et sucré
Tunisie	<i>Zéri</i>	Août/septembre	Peau ferme et rouge	Très petites et rouges	Bonne et très juteuse
Grèce	<i>Douce de Patras</i>	Août/septembre	Peau colorée	Petites, rouges et très acides	Excellente
Turquie	<i>Ak Anar</i>	Septembre	Peau épaisse, jaune blanc	Assez grosses et pâles	Très rustiques
USA	<i>Wonderfull</i>	Août/septembre	rouge rosâtre	Rouges	Très bonne et rustique

En Algérie, dans le deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques en 2006, une liste de 14 variétés du grenadier autorisées à la commercialisation a été publiée. On la retrouve dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Liste des variétés algériennes du grenadier, autorisés à la commercialisation (Anonyme, 2006) [9].

<i>Espagne rouge</i>	<i>Zemdautomne</i>
<i>Corda travita</i>	<i>Sulfani</i>
<i>Moller huesso</i>	<i>Spanish duoy</i>
<i>Mellisse</i>	<i>Selection station</i>
<i>Papers shell</i>	<i>Chelfi</i>
<i>Gajin</i>	<i>Doux de koléa</i>
<i>Sefri</i>	<i>Messaad</i>

1.2.4. Biologie

La grenade est le fruit du petit arbre ou arbuste (*Punica granatum* L.), contenant un nombre de chromosomes variable selon les variétés : il est de $2n = 16$ pour les variétés à fruits, et $2n = 18$ pour les variétés ornementales [19,17].

1.2.4.1. Exigences de culture et éléments de biologie florale

La culture du grenadier est relativement facile à conduire, en matière de taille (élimination du bois chevauchant et mort), de fertilisation et de traitements phytosanitaires. Elle présente aussi des rendements appréciables : en verger adulte, les rendements peuvent être situés entre 40 et 50 Kg de fruits/arbre, soit 20 à 30 tonne de fruits/ha [18].

Le grenadier est une espèce tolérante au calcaire et à la salinité ; sa tolérance à la sécheresse est toutefois relative, mais ça au détriment de sa croissance végétative et de sa fructification. Concernant la qualité du sol, les meilleurs comportements de plantations sont obtenus dans des sols à disponibilité satisfaisante en eau (par exemple, aux bords des courants d'eau). Outre, les sols argilo-limoneux irrigués conviennent aussi à cette culture. En terme de climat, le grenadier est capable de supporter des températures extrêmes allant de -10 °C à 45 °C ; il craint toutefois les hautes altitudes hautement froides [18].

Bien que le grenadier soit originaire de l'Asie centrale, leur distribution géographique depuis son origine à travers le monde, reflète son adaptation aux conditions climatiques diverses [24].

Le grenadier est une espèce monoïque, il développe alors sur le même arbre, deux types de fleurs : des fleurs mâles stériles, en forme de « cloche » et dotées de styles courts ; et des fleurs hermaphrodites fertiles en forme de « vase ». Toutefois, la dominance revient généralement aux fleurs mâles avec un taux compris entre 60 et 70 % [18].

La période de floraison est variable en fonction des variétés et des conditions agro-climatiques [24]. Il s'agit d'une floraison très échelonnée, car elle s'étale à une durée de 8 à 10 semaines. La première vague de floraison donne le meilleur taux de nouaison (90 %) avec des fruits de bonne qualité, et moins susceptibles à

l'éclatement. De plus, le calibre des fruits à la récolte, diminue au fur et à mesure que la date d'apparition des fleurs est tardive [25].

En outre, les fleurs du grenadier sont soit auto-pollinisées ou inter-pollinisées, majoritairement par le biais des abeilles. Mais l'inter-pollinisation est le processus qui donne les meilleurs taux de fructification [24].

1.2.4.2. Croissance, maturation des grenades et facteurs influents

A. Croissance

Après la nouaison (la naissance du fruit) et avant la maturation, la croissance des fruits est généralement marquée par deux phases consécutives, une première phase d'intense multiplication cellulaire (c'est la phase de multiplication), avec différenciation des tissus et accumulation de métabolites tels que les polyphénols et les acides organiques. Cette phase peut durer de 2 à 8 semaines, tout dépend des espèces et des variétés. La deuxième phase, est de croissance et d'élongation cellulaire (c'est la phase de croissance), durant laquelle, l'accumulation des sucres (amidon et/ou sucres simples), et la synthèse de composés pariétaux se produisent [26].

Une illustration graphique des stades de développement des fruits, est représentée par la figure 1.3.

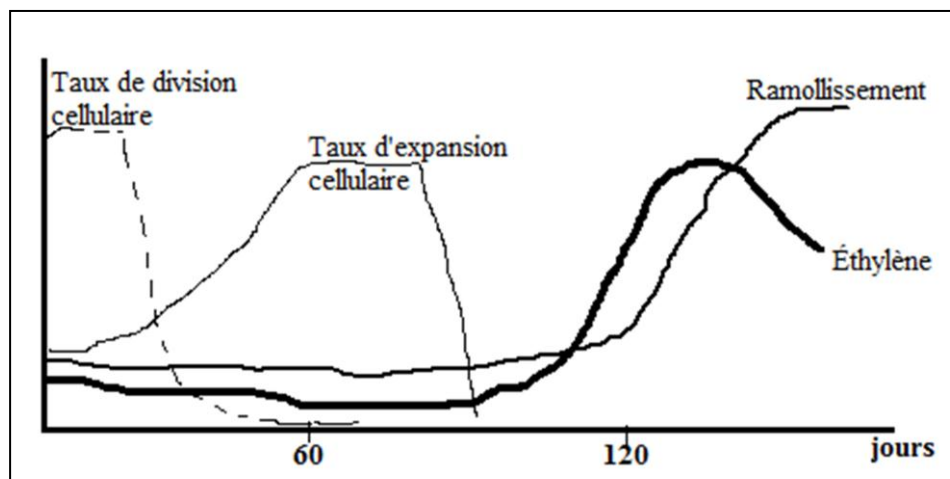


Figure 1.3 : Stades de développement des fruits [26]

La multiplication cellulaire se produit précocement, et elle permet au fruit d'acquérir son nombre définitif de cellules. Cette phase est influencée par plusieurs facteurs, comme l'alimentation hydrique et carbonée du fruit, et ainsi par la température. En aval de cette phase, le fruit est considéré comme une

collection de cellules en croissance, les cellules croissent ainsi en taille et en volume [27].

L'augmentation du volume des cellules, résulte de la pression interne, dite de turgescence, qui est en fonction de la capacité d'approvisionnement des cellules en eau et en carbone. En effet, les variations du volume de fruit résultent du bilan entre les entrées d'eau et de carbone par le xylème et le phloème, et les sorties d'eau par transpiration et respiration. En outre, le flux de transpiration, dépend de la perméabilité de l'épiderme du fruit, qui est sous influence, des facteurs environnementaux, tels que le stress salin, et du facteur de variabilité génétique. Ce dernier facteur entraîne des larges différences dans la sensibilité des fruits à la transpiration, ce qui influe par conséquent, sur la croissance et l'élaboration de la teneur en matière sèche des fruits [27].

Si on représente la croissance des grenades de la nouaison à la maturation, sous forme d'une courbe, on observe dans cette courbe (figure 1.3) des périodes de croissance rapides, alternées par d'autres périodes de croissances lentes. Les périodes initiales correspondent à la division cellulaire et à l'augmentation du volume des graines, après laquelle la croissance des graines s'arrête et celle des arilles continue jusqu'à où le fruit prend son volume maximal, par un phénomène d'élargissement des cellules [24].

Du point de vue composition chimique, les sucres et les acides organiques, composés majeurs du métabolisme primaire, ont tendance de s'évoluer durant la phase de croissance. Les sucres sont apportés via la sève depuis les feuilles, et accumulés ensuite sous forme de polysaccharides (amidon et composés pariétaux). D'un autre côté, la concentration en acides organiques (comme les acides citrique et malique) augmente durant la croissance du fruit avant d'être réduite durant la maturation [27].

Dans le cas de la grenade, le taux d'acidité titrable augmente dès la nouaison jusqu'au 60^e jour de la croissance, puis diminue significativement durant la période de la maturation jusqu'au 140^e jour après la nouaison. La diminution de l'acidité coïncide avec l'élévation des concentrations en sucres totaux (figure 1.4) [28].

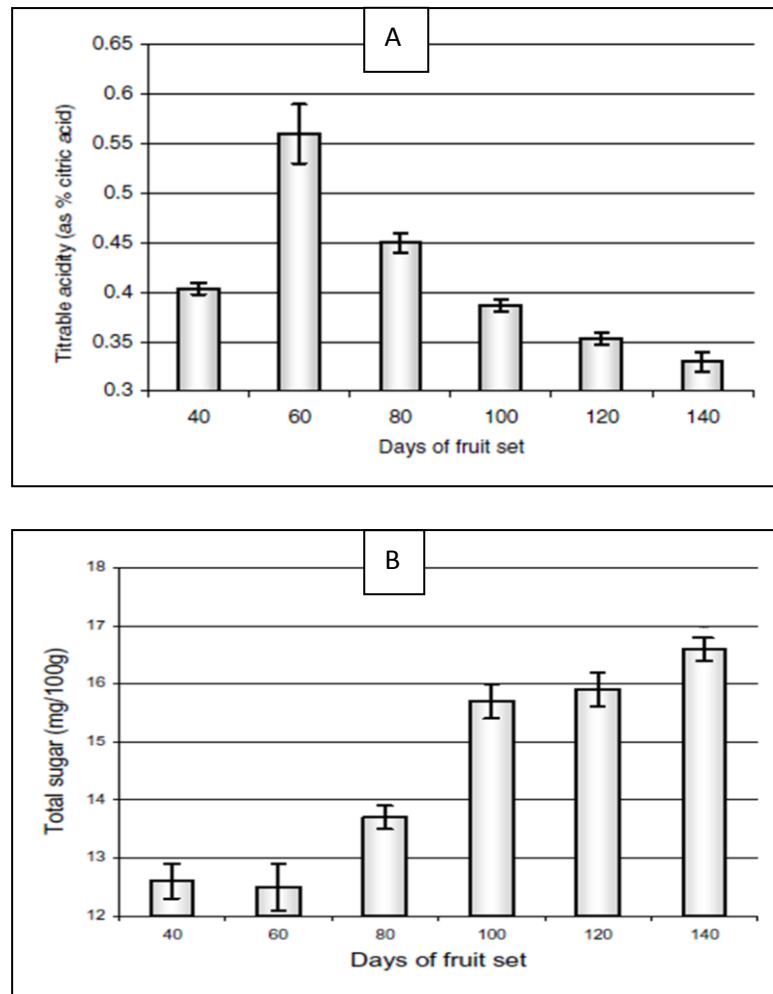


Figure 1.4 : Évolution des teneurs en acidité titrable (A) et en sucres totaux (B) des arilles, durant le développement et la maturation de la grenade [28].

Les composés minoritaires issues de métabolisme secondaire (polyphénols, alcaloïdes, terpénoïdes, caroténoïdes, etc.), sont synthétisés dans les tissus, lorsque la plante est agressée par des parasites, ou sujette à des contraintes de l'environnement telles que les rayonnements ultra-violet. Ils participent dans ce cas, aux mécanismes de défense de la plante ; mais ils contribuent également à la valeur nutritionnelle du fruit, grâce bien sûr à leurs propriétés biologiques [27].

Les concentrations en métabolites secondaires, tels que les polyphénols, les caroténoïdes et les glucosinolates, sont influencées par les facteurs de l'environnement notamment, la lumière, la température, la sécheresse, la salinité, et la fertilisation azotée [29]. Pour cela, l'évaluation du contenu en polyphénols des différents organes et tissus d'un arbre, peut-être un indicateur très pertinent de changements d'états dus aux différentes conditions environnementales, comme il

peut être pris comme réponse à des conditions d'un traitement particulier. Il est aussi important de noter que le contenu en polyphénols, est sous très forte influence génétique [30].

B. Maturation

La maturation est définie, du point de vue scientifique, comme un processus qui affecte la physiologie et la biochimie du fruit, de façon d'influencer son apparence, sa texture et sa flaveur (figure 1.5). Il se produit durant cette période, un ensemble d'évènements biochimiques, conduisant aux changements divers, au niveau de la composition chimique du fruit [31].

L'ensemble des réactions chimiques et enzymatiques qu'ont lieu durant la maturation (figure 1.5), permettent [32] :

- La formation de sucres simples (essentiellement saccharose, glucose et fructose) au détriment de l'amidon ;
- La synthèse des composés aromatiques ;
- La formation de vitamines, par exemple, la synthèse de la vitamine C ;
- La modification de la pigmentation, par dégradation des chlorophylles et synthèse des pigments caroténoïdes et anthocyanes ;
- La diminution des acides et des tannins, le fruit devient donc plus sucré et moins astringent ;
- Le ramollissement des tissus, par suite à la solubilisation et la dépolymérisation des substances pectiques.

Les mécanismes de la maturation, diffèrent selon que le fruit est de nature climactérique ou non. Les fruits qui présentent des taux de respiration et de production d'éthylène (hormone de maturation) élevés, sont dits : fruits climactériques ; et les fruits dont la production d'éthylène, tout au long de la période de la maturation, est faible, sont dits non-climactériques [31]. Ce dernier type de fruits est par ailleurs, incapables de continuer la maturation, une fois cueillis de l'arbre [33].

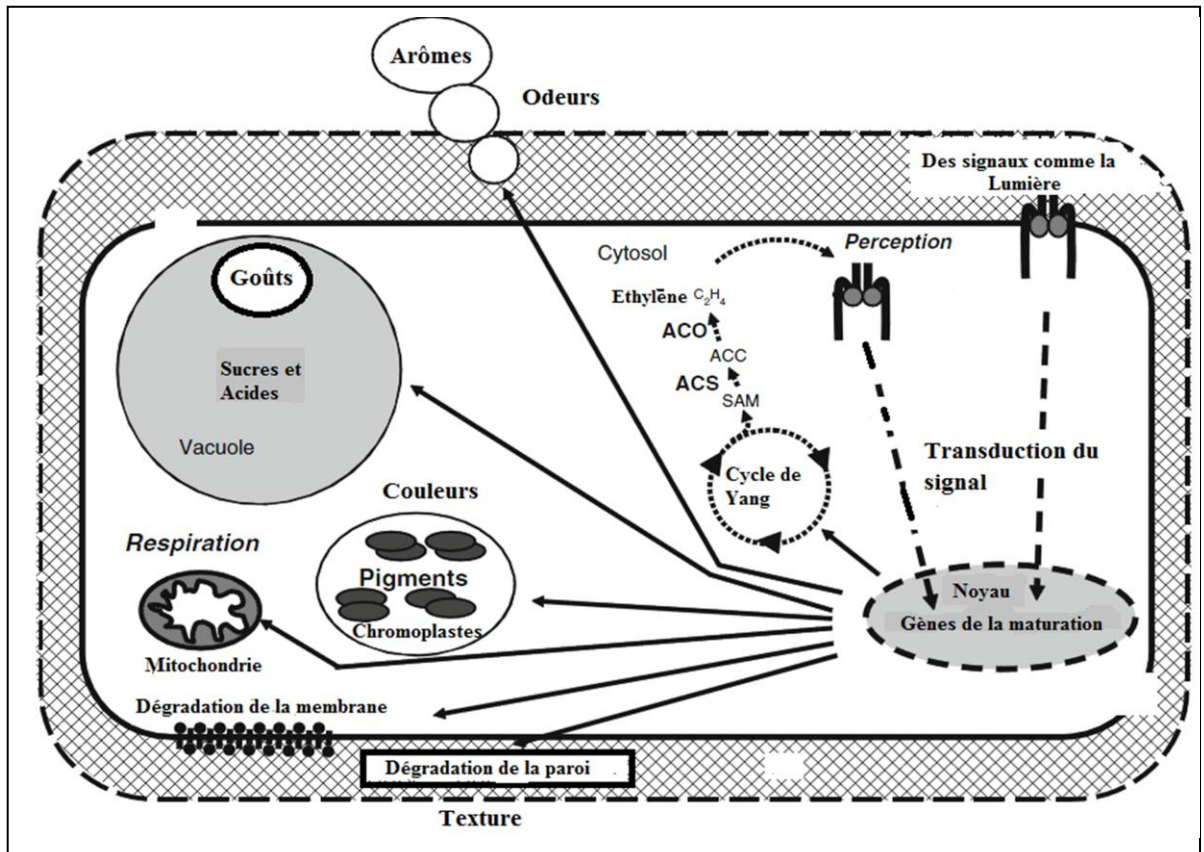


Figure 1.5 : Représentation schématique des mécanismes de la maturation d'un fruit climactérique [31].

SAM (S-Adénosyl-L-Méthionine), ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique), ACS (ACC-Synthétase) et ACO (ACC Oxydase)

Pour le cas des fruits climactériques, la maturation est un processus éthylène-dépendant (figure 1.5), car les évolutions du goût, de l'arôme, de la couleur et de la texture du fruit, sont contrôlées par l'éthylène bio-synthétisé dans la cellule à partir de la méthionine, par le biais du cycle de Yang, et ceci en réponse à des signaux comme l'éthylène lui-même, qui enclenche et amplifie sa production intracellulaire dans une voie dite : voie auto-catalytique de l'éthylène (figure 1.5). En revanche, l'éthylène n'est pas certainement impliqué dans la maturation des fruits non-climactériques. Le mécanisme évoqué dans ce cas n'est pas parfaitement élucidé [26,31].

La grenade est classée parmi les fruits non-climactériques [34,35]. Soumis à l'étude, ce fruit a montré un faible taux de respiration, une production d'éthylène à l'état de trace et une réponse négative, sur la couleur du jus et sur sa composition, vis-à-vis du traitement par l'éthylène exogène [34].

1.2.4.3. Évolution de la composition de la grenade durant la maturation

Il n'existe pas, à notre connaissance, au niveau des publications, un système de nomenclature de différents stades de la maturation des grenades, comme celui utilisé pour les dattes (fruit de *Phoenix dactylefera* L.) par exemple. Les auteurs en revanche, utilisent: soit le nombre de jours après la nouaison : par exemple (40^e, 60^e, 140^e jour après la nouaison) [28], ou (54, 82, 110, 140 et 165 jours après épanouissement des fleurs, etc.) [36], soit des dates choisies de la période de maturation (par exemple : 10 août, 1 septembre, 16 septembre, 20 septembre et 14 octobre) [37], afin de distinguer entre les stades de la maturation dans leurs études sur la grenade.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques telles que, le taux de jus et de peau des fruits, le taux de matière sèche, le TSS, le pH, les teneurs en sucres totaux, en polyphénols totaux et en anthocyanines, fournissent aux consommateurs ainsi qu'aux industriels des informations importantes dans leurs choix des variétés les plus performantes [38].

A. Évolution des caractéristiques physiques

Les caractéristiques physiques des fruits tels que, le poids, le volume, le taux de jus, ont une importance commerciale car elles influencent le choix des consommateurs et des acteurs de l'industrie agro-alimentaire [36].

La plupart des travaux mettent en évidence la croissance continue de la partie comestible du fruit durant la maturation. En effet, les taux les plus élevés des arilles, de jus, de matière sèche du jus, et les plus faibles pourcentages des écorces et des pépins, sont observés au stade ultime de la maturation [39] (tableau 1.5).

Concernant l'apparence des arilles, la couleur change du blanc au rose entre 54 et 110 jours après l'épanouissement des fleurs, puis elle passe du rose au rouge profond à la fin de la maturation [36].

Tableau 1.5 : Évolution des principaux constituants physiques de la grenade durant la maturation [39].

Caractéristique physique	Stade de maturité révélé par nombres de jours après la nouaison		
	20 ^e jour	80 ^e jour	140 ^e jour
Poids moyen des fruits (g)	76.71	150.32	235.09
Pourcentage en masses de l'écorce	73.33	56.13	42.13
Pourcentage en masses des arilles	26.66	43.86	57.86
Pourcentage de jus par fruit entier	7.56	33.78	48.01
Taux de matière sèche de jus (%)	8.06	10.18	12.53
Pourcentage en masse des pépins	18	14.06	10.49

Il est à noter que les caractéristiques externes des grenades (comme la couleur, le calibre et l'époque de la maturation), ne donnent pas forcément une idée sur la qualité interne du fruit [18].

B/ Évolution de la composition chimique

Durant la maturation, la grenade est un siège de transformations chimiques diverses. Les recherches à ce niveau indiquent qu'il a :

- Une augmentation des teneurs en sucres totaux, en sucres réducteurs et de TSS, qui est composé majoritairement de sucres [28,39,36]. Cette évolution est attribuée à l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples [28] ;
- Une diminution des teneurs en acides organiques et en acides ascorbique (vitamine C) [28,39,36] ;
- La teneur maximale en protéines (209 mg/100g) est observée 20 jours après la nouaison. Elle diminue ensuite rapidement à (66.9 %) vers le 80^e jour. Cela est la conséquence d'une diminution de la demande en enzymes endogènes qui s'élève lors de la maturation. L'augmentation ultérieure de la teneur en protéines par (58.7 %) entre le 80 et le 120^e jour, est due à l'accélération de la maturation. La diminution faible mais significative des

protéines (6.3 %), observée au-delà de 120^e jour, résulte de la dégradation des protéines lors de la sénescence (figure 1.6) [28].

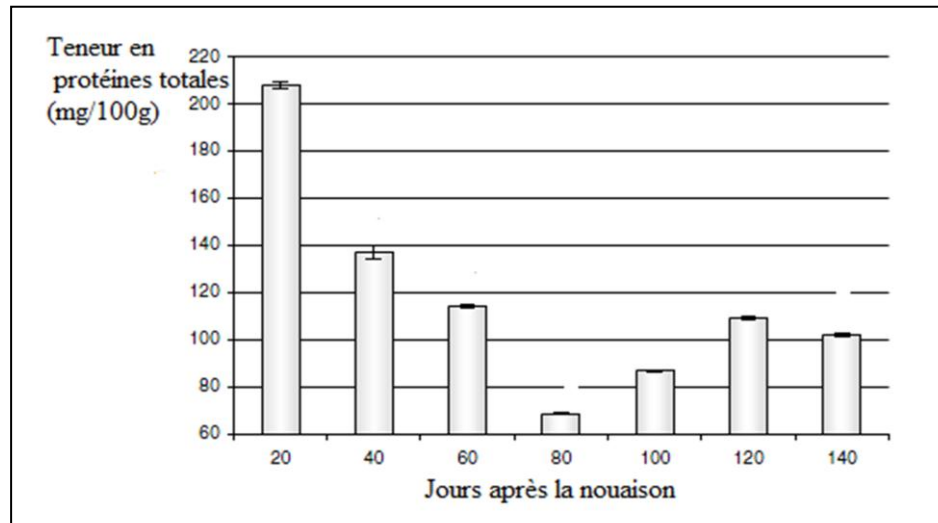


Figure 1.6 : Variation de la teneur en protéines des arilles de la grenade durant la maturation [28].

- Les macroéléments minéraux (K, Na et Ca) s'accumulent durant le développement du fruit. Cependant, la concentration des microéléments (Zn, Fe et Cu) diminue entre 10 et 140 jour après l'épanouissement des fleurs [36].
- La teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante, mesurée *in vitro*, diminuent avec la maturation (figure 1.7), alors que la teneur en anthocyanines s'élève (figure 1.8), ce qui explique le changement visible de la couleur des arilles [28,39,36].

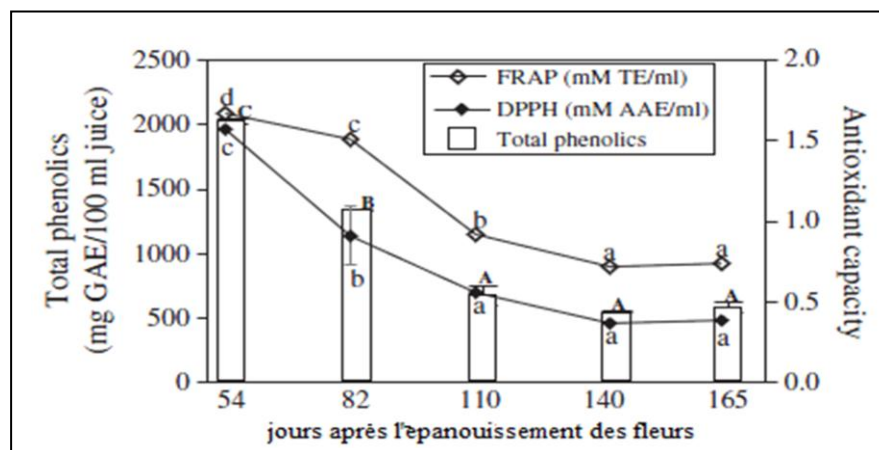


Figure 1.7 : Variation des polyphénols totaux et de la capacité antioxydante de jus de grenade durant la maturation [36].

mg GAE : mg d'Équivalent Acide Gallique. FRAP : capacité réductrice du Fe³⁺. mM TE : mM d'Équivalent Trolox. DPPH : capacité anti-radical DPPH. mM AAE : mM d'Équivalent Acide Ascorbique. Les lettres indiquent que les différences sont significatives

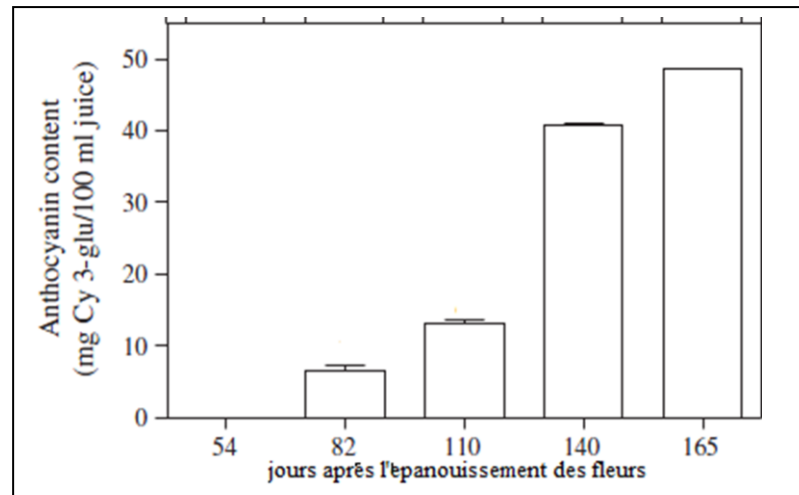


Figure 1.8 : Variation de la teneur en anthocyanines de jus de la grenade durant la maturation [36].

mM Cy 3-glu : mM de Cyanidine 3-glucoside

L'analyse statistique des corrélations permet de établir le lien entre différents composés du fruit. Dans ce cas, Fawole et Opara. (2013) [36] indiquent qu'il y a, d'une part, une corrélation forte et positive entre le TSS et les teneurs en sucres (glucose et fructose), et d'autre part, une corrélation négative entre le TSS et l'acidité titrable. Par ailleurs, la plupart des travaux consultés démontrent la corrélation positive et significative entre les polyphénols totaux et la capacité antioxydante des grenades. Ce qui explique l'implication certaine et majeure des polyphénols dans l'activité antioxydante de ce fruit [22,36].

1.3. Récolte et conservation des grenades

Selon les variétés, la récolte des grenades s'effectue entre fin septembre et octobre lorsque le pigment chlorophylle de la peau se disparaît [18]. Comme ce fruit est de nature non-climactérique, il ne subit pas des changements drastiques au niveau de sa composition et de sa physiologie post-récolte, à condition d'être convenablement entreposé en respectant le facteur température, car le comportement des récoltes est fonction de la température du stockage. Généralement, et dépendamment des cultivars, les grenades peuvent se conserver entre 2 et 7 mois à des températures comprises entre 0 et 10 °C [35].

Après récolte, les grenades sont exposées, d'après Caleb *et al.* (2011) [35] à quatre types d'altérations, notamment : la maladie physiologique due au froid, le brunissement de la peau, la perte de poids et la pourriture.

A- Maladie physiologique due au froid ou *chilling injury* :

Plusieurs fruits et légumes tropicaux manifestent, lorsqu'ils sont placés au froid des nécroses et troubles de texture. Cette incidence appelée, maladie physiologique du froid ou *chilling injury*, est probablement due à l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes [35].

La grenade est un fruit susceptible au *chilling injury*, si elle est stockée plus d'un mois à des températures inférieures à 5 °C, avec des symptômes tels que : flétrissement et brunissement de la peau et décoloration interne et brunissement des arilles [35].

Le traitement thermique des grenades à l'eau chaude à 45 °C avant stockage, peut réduire cette altération. Les traitements thermiques post-récolte, protègent les grenades contre les maladies physiologiques du au froid et contre les pourritures [35].

B- Brunissement de la peau ou *husk scald* :

Contrairement au *chilling injury*, le brunissement là touche uniquement la partie superficielle de la peau et les arilles restent intacts. Ce désordre physiologique est dû à l'oxydation des composés phénoliques de la peau à des températures inférieures à 5 °C. Des recherches indiquent qu'il y a une corrélation entre le brunissement de la peau et sa teneur en *o*-dihydroxyphénols [35].

C- Perte de poids :

La perte de poids affecte l'aspect visuel des fruits avec dessiccation, durcissement et brunissement des peaux et des arilles, par le fait d'une transpiration excessive. L'ampleur de la perte peut selon les recherches atteindre de 1.2 % à 30.7 %, selon la température et la durée de stockage. L'emploi des films d'emballages semblent réduire les pertes de poids (film en polypropylène par exemple) [35].

D- Pourritures :

La cause majeure des pertes post-récolte des grenades est la pourriture causée par différents champignons tels que : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp* et *Alternaria spp* [35]. L'une des principales attaques fongiques est

la pourriture noire des arilles. En plus de ça, les grenades peuvent être attaquées par des insectes (puceron) et des nématodes (*Meloido gyneincognita*) [18]. D'une façon générale, la stabilité des grenades durant le stockage dépend des variétés [35].

1.4. Utilisations alimentaires de la grenade

Les utilisations traditionnelles de la grenade sont nombreuses, mais généralement elle est consommée en frais, dont la partie comestible est composée d'arilles renfermant des pépins. Ce fruit est également transformé en jus et en différents boissons comme les limonades et le vin. Le jus de grenade est très populaire au Moyen-Orient (en Iran surtout), il peut être naturel ou sucré, ou encore concentré en sirop ou transformé en vin. Le jus peut aussi être transformé en gelée en ajoutant la pectine et le sucre [40]. Par ailleurs, les arilles peuvent être déshydratés et employés comme épice [41].

1.5. Production de la grenade dans le monde et en Algérie

D'après l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale des grenades était de 1,5 millions de tonnes en 2009, l'Iran est le premier producteur mondial avec une production annuelle de 700000 tonnes, suivi de l'Inde, les Etats-Unis, la Turquie, l'Espagne, la Tunisie, la Grèce et l'Egypte [42].

La culture du grenadier est peu exigeante, et malgré ça, ses plantations ne sont pas très développées en Algérie. La superficie totale occupée par les plantations du grenadier est de 12114 ha, répartie entre plusieurs Wilaya. Les trois premiers Wilayas productrices de grenades sont par ordre : Mostaghanem, Ghelizen et Djelfa [10].

Le taux de production de grenade enregistré en 2008 est de 641096 quintaux [10]. En 2012, la production est élevée à 717063 quintaux [43].

CHAPITRE 2

LA GRENADE UN ALIMENT-SANTÉ.

SA COMPOSITION, SA VALEUR NUTRITIONNELLE ET SES EFFETS SANITAIRES

2.1. Composition physico-chimique de la grenade

La partie comestible de la grenade, qui s'appelle les arilles (figure 2.1), constitue 52 % du poids total du fruit, comprenant 78 % de jus et 22 % de pépins [40]



Figure 2.1 : Photographie des arilles de la grenade [40]

La composition physico-chimique de la pulpe et de jus est affectée par les variétés ou cultivars, les zones géographiques, la saison de récolte, les différences de maturité et par la technologie de transformation [37]. Sur ce, le tableau 2.1, illustre un exemple de cette variabilité.

En observant le tableau 2.1, on peut déceler l'utilité de la caractérisation physico-chimique des différents cultivars, car c'est ainsi qu'on arrive à les classer en fonction des critères nutritionnel, commercial et industriel. Par exemple, les cultivars les plus riches en arilles, ont un potentiel commercial et industriel important, et ceux qui sont plus riches en TSS et en polyphénols ont un bon potentiel nutritionnel.

Tableau 2.1 : Variabilité de la composition physico-chimique des grenades

Composé physico-chimique	Variations	Provenance des cultivars	Références
Poids du fruit (g)	101.3 - 549.7	Tunisie	[22]
	430.8 - 535.1	Maroc	[44]
	103.38 - 505.00	Iran	[45]
Taux d'arilles (%)	37.8 - 61.7	Tunisie	[22]
	53.4 - 61.2	Maroc	[44]
TSS (°Brix)	14.3 - 16.3	Tunisie	[22]
	15.3 - 16.5	Maroc	[44]
	15.7 - 22.03	Iran	[45]
pH	2.72 - 4.24	Tunisie	[22]
	4.5 - 5.5	Maroc	[44]
	2.75 - 4.14	Iran	[45]
Vitamine C (mg/100 g)	9.68 -17.45	Iran	[45]
Composés phénoliques totaux	133.93 - 350.06 (mg EAG*/100 ml de jus)	Tunisie	[22]
	108.0 - 944.9 mg EAG/100 g du poids de jus	Turquie	[23]

* : mg EAG= mg d'Equivalent Acide Gallique.

En générale, il existe une corrélation positive entre l'acidité des grenades et leurs contenue en polyphénols et en antioxydants, c'est-à-dire que ce sont les cultivars acides qui sont plus riches en polyphénols et antioxydants [39].

2.2. Composition et valeur nutritionnelle de la grenade

D'une façon générale, la grenade est un fruit charnu peu calorique. Il est riche en hydrates de carbone et en polyphénols antioxydants, notamment en anthocyanines et en acide ellagique, qui possèdent une action antioxydante puissante. La grenade constitue aussi un bon apport en fibres alimentaire, en potassium et en vitamine C [46].

Le tableau 2.2, présente la composition nutritionnelle de la partie comestible de la grenade de variété '*Wonderful*' de la Californie.

Tableau 2.2 : Composition et valeur nutritionnelle de la grenade [40]

Composant nutritif	Apport (en g/100 g de la portion comestible)
Eau	77.93
Energie	83 Kcal
Protéines	1.67
Lipides	1.17
Cendres	0.53
Hydrates de carbone	18.70
Sucres	13.67
Fibres alimentaires	4
Minéraux :	
Calcium	10 mg
Fer	0.30 mg
Magnésium	12 mg
Phosphore	36 mg
Potassium	236 mg
Sodium	3 mg
Zinc	0.35 mg
Cuivre	0.158 mg
Manganèse	0.119 mg
Sélénium	0.5 µg
Vitamines :	
Vitamine C	10.2 mg
Vitamine E	0.60 mg
Acide pantothénique	0.377 mg
Niacine	0.293 mg
Profil d'acides gras :	
Acides gras saturés	0.120 g
Acides gras mono-insaturés	0.093 g
Acides gras poly-insaturés	0.079 g
Campestérol	1 mg
β-sitostérol	4 mg

La composition nutritionnelle de jus de grenade est presque comparable à celle des arilles (tableau 2.3), sauf pour les teneurs en protéines, en lipides et en fibres qui sont plus élevées dans les arilles grâce à la présence des pépins, qui

occupent 10 % de la masse de l'arille. Une portion de 100 ml de jus fournit 16 % de l'apport conseillé pour l'adulte en vitamine C ; le jus constitue également une bonne source de vitamine B5, de potassium et de polyphénols antioxydants [40].

Tableau 2.3 : Composition nutritionnelle de jus de grenade frais [40]

Composant nutritif	Proportion
Humidité	85.4 %
Sucres totaux	10.67 %
Pectine	1.4 %
Acidité totale	0.7 mg/100 ml
Acide ascorbique	19.6 mg/100 ml
Cendres	0.05 g/100 ml
Potassium	49.2 ppm

Les pépins, le co-produit issu de l'élaboration de jus à partir des arilles seuls, sont une source de lipides (27.2 %) de haut potentiel de valorisation, de protéines (13.2 %), de fibres brutes (35.3 %) et de cendres (2 %). Ils contiennent aussi 6 % de pectine et 4.7 % de sucres totaux [40].

D'un autre côté, l'élaboration de jus par pressage des grenades entières, génère un co-produit composé après séchage de : 10.9 g/100 g de protéines, 20.9 g/100 g de lipides, 2.5 g/100 g de cendres, de 50.3 g/100 g de fibres totaux, de 30.4 g/100 g de fibres insolubles et de 19.9 g/100 g de fibres solubles. Ce co-produit est considéré comme source importante de fibres alimentaires pour l'industrie agro-alimentaire, en tant qu'ingrédient à la fois techno-fonctionnel et nutritif [47].

2.3. Composés phénoliques de la grenade

2.3.1. Généralité sur les composés phénoliques

En plus des principaux nutriments, les glucides, les protéines et les lipides, qui sont des métabolites primaires, les plantes contiennent d'autre catégorie de composés mineurs, appelés métabolites secondaires. Ces composés ont une large variété structurale (plus de 200000 structures chimiques) (figure 2.2) ; et ils font l'objet ces dernières années de plusieurs études de recherche, portant sur leurs propriétés bioactives [48].

On distingue parmi les métabolites secondaires, les fameux composés phénoliques ou polyphénols.

La figure 2.2, représente sommairement la classification des métabolites secondaires et des polyphénols.

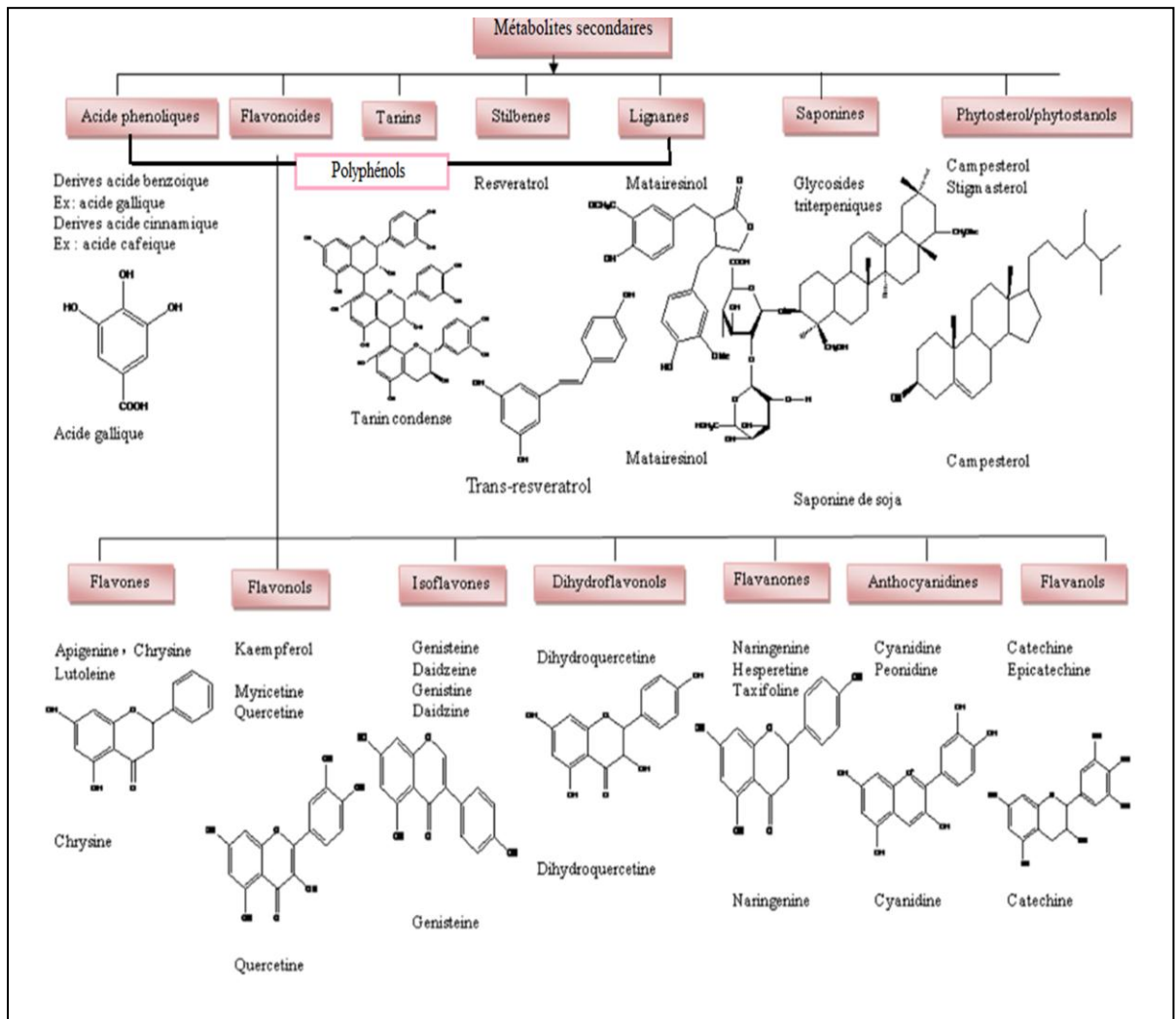


Figure 2.2 : Classification des quelques métabolites secondaires [48]

La dénomination « polyphénols » ou « composés phénoliques » désigne une famille de plus de 8000 molécules, divisées en un certain nombre de classes chimiques, présentant tous dans leurs structures au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [48].

Selon la complexité de la structure, on peut classer les polyphénols en deux grandes classes : les polyphénols simples ou monomériques et les polyphénols

condensés ou polymériques. Les polyphénols simples rassemblent les acides phénoliques (par exemple, acides ellagique et gallique de la grenade), les flavonoïdes (par exemple, anthocyanine de la grenade) et les stilbènes. À leur tour, les polyphénols condensés rassemblent les tannins (par exemple, les tannins hydrolysables de la grenade) et les lignanes [2].

2.3.2. Principaux rôles des polyphénols

Au niveau du tissu végétal, les polyphénols interviennent dans des processus physiologiques, par exemple, dans la lignification, la régulation de la croissance, les interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites, etc. Considérant le végétal comme aliment, les polyphénols sont impliqués dans les critères de la qualité alimentaire, dans la couleur (les flavonoïdes), dans le goût (astringence et amertume), mais également dans la qualité nutritionnelle. Ces aspects orientent le choix de l'homme vers la consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules, etc.) et des produits qui en dérivés [48].

Les composés phénoliques se trouvent dans la plupart des végétaux, en particulier chez ceux que nous consomme régulièrement. Cependant, leur utilisation diététique et thérapeutique par l'homme, ne se limite pas aujourd'hui à la consommation seule. En effet, au niveau des laboratoires de recherche puis au niveau industriel, passant par le palier d'extraction et de purification, on retrouve les composés phénoliques conditionnés sous forme de compléments alimentaires, de médicaments et de produits cosmétiques [2].

Quel que soit la forme et le degré de purification, sous les quels les composés phénoliques se trouvent, ils présentent tous des propriétés biologiques (tableau 2.4) liées d'une part à leur caractère antioxydant, responsable de la neutralisation des formes activées de l'oxygène et des radicaux libres toxique, issus de la peroxydation lipidique. D'autre part, les composés phénoliques trouvent leur activité biologique liée à leur capacité de se lier aux protéines, ce qui induit l'inhibition d'activités enzymatiques diverses (lipoxygénases, peroxydases, xanthine oxydase, glucosidases, galactosidases, etc.) [2,48].

Des exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme [48].

Nature des polyphénols	Activités biologiques
Acide phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-ulcéreuses et antiparasitaires, etc.
Coumarines	Activités anti-inflammatoires, analgésiques, anti-tumorales, etc.
Flavonoïdes	Activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-carcinogènes, hypotenseurs, vaso-protecteurs, etc.
Anthocyanes	Activités antioxydantes, etc.

2.3.3. Composés phénoliques de la grenade

2.3.3.1. Composition phénolique de jus de grenade

Le jus de grenade renferme entre 0.2 et 1 % de polyphénols, selon ce qu'il soit issue d'arilles seuls ou de fruits entiers [6], Il contient aussi d'autres composés minoritaires bioactifs tels que : les acides gras, les acides aminés, les acides organiques, les indole-amines (la tyramine, la sérotonine et la mélatonine) (figure 2.3), les stérols (figure 2.4), les triterpénoïdes (figure 2.5) et l' α -tocophérol [15].

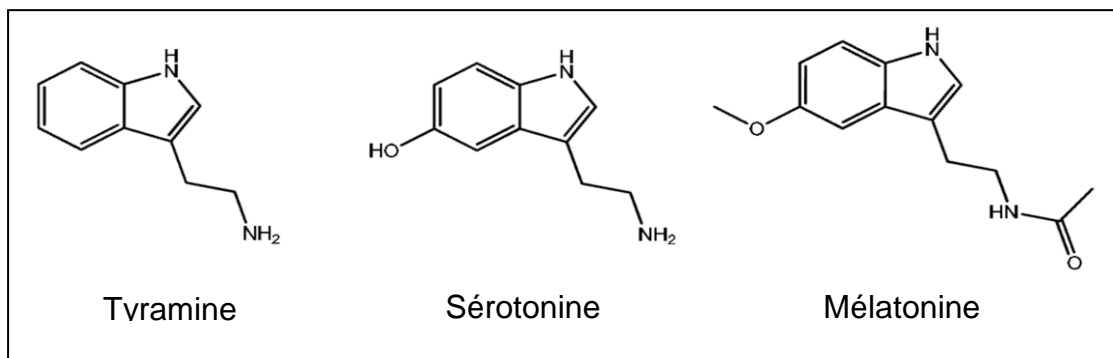


Figure 2.3 : Les indole-amines de la grenade [15].

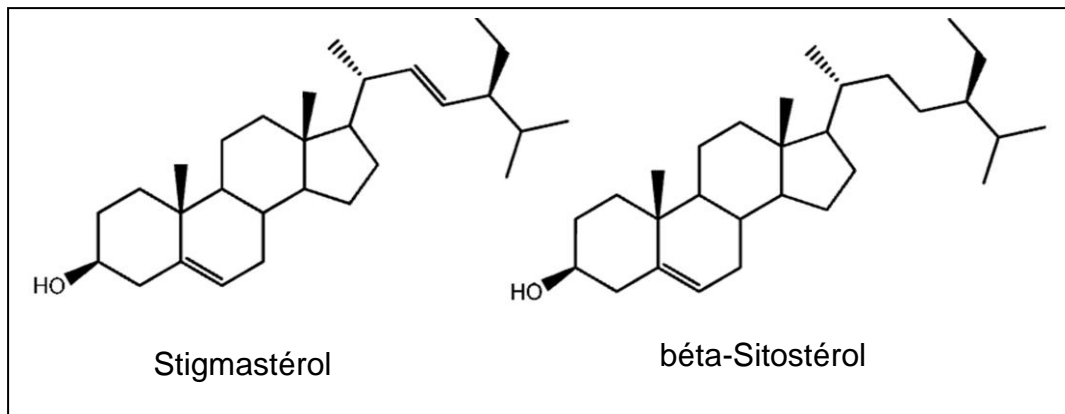


Figure 2.4 : Exemples de stérols de la grenade [15].

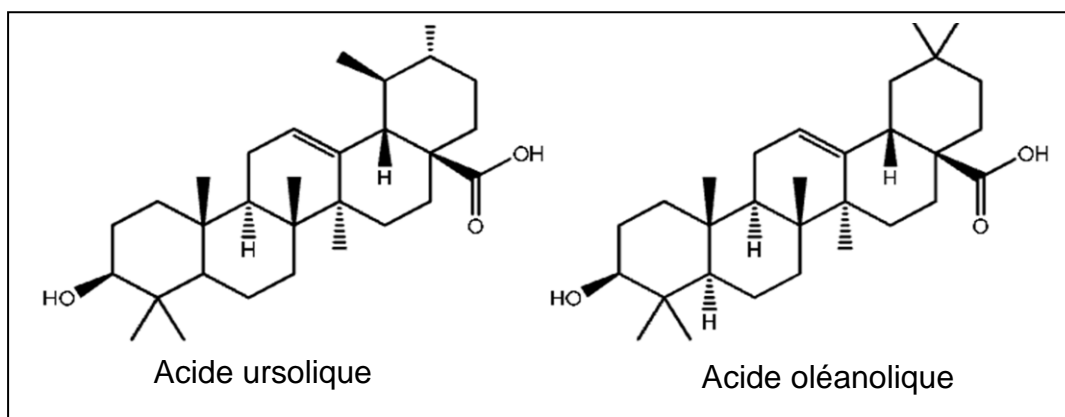


Figure 2.5 : Terpènes de la grenade [15].

On peut subdiviser les composés phénoliques de la grenade en flavonoïdes, tannins hydrolysables et acides phénoliques. Les composés phénoliques les plus notables de jus de grenade sont des anthocyanines (figure 2.6) qui font partie de la famille des flavonoïdes, ils sont responsables de la couleur rose brillante des arilles et de jus. Parmi ces composés on cite : Cyanidin-3-O-glucoside, Delphinidin-3-O-glucoside et Pelargonidin-3-O-glucoside [14,15].

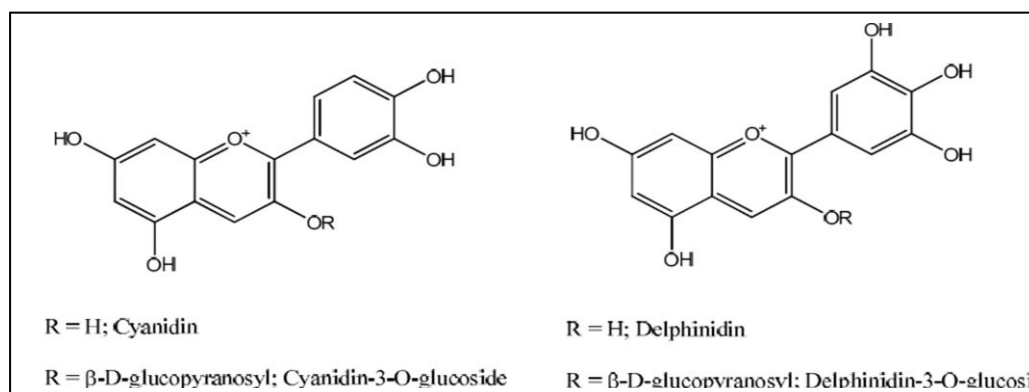


Figure 2.6 : Structure de quelques anthocyanines de jus de grenade [15].

Dans une étude récente, Sentandreu *et al.* (2013) [49] trouvent que le jus des grenades entières renferme 151 composés phénoliques, 65 d'entre eux sont des anthocyanines, le reste est composé essentiellement de tannins hydrolysables. Comme flavonoïdes on distingue aussi, Catéchine, Épicatéchine, Quercétine et Rutine (figure 2.7) [14,15].

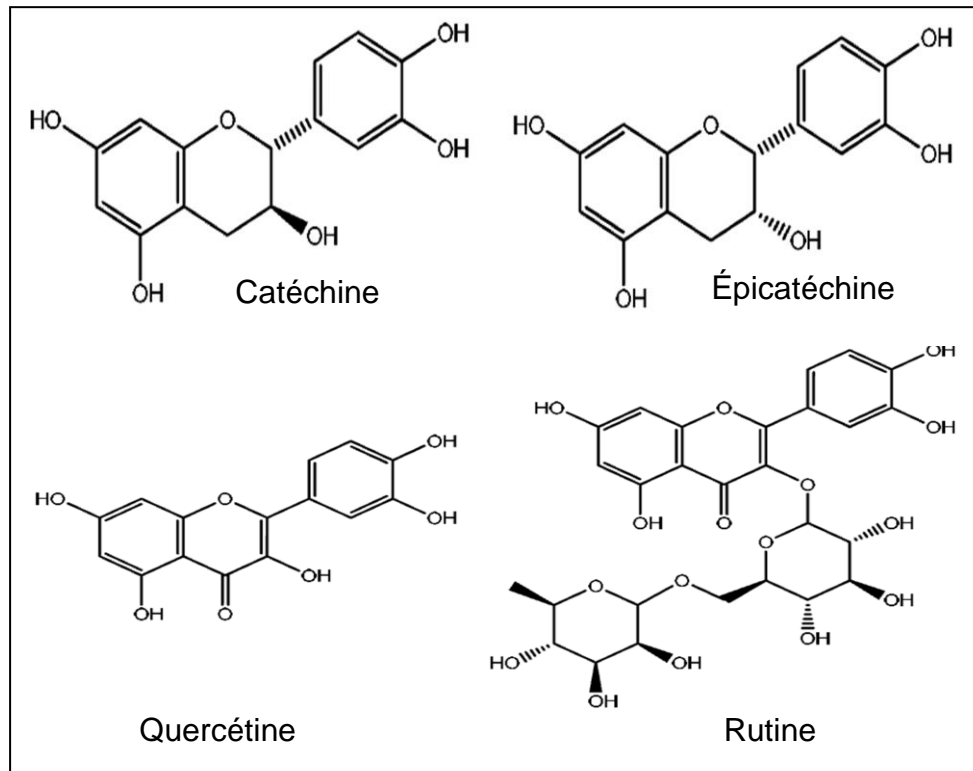


Figure 2.7 : Structure de quelques flavonoïdes de la grenade [15].

Dans la classe des acides phénoliques on distingue essentiellement l'acide ellagique et l'acide gallique ; et comme tannins hydrolysables on trouve les ellagitannins (tannins à base d'acide ellagique) tels que : Punicalline, Punicalagine (figure 2.8), Corilagine, Casuarinine, Gallagyldilactone et autres [14,15].

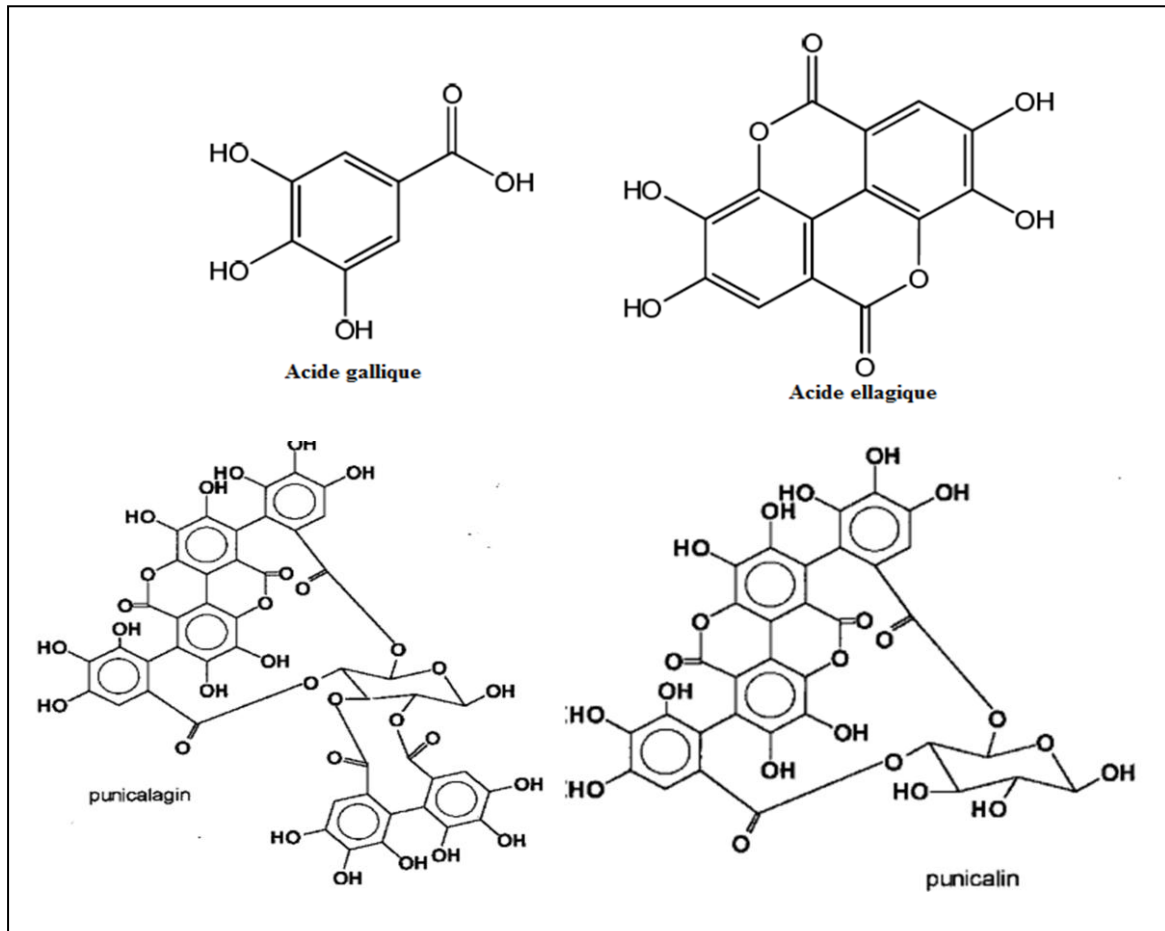


Figure 2.8 : Structures de quelques acides phénoliques et des tannins ellagiques de la grenade [15].

2.3.3.2. Composés phénoliques de l'écorce de grenade

L'écorce de la grenade est une bonne source de polyphénols antioxydants, notamment les tannins hydrolysables dont la teneur est de l'ordre de 4792.3 - 6894.8 mg/100 g de poids frais [40].

Parmi les composés phénoliques de l'écorce de la grenade, quatre ont été clairement identifiés, en utilisant des techniques chromatographiques et spectroscopiques, ces composés sont : la punicaline, la punicalagine, l'acide gallique et l'acide ellagique (figure 2.8) [47]. Grâce à leur richesse en antioxydants, l'écorce de la grenade est un co-produit nutraceutique pour l'industrie alimentaire [40].

2.3.3.3. Composés phénoliques des pépins de la grenade

Les pépins de la grenade renferment une huile riche en acides gras conjugués, notamment l'acide punique : (un acide gras à $C_{18:3}$ de formule chimique, *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13 octadécatriénoïque) (figure 2.9). Cet acide est doué d'activité anticancéreuse [50]. Par ailleurs, les graines contiennent les polyphénols suivants [15] :

- Les acides ellagique, 3,3'-Di-O-méthylellagique et 3,3'.4'-Tri-O-méthylellagique ;
- Les isoflavones notamment la génistéine et la daidzéine ;
- La lignine.

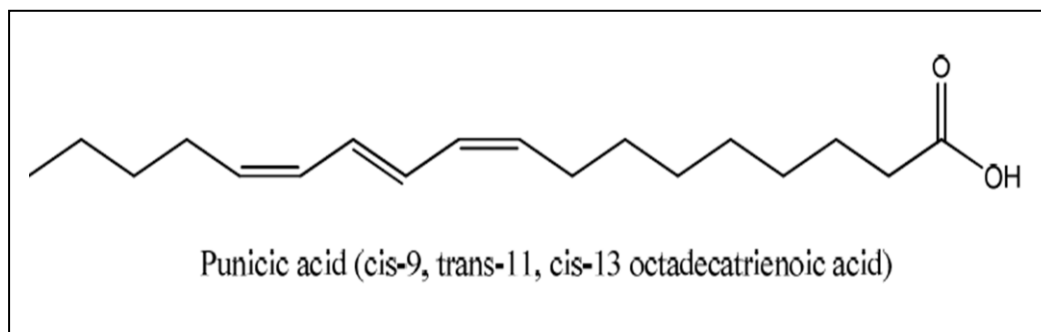


Figure 2.9 : Structure de l'acide punique des pépins de la grenade [15]

2.3.4. Importance nutritionnelle des polyphénols de la grenade

La grenade contient des quantités importantes de substances protectrices, ce sont les polyphénols (des tannins et des flavonoïdes) qui lui donnent son goût astringent typique. Ces substances sont dotées de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires, Dans cette lumière, les dernières avancées scientifiques prouvent que les polyphénols de la grenade sont actifs contre [51,5] :

- L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires,
- le vieillissement cellulaire et la maladie d'Alzheimer,
- les inflammations chroniques,
- Les cancers, en particulier le cancer de la prostate.

2.4. Principales données scientifiques sur l'efficacité nutritionnelle de la grenade

Que ce soit un aliment de qualité ou comme un véritable produit de santé, la grenade dont l'utilisation revient au millénaires, ses vertus sanitaires sont prouvées aujourd'hui par la science. En effet, ces dernières années il a été

démontré en plus de 250 études scientifiques, que les composés protecteurs de la grenade, spécifiquement les polyphénols, sont efficace dans la lutte contre le stress oxydatif, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives, les réactions inflammatoires nocives et même contre certaines formes du cancer [11,51,5].

2.4.1. Activité antioxydante

2.4.1.1 Généralités

L'oxydation est l'une des réactions à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques, elle affecte les qualités nutritionnelles et sensorielles du produit, et peuvent avoir dans ce cas des répercussions sur la santé du consommateur, à cause de la production de radicaux libres nocifs [52].

Dans les organismes aérobies, le métabolisme cellulaire de l'oxygène produit de façon permanente des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS ou *Reactive Oxygen Species*) (tableau 2.5), impliqués dans des processus physiologiques. Mais dans certaines situations (exposition à des rayons UV, des radiations ionisantes et de métaux de transition, le non-respect de l'hygiène alimentaire, sédentarité, etc.), cette production augmente de façon à entrainer un stress oxydatif dans l'organisme, définie comme un déséquilibre de la balance dite d'antioxydants/pro-oxydants en faveur de ces derniers [53].

La dénomination « dérivés réactifs de l'oxygène » inclut des radicaux libres de l'oxygène d'une durée de vie très basse (tableau 2.4), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est également importante [53].

Tableau 2.5 : Concentration et demi-vie des principaux ROS [53].

Symbole	Nom	Concentration	Demi-vie (37 °C)
$\bullet\text{O}_2^-$	Radical superoxyde	10^{-12} à 10^{-11} M	Enzymatique*
$\bullet\text{OH}$	Radical hydroxyle	–	10^{-9} s
$\bullet\text{NO}$	Monoxyde d'azote	–	1 à 10 s
$\bullet\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxyde d'hydrogène	10^{-9} à 10^{-7} M	Enzymatique*
$\bullet\text{ONOO}^-$	Peroxynitrite	10^{-9} à 10^{-7} M	0,05 à 1 s

* Les demi-vies du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène varient en fonction de l'activité enzymatique des enzymes assurant leur métabolisme.

On désigne par le terme « radicaux libres », tout atome ou molécule présentant un électron célibataire ou non apparié. Ils sont produits par des processus physiologiques dans toutes les parties de l'organisme. Ces espèces chimiques sont instables et très réactives, elles cherchent alors à se lier avec un électron porté par une molécule biologique, dont lipides, protéines et acides nucléiques, à n'importe quel compartiment de la cellule. En raison de leur capacité d'endommager presque tout type de molécules dans l'organisme (figure 2.10), les ROS ont été impliqués dans de multiples pathologies, aiguës ou chroniques [52,53].

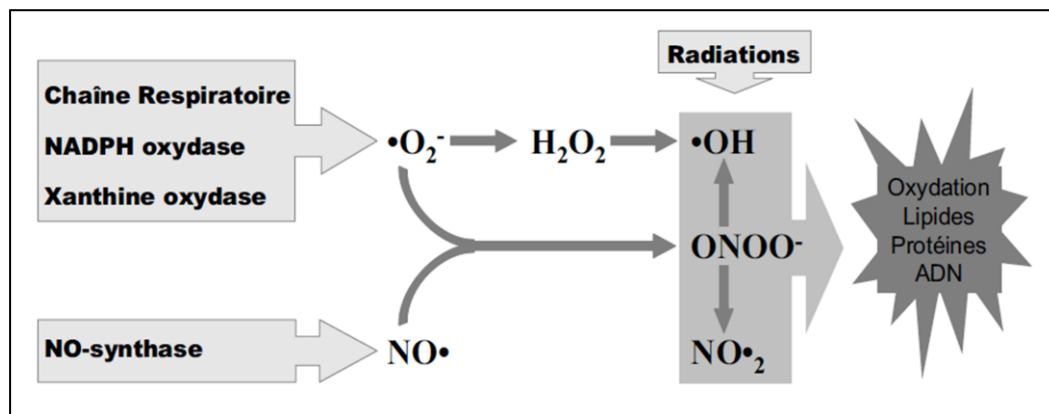


Figure 2.10 : Origines et cibles des ROS [53].

Pour maintenir la production des ROS dans l'organisme à un niveau physiologique, l'organisme est doté de tout un arsenal d'antioxydants. Un antioxydant comme le définit Fontaine. (2007) [53] : « est toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat ». Cette définition peut s'appliquer à plusieurs systèmes, comprenant des enzymes (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) [52], mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles telles que l'ubiquinone liposoluble et les protéines de complexation des métaux pro-oxydants (le fer et le cuivre) (figure 2.11). Cette grande variété physico-chimique occasionne la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [53].

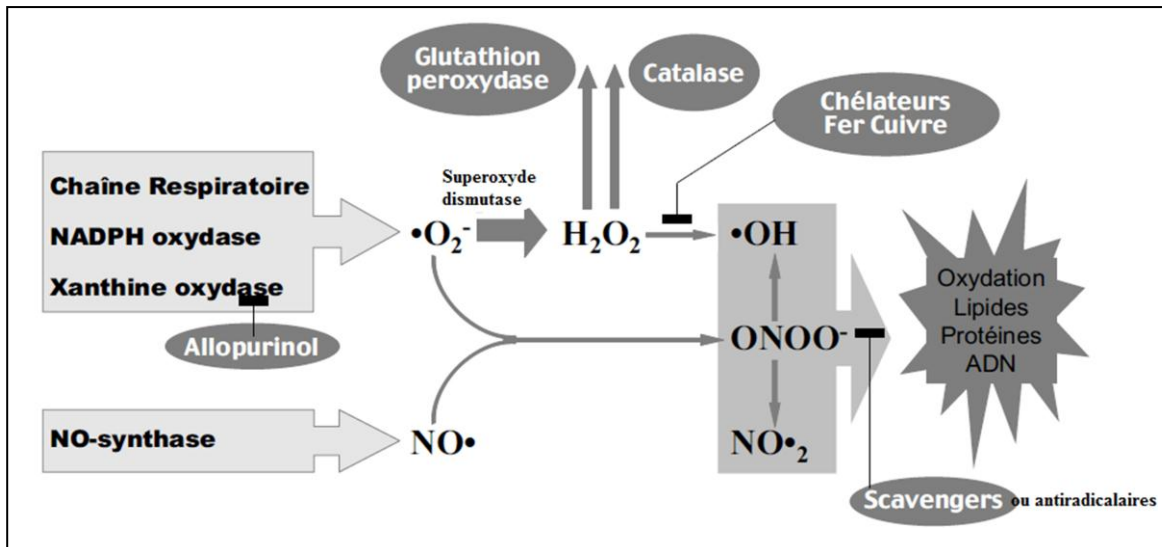


Figure 2.11 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des ROS [53].

En dehors de ce système antioxydant endogène, notre alimentation apporte une grande variété de substances ou d'éléments antioxydants : vitamines C, E et provitamine A (β -carotène), pigments caroténoïdes et polyphénols. Ce qui permet de renforcer la lutte contre le stress oxydatif. D'où vient l'importance nutritionnelle des polyphénols [48].

Par leur comportement de « scavengers » ou anti-radicalaire (figure 2.11), les antioxydants phénoliques peuvent protéger diverses molécules biologiques contre la dégradation oxydative, causé par les ROS. L'une de leurs implications majeures concerne la protection des lipides alimentaires ou cellulaires, de la peroxydation [2]. Ce qui fait de ces composés de bon candidat pour lutter contre le rancissement des aliments et le vieillissement des tissus biologiques [52]. Dans cette lumière, les produits et les co-produits végétaux peuvent donner lieu à l'exploitation de ces composés dans les domaines, alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

2.4.1.2. Pouvoir antioxydant de la grenade

Après l'étude comparative entre le jus de grenade et d'autres boissons riches en polyphénols, consommés en Amérique, Seeram *et al.* (2008) [7] trouvent que la teneur en polyphénols, l'activité antioxydante et la capacité d'inhiber l'oxydation de LDL (lipoprotéine de faible densité), sont plus importants chez le jus de grenade

que dans les autres boissons étudiées, telles que le vin rouge, le jus de raisin et le thé vert glacé (figure 2.12).

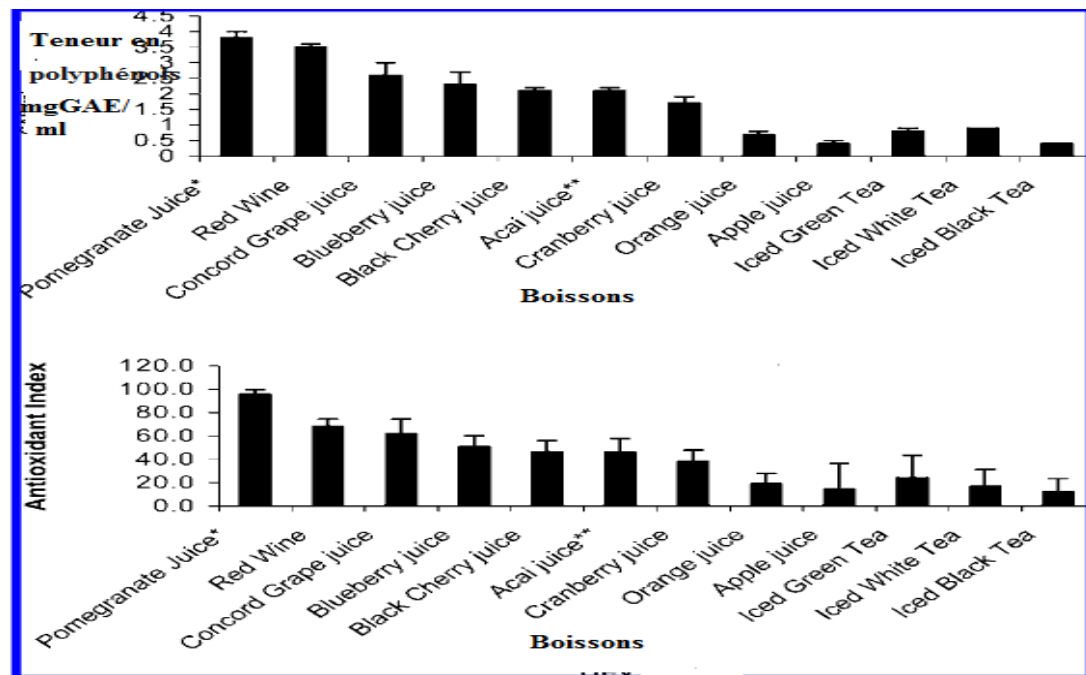


Figure 2.12 : Comparaison de la teneur en polyphénols et de l'activité antioxydante, entre le jus de grenade et d'autres boissons [7].

Les jus de grenade commerciaux ont une activité antioxydante trois fois plus élevée que celle du vin rouge et du thé vert, et plus élevée que celle des jus expérimentaux. Les jus commerciaux sont obtenus par pressage des grenades entières, alors que les jus expérimentaux sont issus d'arilles seuls. L'analyse des jus par HPLC-UV montre que les jus commerciaux contiennent des tannins ellagiques à la hauteur de 1500-1900 mg/l, alors que les jus obtenus à l'échelle de laboratoire ne les contiennent qu'à l'état de traces. Ainsi, Gil *et al.* (2000) [6] ont conclu que le procédé industriel de fabrication du jus de grenade permet l'extraction des tannins hydrosolubles contenus dans l'écorce du fruit, ce qui explique la plus forte activité antioxydante des jus du commerce.

Dans la grenade elle-même, l'activité antioxydante de l'extrait phénolique de la peau est 23.4 fois plus élevée que pour l'extrait de jus. À son tour, l'extrait phénolique des pépins possède une activité antioxydante 2.3 fois plus élevée que pour l'extrait de jus [54].

Il convient alors de noter que la peau et les pépins de la grenade sont un co-produit à haut potentiel de valorisation.

À l'échelle *in vivo*, l'ingestion par des rats de l'extrait méthanolique de polyphénols de la peau, entraîne la préservation des activités enzymatiques antioxydantes, notamment la catalase, la peroxydase et la superoxyde dismutase. De plus, la peroxydation lipidique chez le rat s'est trouvée réduite à 54 %, comparativement aux rats témoins [55].

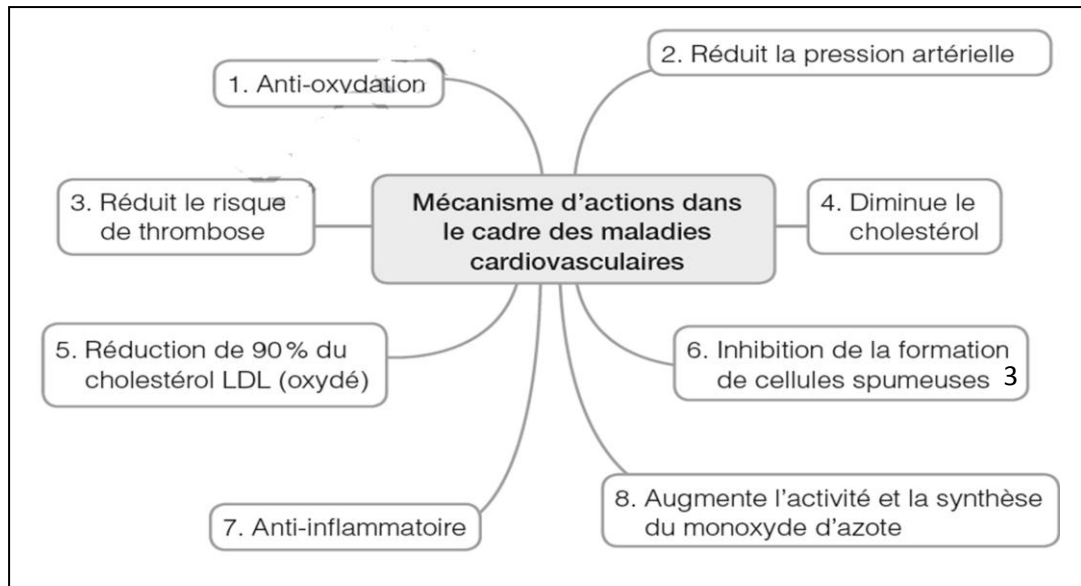
Dans une étude clinique, des sujets volontaires ont reçus deux capsules d'ellagitannins de la grenade par jour. Il a eu par conséquence une réduction significative des TBARS (*Thio barbituric Acid Reactive Substances*, un biomarqueur du stress oxydatif, mesurant les composés de l'oxydation des lipides dans l'organisme) dans le plasma [56]. Une autre étude clinique a montré une augmentation du statut antioxydant total dans le sang de 130 %, après la consommation journalière d'un verre de jus de grenade pendant un an [52].

2.4.2. Protection contre les maladies cardio-vasculaires

Les antioxydants phénoliques présentent un effet protecteur sur les LDL, qui transportent le cholestérol du foie vers les tissus. L'oxydation des LDL par les macrophages entraîne l'accumulation de cholestérol et d'autres lipides dans les parois des artères, créant un encrassement qui peut se développer jusqu'à le bouchage des vaisseaux et conduire alors à la mort du tissu non irrigué. La situation est vraiment sévère lorsque ce sont les artères coronariennes qui sont touchées, entraînant alors l'infarctus du myocarde, la cause de mort la plus fréquentes dans les pays industrialisés occidentaux. Les études épidémiologiques ont montré que la présence d'antioxydants phénoliques dans le sang peut limiter ce phénomène [2].

Les composés phénoliques agissent selon trois processus : par diminution de la pression sanguine, par l'augmentation de la vasodilatation et par l'inhibition d'activités enzymatiques de phosphorylation et des tyrosine-kinases [2].

Les polyphénols de la grenade interviennent à plusieurs niveaux contre les maladies cardiovasculaires (figure 2.13) [52].



3 : les cellules spumeuses sont des cellules formées à partir des macrophages lors de l'athérogénese [11].

Figure 2.13 : Mécanismes d'actions de la grenade sur les maladies cardiovasculaires [52].

Les polyphénols de jus de grenade protègent les LDL de l'oxydation en mettant en jeu soit une interaction directe des polyphénols avec les LDL et/ou l'accumulation des polyphénols dans les macrophages. De plus, les polyphénols de la grenade inhibent l'oxydation des LDL en détruisant les ROS. Par ailleurs, ces composés augmentent l'activité paraoxonase sérique, qui hydrolyse les peroxydes lipidiques des LDL [5].

Les propriétés antiathérogènes des polyphénols de la grenade ont été démontrées *in vivo* comme *in vitro*. En effet, l'administration orale de jus de grenade à des souris hyper-cholestérolémiques augmente l'expression d'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote vasodilatateur, et réduit significativement la taille de la plaque d'athérome [52] (figure 2.14).

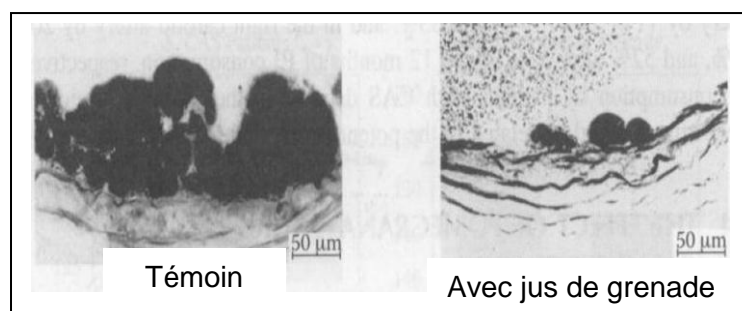


Figure 2.14 : Photographie de la plaque d'athérome chez des souris complémentées en jus de grenade et autres non complémentées [11].

Par ailleurs, l'hypertension artérielle est l'un des facteurs de risque du développement de l'athérosclérose [11]. Ainsi, la consommation de jus de grenade même à court terme, permet de réduire sensiblement la pression sanguine [57].

2.4.3. Protection contre le cancer

Wald. (2009) [11] a défini le cancer comme : « *une maladie de la cellule, causée par une dérégulation du programme génétique cellulaire. Cette dérégulation a pour conséquence la prolifération incontrôlée de cellules anormales avec envahissement local ou à distance* ».

La cancérogenèse est un processus à plusieurs étapes, aboutissant finalement à des tumeurs et des métastases. L'ensemble de ces étapes peut être ramené à trois principales [58] :

- L'étape d'initiation, d'une durée de quelques jours est marquée par l'introduction de défauts sur l'ADN par des agents physiques ou chimiques jugés de carcinogènes ;
- L'étape de promotion, d'une durée de plusieurs années, durant laquelle il y a accumulation de cellules pré-malignes caractérisées par des divisions cellulaires anormales ;
- L'étape de progression, d'une durée de un à cinq ans. À ce stade la cellule devient réellement maligne par activation des proto-oncogènes et/ou inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette dernière conduit au stade ultime de la cancérogenèse avec croissance tumorale et l'acquisition du potentiel d'invasion et de métastase.

Les cancers du côlon, du poumon et de l'utérus sont les plus répandus en Algérie, avec un taux de 50 % touchant la moyenne d'âge de 59 ans pour l'homme, et 51 ans, pour la femme [59].

Les études épidémiologiques ont montré qu'un apport élevé en fruits diminuait les risques de cancer. Le rôle des fruits dans la prévention dérive de leur composition chimique. En effet, à côté des vitamines et des minéraux, les phytomicroconstituants tels que les polyphénols et caroténoïdes interfèrent avec les voies de la cancérogenèse. Dans les différentes phases de la cancérogenèse, ces composés agissent comme agents bloquants et/ou suppresseurs [58].

On peut ainsi distinguer cinq niveaux d'activité anticancéreuse : activités antiproliférative, anti-invasive, antiangiogène et proapoptotique [5].

La grenade, qui est appelée parfois le fruit de la prostate, a fait ses preuves sur le cancer de la prostate [5,52]. En effet, les essais *in vitro* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate, démontrent que les extraits de jus, de la peau et l'huile des pépins de la grenade inhibent l'invasion et la prolifération de ces cellules cancéreuses et induisent en plus leur apoptose. Ces études montrent aussi que la combinaison de différents extraits engendre plus d'effet inhibiteur [5].

Le taux de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) est un marqueur biologique important en cas de cancer de la prostate. Plus le taux de PSA remonte lentement après une thérapie, plus l'espérance de vie est longue. Dans une étude clinique portant sur 48 patients atteints d'un cancer de la prostate, il a été déterminé que le jus de grenade prolonge la période pendant laquelle le taux de (PSA) doublait, de 39 mois, ce qui équivaut pratiquement à un quadruplement [52].

Le jus de grenade et l'extrait de polyphénols de la grenade sont actifs également contre le cancer du côlon [60], du poumon [61], de la peau [61], du sein [61] et contre la leucémie [5].

2.5. Travaux pour la valorisation des polyphénols de grenade

Vue leur importance nutritionnelle et thérapeutique, les différentes parties de la grenade ont fait ces dernières années l'objet de travaux de recherche dans le but de les valoriser. Le tableau 2.6, représente les travaux les plus pertinents.

Tableau 2.6 : Travaux de valorisation des polyphénols de la grenade.

Travaux de valorisation	Références
Fermentation de jus de grenade par des bactéries lactiques	[62]
Fermentation de jus de grenade par des bactéries probiotiques	[63]
Formulation des suppléments alimentaires riches en polyphénols de la grenade	[64]

Conclusion

Depuis une dizaine d'année, le grenadier (*Punica granatum* L.), et son fruit la grenade, font l'objet d'un regain d'intérêt, tant sur le plan médical que sur le plan nutritionnel. En effet, la grenade possède des propriétés antioxydantes supérieures à celles du vin rouge et du thé vert ; et des propriétés anticancéreuses très intéressantes. Malgré que le grenadier, soit une espèce fruitière, peu exigeante sur le plan cultural, et gagnante sur le plan sanitaire, et que sa production locale est en augmentation, elle reste toutefois peu étudiée et peu valorisée à l'échelle nationale.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Problématique

Actuellement, les nutritionnistes et les consommateurs sont de plus en plus conscients de l'impact de l'alimentation sur l'état de santé. Par conséquent, ils sont de nos jours, plus intéressés par les aliments riches en composés bioactifs. À cet ordre d'idée, Il y a depuis une dizaine d'années, un intérêt croissant pour la grenade non seulement parce qu'elle est agréable à manger, mais aussi parce qu'elle est considérée comme un aliment fonctionnel de grand avantage pour la santé humaine. La grenade renferme enfaite, plusieurs groupes de substances bioactives, polyphénols si spécifique. Ces substances sont responsables de la puissante activité antioxydante de la grenade ; et sont également utiles pour la prévention et/ou le traitement des maladies dégénératives telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

La composition physico-chimique de la grenade de différentes variétés a été établie, dans plusieurs pays producteurs. En Algérie, on compte une trentaine de variétés de la grenade de qualités très différentes. Cependant, peu de travaux publiés sur leurs compositions, sont disponibles dans la littérature. Par conséquent, la première partie de ce travail est consacrée à la caractérisation physico-chimique et biochimique de trois cultivars locaux et préalablement sélectionnés par l'ITAFV (Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne), toute en définissant les déterminismes de la qualité nutritionnelle de ce fruit.

La seconde partie du travail se focalise sur la valorisation d'un co-produit de la grenade, riche en polyphénols, notamment la peau ou la pelure. Pour le faire, nous allons tenter l'obtention d'extraits riches en antioxydants, en étudiant quelques facteurs influençants, à savoir le procédé d'extraction et l'éventuelle action synergique entre les extraits. Le schéma suivant représente sommairement les deux cheminements de notre étude.

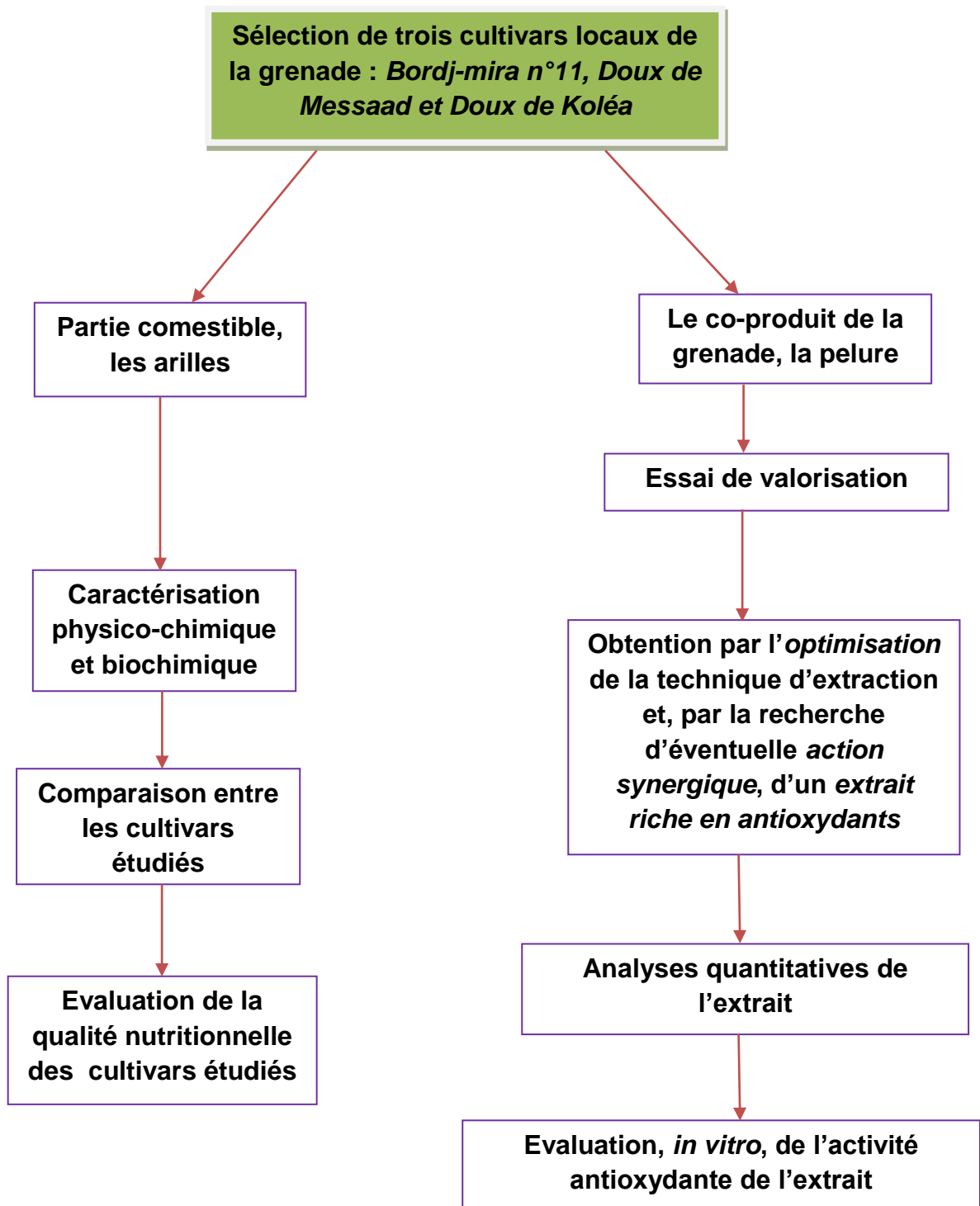


Figure 3.1 : Schéma représentant les deux sections de notre étude.

3.2. Matériel

3.2.1. Matériel biologique

Cette étude va être conduite sur le fruit du grenadier (*Punica granatum* L.), la grenade. Trois cultivars ont été cultivés ensemble dans un seul verger situé à Boufarik, la Wilaya de Blida, région de Mitidja (figure 3.2). Ces cultivars ont été tout d'abord sélectionnés et dénommés par l'ITAFV (*Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne*). Ce sont : Doux de Koléa, Doux de Messaad et Bordj-mira n°11.



Figure 3.2 : Carte de la région de Mitidja de la wilaya de Blida [116].

➤ Nature et préparation des échantillons

Les échantillons des grenades ont été récoltés le mois d'octobre 2013, au stade de maturité. Pour chaque cultivar, l'échantillon considéré est composé de 5 à 10 fruits.

Après récolte, les fruits sont soigneusement recouverts d'un papier aluminium et conservés dans un réfrigérateur, jusqu'au délai des analyses.

3.2.2. Matériel non biologique

L'appareillage utilisé pour les analyses physico-chimiques des fruits, ainsi que les réactifs et produits chimiques sont récapitulés en appendice A.

3.3. Méthodes d'analyses

3.3.1. Caractérisation physico-chimique et biochimique de la pulpe des grenades

3.3.1.1. Critères pomologiques des grenades

Chaque fruit est pesé entier à l'aide d'une balance de précision, à 0.01 g près, pour déterminer le poids moyen (PM) des fruits pour chaque cultivar. Une fois le poids moyen de chacun des cultivars est déterminé, les grenades sont pelées manuellement puis, les écorces et les arilles de chaque cultivar sont pesés séparément, pour déterminer le taux des arilles ou bien entendu le taux de pulpe ou le rendement en pulpe (RP).

Le rendement en pulpe (RP) est calculé par la formule suivante :

$$\text{RP (\%)} = \frac{PA}{PE} \times 100$$

Où : PA est le poids des arilles, et PE est le poids du fruit entier.

3.3.1.2. Détermination de la teneur en eau (NF V 05-108, 1970)

A/ Principe

La teneur en eau ou l'humidité des arilles de grenade est déterminée par séchage d'une quantité d'arilles à 70 ± 2 °C, dans une étuve isotherme et à pression atmosphérique, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Cette méthode thermogravimétrique est considérée comme de référence pour la détermination de la teneur en eau des aliments [65].

B/ Appareillage

- Étuve réglée à 70 ± 2 °C ;
- Dessiccateur garni d'un agent déshydratant efficace ;
- Capsules en porcelaine, en platine ou en verre ;
- Balance de précision.

C/ Mode opératoire

- Après leur nettoyage, sécher les capsules en étuve pendant 15 minutes ;
- Après leur refroidissement dans un dessiccateur, tarer les capsules et peser 5 g d'échantillon, à l'aide d'une balance de précision ;

- Placer les capsules contenant l'échantillon, dans l'étuve réglée à 70 ± 2 °C pour être séchés ;
- Après quelques heures, les capsules sont retirées de l'étuve, refroidies dans un dessiccateur et pesées. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention de poids constants (environ 3 jours de séchage), indiquant le séchage complet de l'échantillon.

D/ Expression des résultats

La teneur en eau ou l'humidité de l'échantillon, est calculée en utilisant la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{M_i - M_f}{M} \times 100$$

Où :

H (%) : Humidité ou teneur en eau ;

M_i : masse initiale de la capsule avec échantillon ;

M_f : masse après séchage, de la capsule avec échantillon ;

M : masse en g de l'échantillon, soit 5 g.

3.3.1.3. Détermination de la teneur en cendres totales (NF V 05-113, 1972)

A/ Principe

Pour le dosage des cendres totales, la totalité de la matière organique des arilles est détruite par incinération des échantillons, dans un four à moufle à 525 ± 25 °C, jusqu'à l'obtention des cendres blanchâtres de poids constant.

B/ Appareillage

- Four à moufle ;
- Étuve ;
- Dessiccateur garni d'un agent déshydratant efficace ;
- Creusets en porcelaine ;
- Balance analytique.

C/ Mode opératoire

- Après nettoyage, placer les creusets une demi-heure dans le four à moufle préalablement réglé à 525 ± 25 °C, pour détruire les traces de matière organique ;

- Après refroidissement dans un dessiccateur, tarer les capsules et peser 5 g d'échantillon, à 0.001 g près, par une balance analytique ;
- Procéder à l'incinération de l'échantillon en mettant les creusets dans le four à moufle à 525 ± 25 °C, durant 5 h, jusqu'à l'apparition de cendres blanchâtres de poids constant ;
- Après refroidissement dans un dessiccateur, peser les creusets contenant les cendres, à la précision de 0.001 g.

D/ Expression des résultats

La teneur en cendres est calculée par la formule suivante :

$$TC(\%) = \frac{Pf - Pi}{m} \times 100$$

Où :

Pf : poids de l'échantillon après incinération ;

Pi : poids de l'échantillon avant incinération ;

m : poids de la prise d'essai.

3.3.2. Extraction et caractérisation de jus

Les pelures des grenades sont éliminées manuellement, et laissées sécher à l'air libre pour utilisation ultérieure. Les jus sont extraits à partir des arilles de trois variétés séparément, à l'aide d'un extracteur domestique. Après leur extraction, Les jus obtenus seront quantifiés afin de déterminer le rendement en jus pour chaque cultivar.

Pour ce faire, une quantité de 100 g d'arilles de chaque cultivars est extraite, est le jus obtenus est pesé. Le rendement en jus (RJ) est ensuite calculé par la relation suivante :

$$RJ(\%) = \frac{PJ}{PA} \times 100$$

Avec : PJ = Poids en (g) de jus extrait à partir de 100 g d'arilles ; et PA = Poids des arilles soumises à l'extraction, soit 100 g.

Les jus extraits de trois cultivars, feront l'objet de caractérisation physico-chimique et biochimique dans la section suivante.

3.3.2.1. Détermination du taux des solides solubles (TSS)

A/ Définition et principe

Le (TSS) ou (degré Brix), représente conventionnellement le taux de matière sèche soluble de jus. Sa détermination est faite par lecture réfractométrique directe d'une aliquote de jus.

B/ Appareillage

- Réfractomètre.

C/ Mode opératoire

- Allumer le réfractomètre et procéder au nettoyage du prisme fixe par l'eau distillée ;
- Etalonner le refractomètre avec de l'eau distillée, dont le °Brix est égale à zéro ;
- Etaler une aliquote de jus sur le prisme fixe, et lire la valeur du °Brix sur son échelle graduées en ajustant la zone sombre du champ visuel.

D/ Expression des résultats

La teneur en matière sèche soluble des jus, est exprimée en °Brix. Trois déterminations sont effectuées sur le même échantillon analysé.

3.3.2.2. Détermination de l'acidité titrable (NF V 05-101, 1974)

A/ Définition et principe

L'acidité titrable représente l'ensemble des acides organiques du jus, tels que les acides citrique, malique et tartrique. Elle est déterminée par titrage de jus par une solution titrée d'hydroxyde de sodium NaOH à 0.1N. Ainsi, le titrage peut se faire par méthode colorimétrique en présence d'indicateur coloré comme la phénolphtaléine, ou par méthode potentiométrique dont le point final du titrage est repéré par pH-mètre.

B/ Appareillage et réactifs

- Burette graduée pour la titration ;

- Solution titrée d'NaOH à 0.1N, préparée par dissolution de 4 g d'NaOH dans un litre d'eau distillée.
- Indicateur coloré, la phénolphtaléine.

C/ Mode opératoire

- Etant donné que le jus de grenade est de couleur rose, le virage donc de la couleur de phénolphtaléine est difficilement repéré. Comme solution, on procède à la dilution 1/20 de jus avec de l'eau distillée. L'avantage de ceci est la réduction de la quantité d'NaOH utilisé.
- Prélever dans un bécher, 100 ml de jus dilué. Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine, et titrer par la solution d'NaOH à 0.1N jusqu'au virage de la couleur au rose pale, persistant 30 secondes.

D/ Expression des résultats

Calculer le taux d'acidité titrable de jus, en utilisant la relation suivante :

$$\text{Au point d'équivalence : } C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Où :

C1, est la concentration d'NaOH utilisé soit, 0.4 g/100 ml ;

V1, est le volume en ml de la solution d'NaOH nécessaire à la titration ;

C2, est la teneur en acidité titrable recherchée en milliéquivalent par 100 ml de jus dilué, qui représente le volume V2. Multiplier le résultat trouvé par le facteur de dilution 20. Pour exprimer l'acidité titrable en gramme d'équivalent acide citrique par 100 ml de jus frais, multiplier le résultat précédant par le facteur 0.75.

3.3.2.3. Détermination de la teneur en sucres hydrosolubles totaux

A/ Principe

Les sucres simples, les oligosaccharides, les polysaccharides ainsi que leurs dérivés, donnent une coloration jaune orangée lorsqu'ils sont traités par phénol et acide sulfurique concentré. L'absorbance de la coloration à 490 nm est proportionnelle à la quantité des sucres en solution. La réaction est sensible et la couleur jaune orangée formée est stable [66].

La réaction commence par déshydratation des sucres en milieu acide (acide sulfurique concentré) et à chaud (équation 3.1). À la suite de cette réaction des dérivés furanes se forment à partir des sucres initiaux. Ces dérivés (figure 3.3) se

condensent entre elles et avec le phénol ou ses dérivés : résorcinol, orcinol et *n*-naphthol, générant ainsi des complexes colorés utiles pour le dosage colorimétrique des sucres [67].

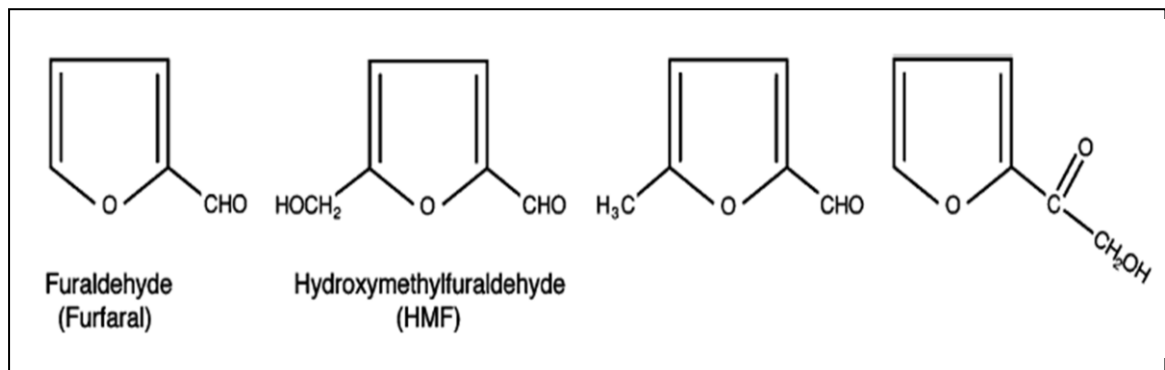
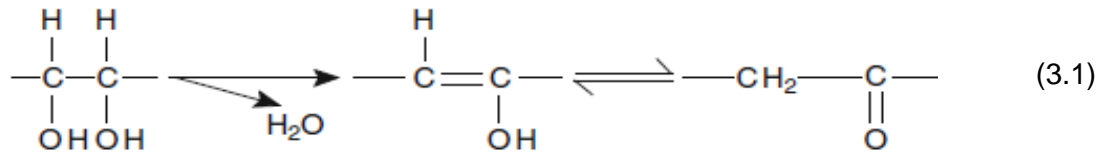


Figure 3.3 : Les dérivés furanes formés par déshydratation des sucres [67]

B/ Appareillage et réactifs

- Spectrophotomètre UV-Visible ;
- Acide sulfurique concentré 75 à 98 %;
- Phénol, solution aqueuse à 5 % (P/V) ;
- Glucose pour la préparation de la solution standard.

C/ Mode opératoire

- Pour la préparation de la gamme d'étalonnage, dissoudre 0.01 g de glucose dans 100 ml d'eau distillée, prélever en suite de cette solution, 4 ml dans une fiole jaugée et compléter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée. La solution mère à 80 µg/ml est ainsi préparée ;
- Préparer les solutions diluées dans une série de tubes à essais, en prélevant des volumes de 0.9 à 0.1 ml à partir de la solution mère, et compléter à chaque fois le volume à 1 ml avec de l'eau distillée ;
- Ajouter dans chaque tube à essai, 1 ml de phénol à 5 % et agiter soigneusement ;
- Ajouter ensuite, sous la hotte, 5 ml d'acide sulfurique concentré ;

- Vortexer les tubes, et laisser incuber au bain marie 10 min à 30 °C ;
- Diluer les jus à 1/10000 par l'eau distillée, en prenant de chaque échantillon de jus 0.1 ml et en complète le volume à 100 ml, puis 1 ml de cette solution est prélevé et complétée à 10 ml ;
- Ajouter à 1 ml de prise d'essai de chaque jus, 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré et procéder à l'incubation comme çï-avant ;
- Lire les absorbances des échantillons et de la gamme étalon à 490 nm, contre un blanc constitué de 1 ml d'eau distillée, 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré.

D/ Expression des résultats

Les teneurs des jus en sucres solubles totaux exprimées en g/100 ml de jus frais (g/100 ml MF), sont calculées par la courbe d'étalonnage de glucose, qui porte les absorbances en fonction des concentrations de glucose, en prenant en compte le facteur de dilution de 10000. Trois répétition d'analyse est faite pour chaque échantillon.

3.3.2.4. Détermination de la teneur en protéines des jus

A/ Principe

La méthode de Lowry *et al.* (1951) pour le dosage des protéines, est utilisée pour sa grande sensibilité et spécificité. Elle combine d'une part, la réaction de biuret (figure 3.4), c'est-à-dire la complexation des ions cuivriques avec les liaisons peptidiques des protéines, en milieu alcalin, et d'autre part, la réduction du réactif des phénols dit Folin-Ciocalteu (complexe d'acide phosphomolybdique et phosphotungstique) par les résidus d'acides aminés tyrosine et tryptophane (figure 3.5) contenus dans la chaîne protéique. La couleur bleue produite par cette réaction absorbe à 750 nm pour des solutions à faibles concentrations en protéines et à 500 nm pour des solutions à fortes concentrations en protéines [69].

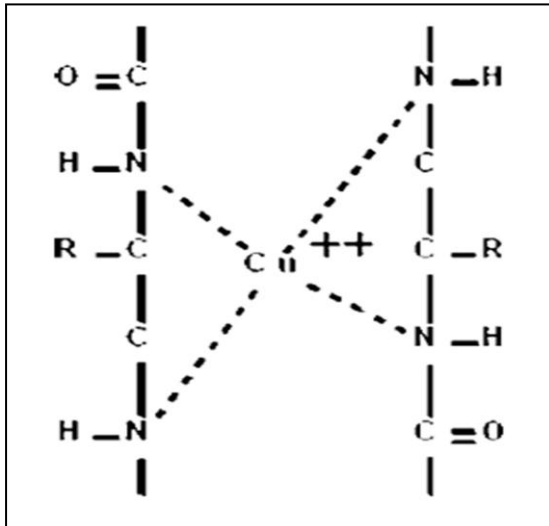


Figure 3.4 : Interaction des ions Cu^{++} avec les liaisons peptidiques [69].

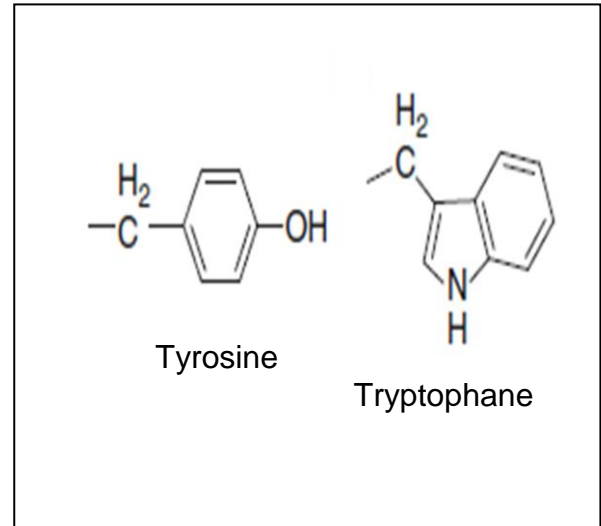


Figure 3.5 : Acides aminés à noyaux phénoliques réagissant avec le réactif du Folin-Ciocalteu [69].

B/ Réactifs et appareillage

- Réactif A : dissoudre 2 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans 100 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0.1N ;
- Réactif B : dissoudre 0.5 g de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml de solution de tartrate double de sodium-potassium (K Na Tartrate) à 1 % ;
- Réactif C (solution cuivrique alcaline): mélanger 50 ml de réactif A avec 1 ml de réactif B. Conserver la solution 24 h avant utilisation ;
- Réactif D : diluer le réactif de Folin-Ciocalteu à $\frac{1}{2}$ avec de l'eau distillée ;
- Solution standard de sérum albumine : Diluer le sérum humain a 1/1000 dans l'eau distillée, pour avoir une solution mère d'albumine à 70 $\mu\text{g/ml}$ [66].

Remarque : c'est la substance standard dite sérum albumine bovine (SAB) qui est utilisée actuellement [69].

- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

- Diluer les échantillons de jus à 1/100 avec de l'eau distillée ;
- Préparer une gamme d'étalonnage à partir de la solution mère d'albumine à 70 $\mu\text{g/ml}$ en prélevant 0.8 ml dans le premier tube à essai, 0.6 ml dans le

deuxième et 0.4 ml dans le troisième et ainsi de suite jusqu'au dernier tube à essai qui ne contient que de l'eau distillée, c'est le blanc.

- Compléter ensuite les volumes à 1 ml avec de l'eau distillée ;
- À 0.2 ml de chaque tube à essai (tubes échantillons et gamme d'étalonnage), ajouter 1 ml de réactif C, vortexer les tubes et laisser incuber 10 minutes à température ambiante ;
- Après incubation ajouter dans chaque tube 0.1 ml de réactif D, mélanger bien et incuber 30 minutes à l'obscurité ;
- Lire l'absorbance à 750 nm contre un blanc constitué d'eau distillée et de réactifs.

D/ Expression des résultats

La teneur d'un jus en protéine est déterminée en se basant sur la courbe d'étalonnage de l'albumine, qui porte les absorbances en fonction de différentes concentrations en albumine. Les teneurs sont exprimées en g/100 ml de jus frais (g/100 ml MF).

3.3.2.5. Dosage de la vitamine C

A/ Principe

En présence de l'indicateur coloré d'oxydo-réduction dit : 2,6-DiChloroIndoPhénol (DCIP), la vitamine C ou l'acide L-ascorbique est oxydée en acide L-déshydroascorbique (figure 3.6). Au point final de cette réaction l'excès non-réduit de l'indicateur DCIP apparait rose en milieu acide [70].

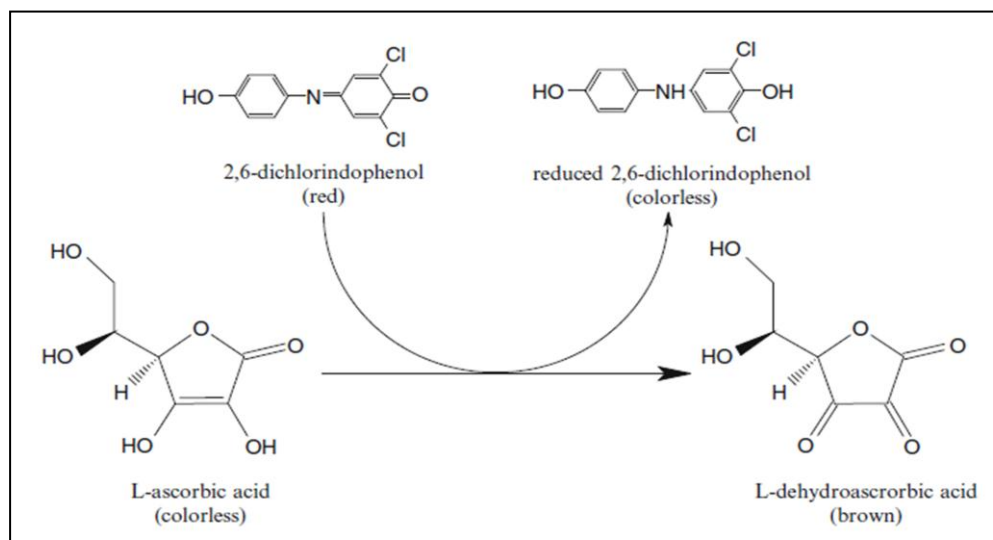


Figure 3.6 : Réaction chimique entre l'acide L-ascorbique et l'indicateur coloré DCIP [70]

B/ Réactifs et appareillage

- Solution aqueuse d'acide oxalique à 1 % ;
- Solution aqueuse de 2,6-dichloroindophénol à 0.0025 %.
- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole utilisé est décrit par Allane. (2009) et Arendse *et al.* (2014) et modifié :

- Mélanger 0.5 ml de jus avec 15 ml d'acide oxalique à 1 %. Après 1h d'extraction le mélange est centrifugé 15 minutes à 3000 tpm ;
- 1 ml de surnageant est mélangé avec 9 ml de DCIP à 0.0025 %, et après mélange pendant 5 secondes l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 515 nm ;
- Préparer à partir d'une solution aqueuse mère d'acide L-ascorbique à 40 mg/100 ml, une gamme d'étalonnage en prélevant dans le premier tube à essai 0.8 ml, 0.6 ml dans le deuxième et 0.4 ml dans le troisième et ainsi de suite jusqu'au dernier tube exempt d'acide L-ascorbique ; et compléter à la fin les volumes à 1 ml avec de l'eau distillée ;
- À 1 ml de chaque tube ajouter 9 ml de DCIP, et lire l'absorbance à 515 nm contre un blanc constitué de 1 ml d'eau distillée et 9 ml de DCIP.

D/ Expression des résultats

Les teneurs des jus en vitamine C exprimées en mg/100ml de jus frais (mg/100 ml MF), sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide L-ascorbique, qui présente une allure décroissante (appendice C).

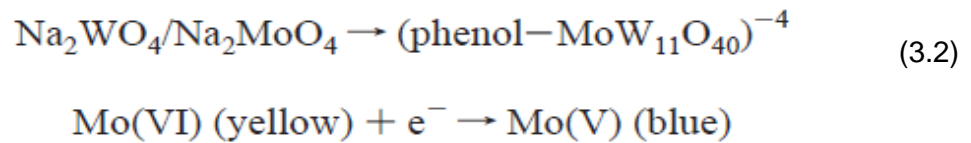
3.3.3. Analyses des composés phénoliques des jus

3.3.3.1. Dosage des polyphénols hydrosolubles totaux

A/ Principe

Le réactif utilisé conventionnellement pour le dosage des polyphénols totaux ou les composés phénoliques totaux, est appelé réactif de Folin-Ciocalteu. C'est un complexe des acides phospho-molybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et phospho-tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) de couleur jaune. L'oxydation en milieu alcalin des polyphénols par ce réactif, entraîne la formation d'un nouveau complexe

molybdène-tungstène de couleur bleu (équation 3.2), qui absorbe la lumière visible entre 725 et 765 nm [48].



Cette méthode qui a été développée en 1927 pour l'analyse de la tyrosine, est simple, sensible et précise. Cependant, elle souffre d'un certain nombre de substances réductrices interférente telles que : les sucres, les amines aromatiques, le dioxyde de soufres et sulfites, l'acide ascorbique, les réductones, les acides organiques et le fer (Fe^{+2}) [73].

B/ Réactifs et appareillage

- Réactif de Folin-Ciocalteu : diluer le réactif de Folin-Ciocalteu commercial à 1/10 avec de l'eau distillée ;
- Solution aqueuse de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5 % ;
- Substance étalon : l'acide gallique est le plus communément utilisé, mais d'autres composés phénoliques disponibles peuvent être utilisés (acide tannique, acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchuique, acide vanillique et acide férulique).
- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par Hmid *et al.* (2013) :

- Préparer une solution étalon mère d'acide gallique à 200 mg/100 ml d'eau distillée ;
- Préparer une gamme d'étalonnage à partir de cette solution mère en faisant par passage d'un tube à l'autre, une dilution $\frac{1}{2}$.
- 0.3 ml de chaque tube est mélangé avec 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué, et avec 1.2 ml de carbonate de sodium à 7.5 %. Le mélange est ensuite incubé 90 min à l'obscurité.

- Diluer les échantillons de jus à 1/100 avec l'eau distillée. Prélever de chaque échantillon dilué 0.3 ml et mélanger avec 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué et avec 1.2 ml de carbonate de sodium à 7.5 %.
- Après incubation lire les absorbances à 760 nm.

D/ Expression des résultats

Les teneurs des jus en polyphénols hydrosolubles totaux sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme d'Equivalent Acide Gallique par 100 ml ou par litre de jus frais (mg EAG/100 ml MF).

3.3.3.2. Dosage des tannins hydrolysables

A/ Principe

Les tannins hydrolysables sont composés d'esters d'acide gallique (figure 3.7). C'est galloyl-esters ou esters d'acide gallique réagissent avec l'iodate de potassium (KIO_3) pour développer une coloration rouge stable, qui absorbe la lumière visible entre 500 nm et 550 nm [75] (figure 3.8). Le temps nécessaire pour que la coloration rouge apparaisse varie d'un matériel végétal à autre [76].

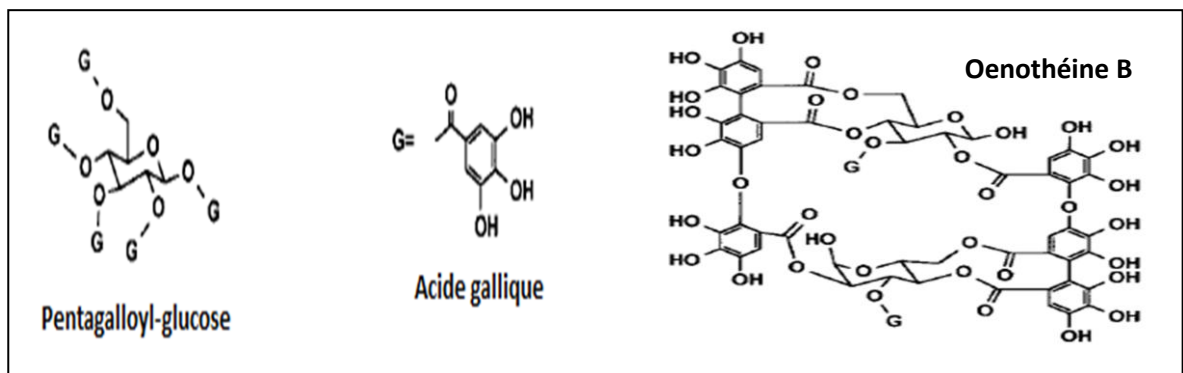


Figure 3.7 : Exemples de tannins hydrolysables [75].

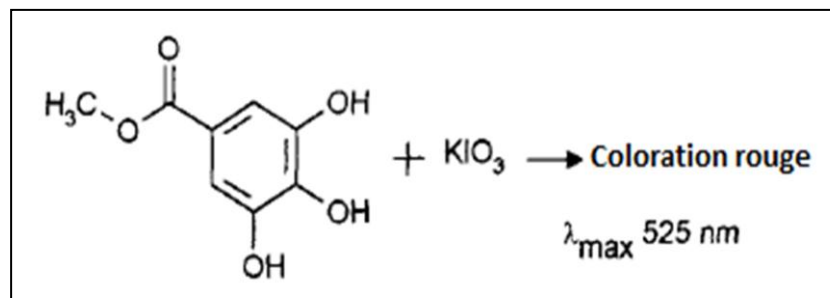


Figure 3.8 : Réaction entre les galloyl-esters des tannins hydrolysables et l'iodate de potassium [75].

B/ Réactifs et appareillage

- Solution aqueuse d'iodate de potassium (KIO_3) à 2.5 % ;
- Substance étalon : l'acide tannique (figure 3.9).
- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

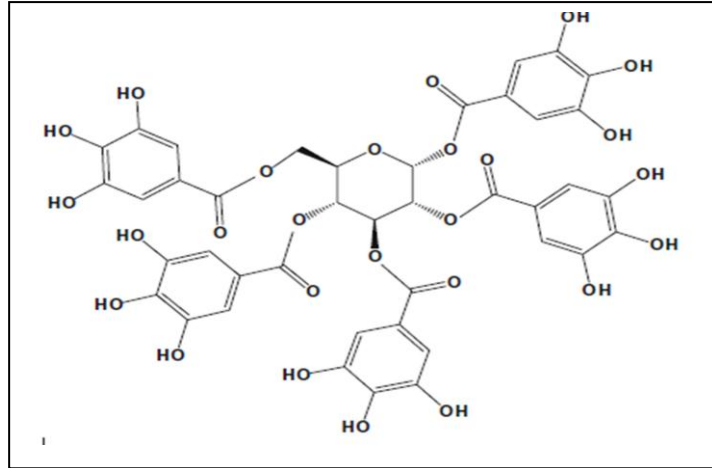


Figure 3.9 : Structure de l'acide tannique [76]

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par Willis et Allen. (1998) :

- Préparer une solution standard mère d'acide tannique à 21 mg/100 ml d'eau distillée, et préparer à partir de cette solution mère une gamme d'étalonnage. Il est conseillé de ne pas préparer une gamme d'étalonnage de plus de 5 concentrations ;
- Diluer les échantillons de jus à 1/20 avec l'eau distillée ;
- Mélanger dans des tubes à essais, 1 ml d'échantillon ou de solution d'acide tannique avec 5 ml de solution d'iodate de potassium à 2.5 % ;
- L'apparition de la couleur rouge n'est pas instantanée, procéder donc à l'incubation des tubes à la température ambiante, jusqu'à la stabilisation de la couleur.
- Mesurer les absorbances à 550 nm contre un blanc constitué de 1 ml d'eau distillée et 2.5 ml de KIO_3 à 2.5 %.

Remarque : le temps nécessaire à la stabilisation de la coloration rouge pour notre échantillon, a été estimé à 2 h près.

D/ Expression des résultats

Les teneurs en tannins hydrolysables des jus sont calculées par référence à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en milligramme d'Equivalent Acide Tannique par 100 ml de jus frais (mg EAT/100 ml MF).

3.3.3.3. Dosage des flavonoïdes

A/ Principe

Le dosage des flavonoïdes fait intervenir leur faculté à former des complexes avec les ions métalliques tels que l'aluminium (Al^{+3}) (voir appendice B). Dans la méthode de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), une solution de chlorure d'aluminium entre 2 et 10 % (P/V) est ajoutée à l'échantillon en présence de l'eau, de solution d'acétate ou de méthanol. La mesure de l'absorbance se fait après 2 à 60 minutes de l'addition du chlorure d'aluminium, à des longueurs d'ondes comprises entre 404 et 430 nm [77].

Différents composés flavonoïdes peuvent être utilisés comme standard pour établir la courbe d'étalonnage tels que les flavonols (quercétine, rutine, quercétrine et galangine) ou les flavan-3-ols (catéchine). Cependant et malgré que cette méthode est largement employée, elle n'est spécifique que pour les flavonols et flavone lutéoline [77].

B/ Réactifs et appareillage

- Chlorure ou trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) : solution méthanolique à 2 % ;
- Substance étalon : quercétine ;
- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par Hmid *et al.* (2013) avec modifications :

- Diluer les échantillons de jus à 1/100 avec l'eau distillée ;
- À partir d'une solution mère de quercétine à 60 mg/100ml dans le méthanol, préparer une gamme d'étalonnage ;
- Mélanger 1 ml d'échantillon (jus dilués et solutions de quercétine) avec 2 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % ;

- Après incubation 15 minutes à température ambiante, mesurer les absorbances à 430 nm contre un blanc constitué de 1 ml d'eau distillée et 2 ml de AlCl_3 à 2 %.

Remarque : la réaction du AlCl_3 avec la quercétine donne une coloration jaunée-dorée, mais avec le jus de grenade la coloration est rose foncée. Cela est peut-être dû à la présence des anthocyanes dans le jus.

D/ Expression des résultats

Les teneurs des jus en flavonoïdes sont calculées en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'Equivalent Quercétine par 100 ml de jus frais (mg EQ/100 ml MF).

3.3.3.4. Dosage des anthocyanes

A/ Principe

Les anthocyanes ou anthocyanines sont des pigments qui changent de couleur en fonction de pH du milieu [2]. Cette propriété est impliquée dans le dosage des anthocyanes par la méthode de pH-différentiel, qui mesure la différence d'absorbances dans deux tampons de pH différents : un tampon KCl à pH1.0 (0.025 M) et un tampon acétate de sodium à pH4.5 (0.4 M) [48].

B/ Réactifs et appareillage

- Tampon KCl de pH1 à 0.025 M (1): une solution aqueuse de chlorure de potassium (KCl) à 0,025 M sert de premier réactif. On ajuste ensuite le pH de cette solution jusqu'à la valeur 1 ± 0.1 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 6 N [78].
- Tampon acétate de sodium (CH_3COONa) de pH4.5 à 0.4 M (2): une solution aqueuse d'acétate de sodium à 0,4 M sert de second réactif. Le pH de cette solution est ensuite ajusté à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 6 N jusqu'à la valeur de $4,5 \pm 0.1$ [78].
- Appareillage : spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par Hmid *et al.* (2013) :

- Un volume de 0.4 ml de jus est mélangé à 3.6 ml du tampon KCl (1) ensuite 0.4 ml autre, au tampon acétate de sodium (2). Les solutions sont incubées

pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et les absorbances sont ensuite successivement mesurées à 510 et 700 nm.

- La variation de l'absorbance est calculée par la formule suivante :

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

Avec :

ΔA : est la différence des absorbances;

A_{510} : est l'absorbance à 510 nm ;

A_{700} : est l'absorbance à 700 nm.

D/ Expression des résultats

Les teneurs des jus en anthocyanes exprimées en milligramme d'Equivalent Cyanidine-3-glycoside par 100 ml de jus frais (mg ECG/100 ml MF), sont calculées par l'application de la formule suivante :

$$TA \left(\text{mg} \frac{\text{ECG}}{\text{L}} \text{MF} \right) = \frac{\Delta A \times Mm \times Df \times 1000}{Ma}$$

Avec :

TA : est la teneur en anthocyanes en mg ECG/L MF.

Mm : est la masse moléculaire de la cyanidine-3-glycoside = 449.2 g/mol.

Df : est le facteur de dilution de l'échantillon = 10 (car on a mélangé 0.4 ml de l'échantillon avec 3.6 ml de solution tampon).

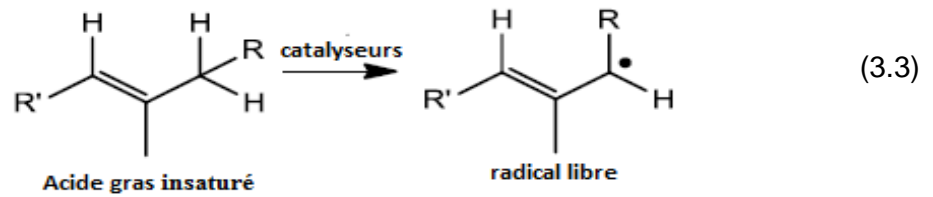
Ma : est le coefficient d'absorption molaire de la cyanidine-3-glycoside = 26900.

3.3.4. Analyses de l'activité antioxydante des jus

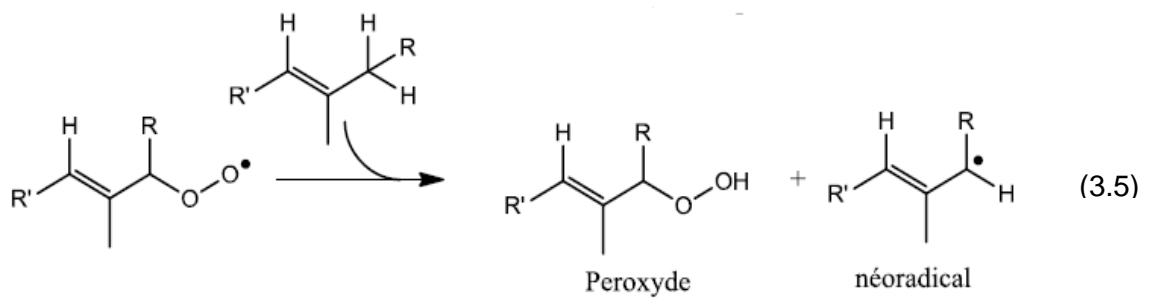
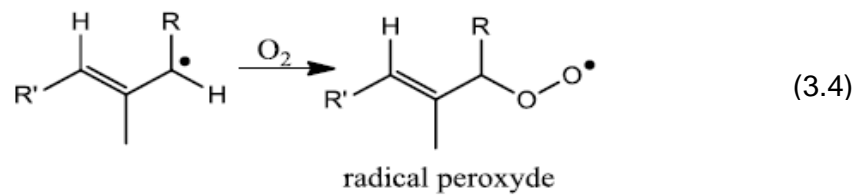
3.3.4.1. Généralités sur le phénomène d'oxydation

Les mécanismes d'oxydations des composés biologiques insaturés (acides gras insaturés surtout) sont souvent des réactions radicalaires (ce sont des réactions qui produisent des radicaux libres) avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases principales [48]:

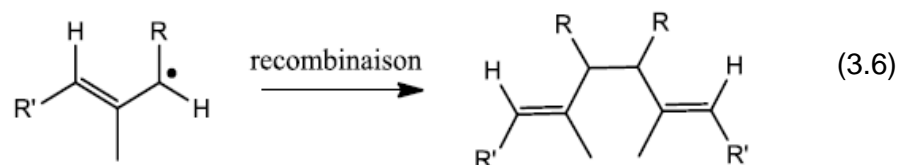
- *La phase d'initiation* : la phase d'initiation correspond à la formation d'un premier radical libre encore appelé précurseur radicalaire. Cette étape est favorisée par la présence des rayonnements et d'un catalyseur (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni, etc.). Le schéma suivant illustre cette étape d'initiation [48]:



- *La phase de propagation* : durant cette phase l'oxygène de l'air (O₂) se fixe sur le radical libre ce qui forme un radical peroxyde, qui réagit avec une autre molécule et conduit à un nouveau radical libre et un hydroperoxyde :



- *La phase de terminaison* : La phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux formés. Généralement, ce processus conduit à la formation des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des acides, des esters, des peroxydes, mais aussi à des produits de polymérisation. Ces composés sont responsables à la détérioration de la qualité organoleptique du corps gras [48]:



Les phénomènes d'oxydation affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir un impact sur la santé du consommateur. En effet, l'oxydation est mise en cause selon les tendances

scientifiques actuelles, dans le vieillissement des tissus biologiques et ainsi dans de nombreuses pathologies [52].

3.3.4.2. Généralités sur les méthodes de mesure de l'activité antioxydante

Les méthodes *in vitro* d'évaluation de l'activité antioxydante d'un aliment ou d'un extrait biologique sont nombreuses. Elles peuvent être classées selon le mécanisme réactionnel mise en jeu, en deux grandes catégories : une catégorie de méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène, et une autre catégorie de méthodes basées sur le transfert d'électron singulé. Tous les deux mécanismes peuvent se dérouler dans le même système, et c'est fonction de la structure de l'antioxydant impliqué. L'efficacité d'un antioxydant ou bien sa capacité donatrice d'électron et d'hydrogène, dépend de l'énergie de dissociation des liaisons O-H et du potentiel d'ionisation du composé antioxydant [79].

Parmi les méthodes d'analyses basées sur le transfert d'hydrogène on cite : le test de DPPH (2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl), le test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) et le test TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) ; et parmi celles qui sont basées sur le transfert d'électron on distingue : le test FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*), test de Folin-Ciocalteu (c'est le même principe du dosage des polyphénols), le test TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) et le test CUPRAC (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*) [79].

3.3.4.3. Détermination de l'activité antioxydante des jus par le test de DPPH

A/ Définition et principe

Le test de DPPH est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. Le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (figure 3.10).

Dans la réaction ci-dessous (3.7), le radical DPPH est représenté par Z• et la molécule du donneur d'hydrogène (antioxydant) par AH, la réaction primaire est :



ZH est la forme réduite du radical DPPH•. Compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et/ou éthanol) [48].

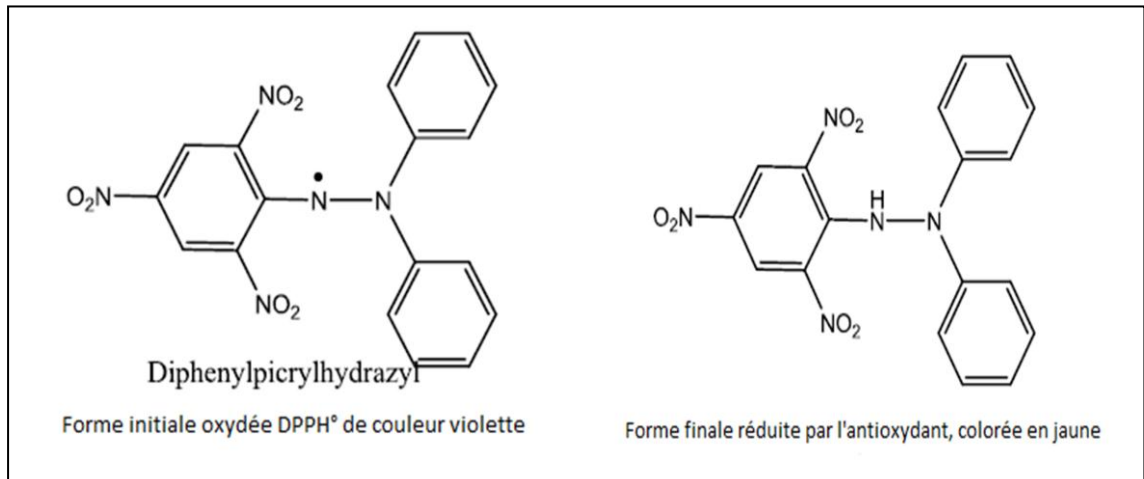


Figure 3.10 : Réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH [48]

B/ Réactifs et appareillage

- Méthanol absolu ;
- Solution méthanolique de DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) : dissoudre 0.024 g de DPPH commercial (*DPPH free radical*) dans 1L de méthanol. Conserver la solution au congélateur et à l'abri de la lumière. Il est préférable d'utiliser une solution fraîchement préparée, car l'absorbance de la solution diminue avec le temps, sous l'effet de la température et la lumière [79].
- Micropipette ;
- Cuvettes micro, ces des cuvettes de mesure spectrophotométrique de 1 ml de capacité. L'utilisation de ce type de cuvette occasionne la réduction de la consommation de réactifs.
- Spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par Hmid *et al.* (2013) avec réduction des volumes :

- Mélanger 25 µl de jus dilué à 1/100 dans l'eau distillée avec 975 µl de solution méthanolique de DPPH. Porter ce mélange dans une cuvette micro

(de 1 ml de capacité) et laisser le s'incuber 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- Après l'incubation, lire l'absorbance du mélange à 517 nm (absorbance de l'échantillon), contre la solution méthanolique de DPPH (absorbance du contrôle).

D/ Expression des résultats

L'activité antioxydante d'un échantillon est exprimée en pourcentage d'inhibition ou de réduction du radical DPPH (%). Ce pourcentage (PI) se calcule par la formule suivante :

$$PI (\%) = \frac{Abs (contrôle) - Abs (échantillon)}{Abs (contrôle)} \times 100$$

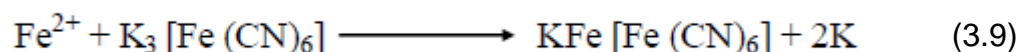
3.3.4.4. Détermination du pouvoir réducteur de jus ou méthode (FRAP)

A/ Définition et principe

La détermination de l'activité antioxydante par la méthode du pouvoir réducteur, indique l'aptitude de l'échantillon ou de l'extrait antioxydant à réduire le fer(III) en fer(II), contenu dans le chlorure ferrique ($FeCl_3$). Ce mécanisme est connu par la capacité donatrice d'électron caractéristique des antioxydants polyphénoliques [71].



Par l'ajout d'un antioxydant ou d'un réducteur à la solution de chlorure ferrique, le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} , ce dernier réagit avec l'hexacyanoferrate de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$ et à la suite de cette réaction la coloration du milieu passe du jaune brun au bleu de Prusse [71].



B/ Réactifs et appareillage

- Tampon phosphate (0.2 M, pH6.6) ;
- Solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium à 1 % ;
- Solution d'acide trichloracétique à 10 % ;
- Solution aqueuse de chlorure ferrique à 0.1 % ;

- Appareillage : centrifugeuse, bain marie pour l'incubation et spectrophotomètre UV-visible.

C/ Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit par [71] :

Un volume 1 ml de jus est mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH6,6) et 2,5 ml de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$ à 1 %. Après 30 minutes d'incubation à 50 °C, 2,5 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10 % est ajoutée et le mélange est ensuite centrifugé pendant dix minutes. Une aliquote (2,5 ml) du surnageant est combiné avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1 % puis l'absorbance est mesurée à 700 nm. Une absorbance élevée indique une activité antioxydante élevée.

D/ Expression des résultats

L'activité antioxydante de jus est exprimée en absorbances à 700 nm, plus l'absorbance est élevée, plus puissante est l'activité antioxydante.

3.3.5 Valorisation des pelures des grenades (co-produit) par l'extraction des polyphénols

3.3.5.1 Généralité sur les procédés d'extraction des polyphénols

L'isolement et la caractérisation des composés phénoliques connus généralement comme « composés bioactifs » constituent un sujet de recherche très actuel. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Cet intérêt particulier est dû au fait qu'au cours des dernières années, le consommateur a commencé à se réorienter vers l'utilisation de produits naturels au détriment de ceux issus de la synthèse chimique. De plus, les résultats des études épidémiologiques mettent en évidence la capacité de ces composés bioactifs à participer au bon déroulement des fonctions vitales de l'organisme humain. Les multiples effets bénéfiques de ces composés issus de sources naturelles sont attribués à leurs diverses activités biologiques, en particulier l'activité antioxydante [80].

À cause de son utilisation facile et de son efficacité relativement élevée, l'extraction solide-liquide reste la technique la plus répandue pour la récupération et l'isolement des composés bioactifs. Réalisée à l'aide d'un solvant, l'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière, qui se réalise principalement par diffusion moléculaire [80].

L'extraction solide-liquide des polyphénols et d'autres composés bioactifs, de matériel végétal, implique le transfert d'un ou de plusieurs solutés du solide (dans notre cas c'est les polyphénols contenus dans la pelure de grenade) vers un solvant tel que l'eau, l'éthanol, le méthanol et l'acétone, pur ou en mélange. Le plus souvent la nature de solutés récupérés est inconnue et la totalité de solutés constitue ce qu'on appelle « un extrait » [81,82,80].

Pendant l'extraction, la concentration des solutés à l'intérieur du matériel végétal varie conduisant à des conditions non stationnaires ou instables. Toute une série d'étapes progressives se déroule pendant la période du contact du produit contenant les particules d'intérêt avec le solvant qui réalise l'extraction. La figure 3.11, illustre schématiquement les étapes de l'extraction solide-liquide.

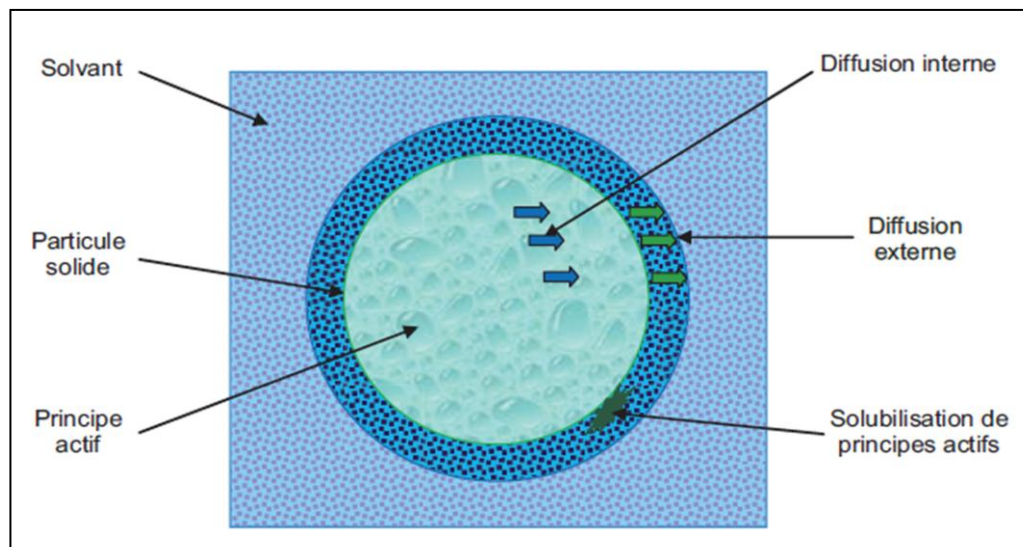


Figure 3.11 : Schématisation des étapes de l'extraction solide-liquide [80].

Ces étapes impliquent [80] :

1. La pénétration du solvant dans la matrice végétale solide ;
2. La solubilisation et/ou la décomposition de constituants ;
3. Le transfert des solutés vers l'extérieur de la matrice solide ;

4. La migration des solutés extraits de la surface externe de la matrice solide vers le solvant ;
5. La séparation de solutés de la matrice solide.

Comme résultat de ces phénomènes, l'extraction peut être exprimée en termes de masse de solutés dissous par unité de temps, ou plus communément, comme un échange de la concentration en solutés du solide par unité de temps [80].

Plusieurs techniques ou procédés sont groupés dans cette notion d'extraction solide-liquide. Ces techniques peuvent être classées en deux grandes catégories : la première catégorie englobe les techniques d'extraction conventionnelles ou classiques, tels que la macération, la décoction, l'infusion, la lixiviation, la percolation, la digestion et autres. Par ailleurs, on concerne par la deuxième catégorie les techniques innovantes ou nouvelles, tels que l'extraction solide-liquide assistées par micro-ondes, par ultrasons, par hautes pressions ou par solvant pressurisé, extraction par fluide supercritique, etc [80].

Les techniques d'extraction qu'on a choisie dans ce travail sont, la macération, la décoction et l'infusion. Le choix a été orienté vers ces techniques, car elles sont les plus simples et les plus appliquées tant à l'échelle culinaire qu'à l'échelle industrielle ; les résultats donc recueillis de ce travail peuvent être utiles pour l'industrie agroalimentaire et au même titre, pour le consommateur :

- La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température généralement ambiante [48]. La technique est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, le ratio entre la masse de l'échantillon végétal et le volume du solvant, la durée d'extraction, etc. Après un prétraitement de l'échantillon (essentiellement le séchage et le broyage), la macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant

environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint [80].

- La décoction consiste à effectuer l'extraction à la température d'ébullition du solvant. Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le chauffage du solvant n'est pas nécessaire [48,80].
- L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Les termes décoction et infusion désignent aussi les boissons préparées par ces méthodes, comme les tisanes et le thé par exemple [48,80].

3.3.5.2. Extraction par macération des polyphénols des pelures

A/ Prétraitement des pelures

Les pelures de trois variétés étudiées ont été séchées à l'air libre, et broyées à l'aide d'un broyeur de laboratoire. Les poudres fines ainsi obtenues ont été conservées dans des récipients plastiques placés dans un endroit sec et à température ambiante.

B/ Méthode d'extraction hydro-alcoolique

Avant de procéder à l'étude des facteurs qui régissent la macération, et juste dans le but de comparer les teneurs de différents polyphénols (polyphénols totaux, tannins hydrolysables et flavonoïdes) des pelures avec celles des jus, la macération cette fois ci est effectuée suivant la méthode décrite comme efficace par Macheix *et al.* (2005) [2]. Ainsi, 3 g de poudre de pelure de chaque variété sont soumises séparément à l'extraction par un volume de 50 ml de solvant constitué d'un mélange (méthanol, eau distillée à 80 : 20 V/V) ; ce mélange recouvert de papier aluminium, est porté à ébullition une demi-heure sous agitation permanente. Une fois l'extraction est terminée, le mélange est filtré et l'extrait récupéré est conservé au réfrigérateur.

Par la suite, une comparaison a été faite entre la macération alcoolique, aqueuse et à mélange ternaire de solvants : eau, éthanol et méthanol.

C/ Méthodes d'extraction alcoolique, aqueuse et à trois solvants

Pour ces trois méthodes 1 g d'échantillon de chaque variété est macéré pendant une heure, avec 100 ml d'éthanol absolu, avec 100 ml d'eau distillée et avec 100 ml d'un solvant formé de (1/3 eau distillée, 1/3 éthanol et 1/3 méthanol), pour les extractions alcoolique, aqueuse et à trois solvants respectivement.

3.3.5.3. Extraction par décoction et infusion

A/ Décoction

Le mélange d'un gramme d'échantillon de chaque variété avec 100 ml d'eau distillée est porté à ébullition durant 15 minutes. Par la suite, l'extrait a été récupéré après refroidissement de la préparation.

B/ Infusion

Un gramme de chaque échantillon est extrait avec 100 ml d'eau récemment bouillie, jusqu'au refroidissement de l'eau.

3.3.5.4. Étude de la macération par la méthode des plans d'expériences

A/ Généralités sur les plans d'expériences et introduction au plan choisi

L'industrie agroalimentaire, qui était toujours devant l'amélioration ou la création d'un nouveau produit, accorde ces dernières années une place importante à l'organisation des essais expérimentaux. La démarche traditionnelle pas à pas était basée sur le savoir-faire et le bon sens de l'expérimentateur. Cela engendrait de nombreux essais et un temps considérable pour atteindre parfois des résultats difficilement interprétables. Cependant, les exigences du client sur le plan qualité et goût d'une part et la course des entreprises vers des réductions des coûts de développement d'autre part, nécessitent l'utilisation d'une approche scientifiquement rigoureuse : un « plan d'expériences » appelé aussi une « stratégie d'expériences » [83].

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou une étude industrielle. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt (Y) et des variables qui la régissent (X_i). La méthodologie des plans d'expériences permette de porter, sous forme d'un modèle mathématique, (Y) en fonction de l'ensemble des variables (X_i) étudiées [84]:

$$Y = f(X_i) \quad (3.10)$$

Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements liés au processus étudié avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse. Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur, les deux principaux plans d'expériences sont : les plans factoriels et les plans de mélanges. Les premiers sont appliqués dans l'étude des variables influençant un processus quelconque, tandis que les deuxièmes sont rencontrés dans le domaine de formulation de mélanges (par exemple : formulation de produits alimentaires, etc.) [84]. Ces les plans factoriels de trois facteurs, et de mélange qui vont être utilisés dans autre étude.

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'« espace expérimental » et celle de « modélisation mathématique » des grandeurs étudiées [84].

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la réponse, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme « variable » on utilisera le mot facteur. La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure 3.12). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut. Le niveau bas du facteur est noté par - 1 et le niveau haut par +1. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut [84].

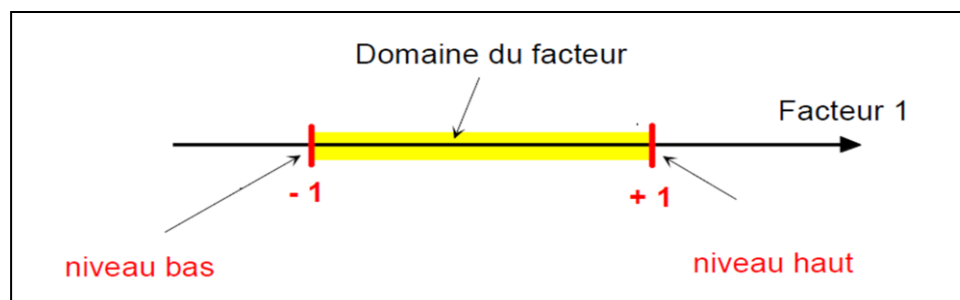


Figure 3.12 : Domaine de variation du facteur [83].

Les second et troisième facteurs sont représentés, eux aussi, par des axes gradués et orientés. On définit, comme pour le premier facteur, leurs niveaux hauts, leurs niveaux bas et leurs domaines de variation. Ces axes sont disposés orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à trois dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental, c'est dans cet espace que se trouvent dispersés les différents points expérimentaux, dont chacun représente une combinaison précise des différents facteurs (figure 3.13). On peut noter le plan factoriel de trois facteurs à deux niveaux par, 2^3 . 2, étant le nombre de niveaux attribués à chaque facteur, et 3 est le nombre de facteurs étudiés. On aura donc recours à réaliser un nombre de 2^3 essais expérimentaux, c'est 8 (figure 3.13) [85].

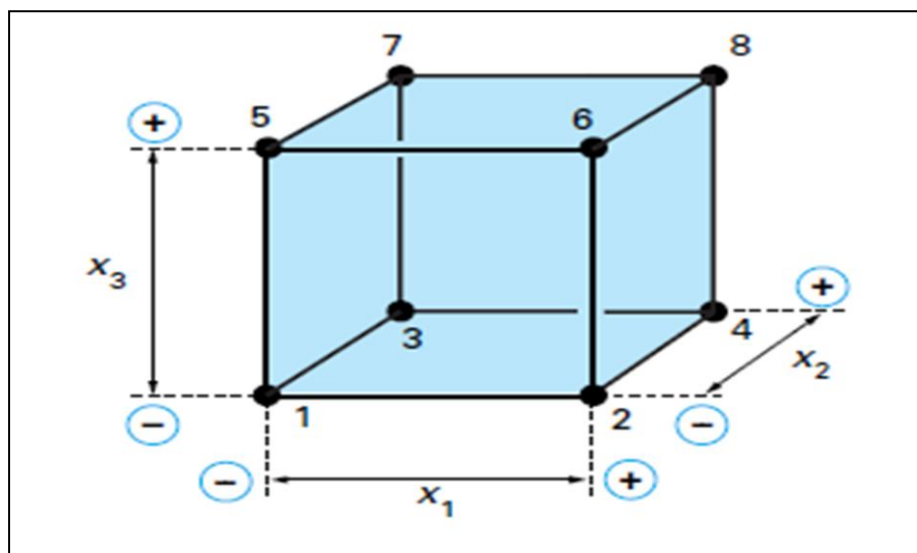


Figure 3.13 : Représentation géométrique du domaine expérimental d'un plan factoriel complet à deux niveaux [85].

Les définitions qui ont été données s'appliquent bien aux facteurs numériques continus. Mais il existe d'autres types de facteurs, c'est les facteurs catégoriques ou discrets, qui peuvent avoir également des grandeurs ordonnables comme, par exemple, des distances qui peuvent être courtes, moyennes et longues, températures élevées ou basses, etc. Là aussi, la notion d'espace expérimental existe toujours mais cet espace possède des propriétés différentes du premier [85]. Dans notre étude ne nous sommes pas concernés par ce dernier type de facteurs.

En ce qui concerne la notion de modélisation mathématique, on choisit à *priori* une fonction mathématique qui relie la réponse analysée (Y) avec les facteurs étudiés (X_i). Le développement de la fonction prend en général la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé [85]:

$$y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_i^2 + a_{ij\dots z} X_i X_j \dots X_z \quad (3.11)$$

Avec :

- Y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée, pour cela la répétition des mesures est utile.
- X_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue.
- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté à *priori*. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences, a_0 est le terme ou coefficient constant.

Ce modèle est appelé "modèle postulé" ou "modèle à *priori*". L'intérêt porté à la modélisation de la réponse par un polynôme, est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences [85].

En fin et pour que le modèle postulé soit valide (il décrit crédiblement la variation de Y en fonction des X_i), et pour que la prédiction des Y par le biais de ce modèle soit au maximum correcte, deux compléments doivent être apportés au modèle précédemment décrit. Le premier complément est le "manque d'ajustement". Cette expression traduit le fait que le modèle *a priori* est fort probablement différent du modèle réel qui régit le phénomène étudié. Il y a un écart entre ces deux modèles. Cet écart est le manque d'ajustement (lack of fit en anglais). Le second complément est la prise en compte de la nature aléatoire de la réponse. En effet, si l'on mesure plusieurs fois une réponse en un même point expérimental, on n'obtient pas exactement le même résultat. Les résultats sont dispersés. Les dispersions ainsi constatées sont appelées erreurs expérimentales (pur error en anglais). Ces deux écarts, manque d'ajustement et erreur

expérimentale, sont souvent réunis dans un seul écart qui représente leurs somme, notée e . Le modèle utilisé par l'expérimentateur s'écrit alors [85]:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e \quad (3.12)$$

B/ Étude de l'extraction hydro-éthanolique des polyphénols de l'écorce de grenade, application du plan factoriel complet à deux niveaux

✓ Choix de la technique d'extraction

Nous avons choisi la macération comme technique d'extraction simple et facile à conduire afin de réaliser cette étude, et pour connaître de préalable les mécanismes de base qui régissent l'extraction solide-liquide des polyphénols de l'écorce des grenades.

✓ Choix du solvant d'extraction

Dans le secteur de l'extraction de substances naturelles, l'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants utilisés sont toujours de nature plus ou moins polaire. Les plus utilisés d'entre eux pour l'extraction des polyphénols sont, l'eau, l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle, seuls ou en mélanges [86].

Cependant, les solvants organiques, sont aussi, pour un bon nombre d'entre eux, inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes, etc.). De ce fait, leur utilisation est de plus en plus souvent montrée du doigt pour sa participation à la pollution environnementale et à l'effet de serre, cela est vrai pour le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Par ailleurs, l'épuisement progressif des ressources pétrolières et surtout le durcissement de la réglementation obligent les industriels du secteur à s'orienter vers des solutions alternatives plus respectueuses de l'environnement [82].

Un solvant d'extraction est caractérisé par différentes propriétés ; il doit être un liquide volatil, simple ou mixte, qui a la propriété de dissoudre des substances spécifiques (pouvoir solvant) sans altérer ces dernières [82]. Notre choix du solvant « idéal » (figure 3.14) a été basé sur une démarche d'éco-extraction et économique, dans la qu'elle, le solvant « vert » sélectionné ne doit pas être seulement efficace et économique mais doit aussi posséder des caractéristiques

complémentaires relatives à leur sécurité et à son impact sur l'environnement. Dans cet ordre d'idées, notre choix a ciblé deux solvants, l'eau distillée et l'éthanol absolu, séparés ou mélangés.

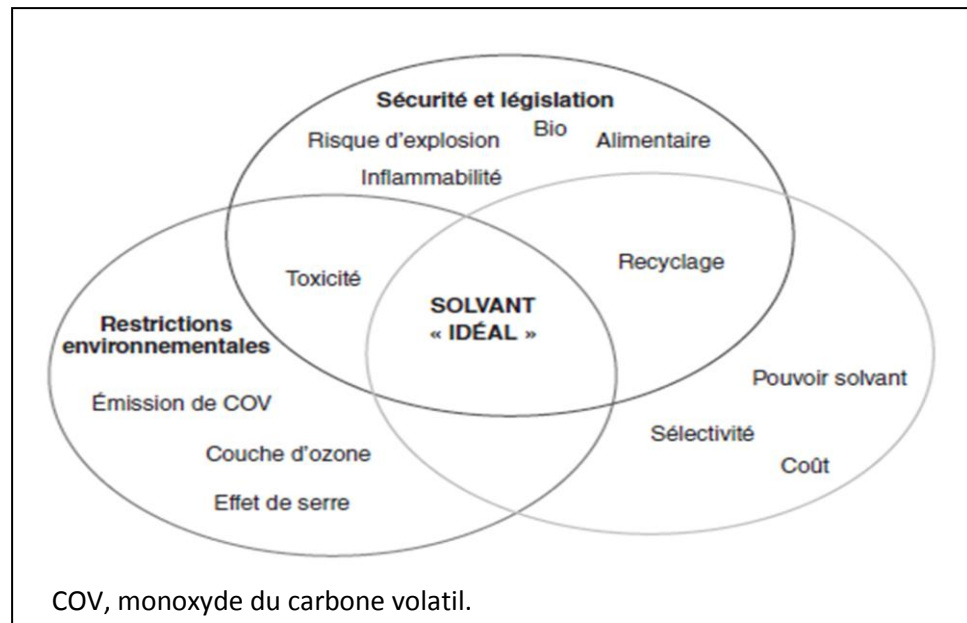


Figure 3.14 : Critères utilisés pour choisir *à priori* le bon solvant.

✓ Facteurs du procédé ou variables étudiées

Notre étude s'est basée sur l'application d'un plan factoriel complet à deux niveaux, pour étudier trois facteurs numériques et leur influence sur deux réponses du procédé sélectionnées. Les trois facteurs ou variables indépendantes choisies par nous sont soupçonnées influencer le procédé d'extraction. Ils sont mentionnés dans le tableau 3.1 :

Tableau 3.1 : description des facteurs numérique ou continus étudiés.

Nom du facteur	Niveaux du facteur en unités actuelles	Niveaux du facteur en unités codées
Concentration de l'éthanol dans le solvant (%).	De 0 à 100 %	De -1 à +1
Le temps ou la durée d'extraction (h).	De 1 à 24 h	De -1 à +1
L'hydromodule ou le rapport entre masse du matériel végétal (g) et volume du solvant (ml).	De 20 à 100	De -1 à +1

- Étant donné que le mélange (eau distillée / éthanol) a été utilisé, donc si la concentration de l'éthanol est maintenue à 0 %, cela signifie que l'extraction se fait à 100 % eau distillée, et inversement.
- On a choisi de porter le niveau bas de l'hydromodule à 20 c'est-à-dire, extraction d'un gramme d'échantillon avec 20 ml de solvant car, des volumes inférieurs à ce niveau et testés aux préalables, n'ont pas permis un mouillage convenable de la masse d'échantillon dans le solvant.

✓ Réponses choisies

Dans ce plan d'expériences nous sommes intéressé à connaître le comportement de la teneur en polyphénols totaux extraits, et l'activité antioxydante de l'extrait, et de les optimiser en fonction des trois facteurs étudiés.

Sur ceux, nos réponses ciblées sont :

- Y_1 : la teneur en polyphénols totaux de l'extrait notée (PPT) et exprimée en (% ou g/100g de MF de la poudre de la pelure), mesurée par le test de Folin-Ciocalteu, après dilution de l'extrait à 1/100 avec de l'eau distillée ;
- Y_2 : l'activité antioxydante de l'extrait exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (%).

✓ Construction de la matrice d'expériences

La construction de notre plan factoriel a exigé la réalisation en laboratoire des 8 essais requis. Leurs combinaisons de facteurs et leurs réponses correspondantes sont ordonnées dans un tableau qui s'appelle matrice d'expériences (tableau 3.2). C'est à ce stade que nous avons fait le transfert des données expérimentales obtenues, dans le logiciel des plans d'expériences, après avoir sélectionné l'outil 2-Level-Factorial design.

Le logiciel utilisé est de type (Design Expert® Software 7.0.0 Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA).

Les valeurs des réponses sont exprimées dans la matrice d'expériences sous forme de moyennes arithmétiques de trois à cinq répétitions de chaque essai expérimental. Dans ce cas, le logiciel ne calcule pas la (pur error).

Tableau 3.2 : Matrice d'expériences du plan factoriel complet à deux niveaux.

Essai	Temps de l'extraction (h)	Hydromodule (nd)	Concentration de l'ETOH (%)	Y ₁ : PPT (%)	Y ₂ : Activité antioxydante DPPH (%)
1	1	20	100	10.6	80
2	24	100	100	0.799	69.3
3	24	20	100	8.89	83
4	24	20	0	11.1	74.6
5	24	100	0	1.55	74
6	1	100	100	1.07	71.8
7	1	100	0	1.18	72.9
8	1	20	0	8.48	73.6

nd : non dimensionnée ; ETOH : éthanol ; PPT : teneur en polyphénols totaux.

Une fois la matrice d'expériences construite, nous avons procédé à l'analyse statistique de ce plan d'expériences en passant par les trois grandes étapes suivantes : l'analyse de la variance (ANOVA) pour chaque réponse, modélisation mathématique de chaque réponse et optimisation numérique et/ou graphique de chaque réponse ou des deux simultanément. Toutes ces analyses ont été réalisées par les outils statistiques du logiciel Design Expert® Software 7.0.0.

3.3.6. Valorisation des polyphénols de la pelure par analyse des éventuels effets antioxydants synergiques entre les extraits

3.3.6.1. Détermination de l'effet mélange ou « mixture effect »

A/ Principe

Notre objectif est d'améliorer le pouvoir antioxydant des différents extraits de polyphénols par la recherche d'effet antioxydant synergique, en faisant des mélanges binaires et ternaires (car on a un maximum de trois cultivars) entre les extraits.

En fonction de leurs disponibilité dans le laboratoire, nous avons utilisé les extraits hydro-méthanoliques des pelures (extrait obtenus par la méthode décrite en § 3.3.3.2 (B)) de chaque cultivar. Par ailleurs, les jus eux même ont été considérés comme extraits de polyphénols des arilles des grenades (la pulpe), car la pression due à l'extraction de jus permet la diffusion des polyphenols des arilles dans la phase aqueuse de jus [6].

La détermination de l'effet antioxydant du mélange ou « mixture antioxydant effect » (EM), dans la littérature internationale, a été réalisée suivant la méthode décrite par Peyrat-Maillard *et al.* (2003), avec des modifications que nous avons adapté à notre cas (extraits liquides de matériel végétal qui renferment plusieurs types de composés antioxydants).

Le tableau 3.3, résume les points de distinction entre la méthode originale de Peyrat-Maillard *et al.* et notre méthode. Cette comparaison est importante car les modifications que nous avons apporté peuvent influencer les résultats attendus.

Tableau 3.3 : Points de distinction entre la méthode de Peyrat-Maillard *et al* et notre méthode pour la détermination du (EM).

Point de distinction	Méthode de Peyrat-Maillard <i>et al</i> (2003)	Méthode utilisée
Nature des antioxydants testés.	Des composés antioxydants commerciaux purs (exemples : acide ascorbique, quercétine, tocophérols, etc.).	Des extraits liquides brutes et non purifiés, contenant plusieurs antioxydants (extraits des pelures et jus).
Grandeure appliquée pour la mesure du (EM).	La concentration pondérale ou molaire de chaque composé dilué dans un solvant.	Le volume en (ml) de chaque extrait (extrait de pelure et/ou le jus), dont la concentration en antioxydants peut varier, pour le même volume, d'un extrait à l'autre selon : la partie appliquée (pelure/jus) et les cultivars en question.

L'effet antioxydant d'un mélange (EM) est un ratio calculé par la formule suivante :

$$ME = \frac{\textit{Activité antioxydante expérimentale}}{\textit{Activité antioxydante calculée}}$$

Avec :

La valeur de l'activité antioxydante calculée selon la somme des valeurs des activités antioxydantes de tous les extraits du mélange, multipliées par leurs fractions volumiques dans le mélange (1/2 et 1/3 pour les mélanges binaires et ternaires respectivement). En fonction des valeurs de (EM) obtenues, on distingue entre les extraits un :

- ✓ Effet antioxydant synergique si, EM est supérieur à 1 ;
- ✓ Effet antioxydant antagoniste si, EM est inférieur à 1 ;
- ✓ Effets antioxydant additif si, EM est égale à 1[88].

3.3.6.2. Étude de l'effet synergique par plan de mélange

A/ Principe

Les plans de mélange sont des plans d'expériences que l'on utilise lorsque l'on étudie des produits composés de plusieurs constituants (notre produit est un extrait dont l'effet synergique est meilleur). L'objectif est de trouver la loi qui régit une ou plusieurs réponses (EM) en fonction de la composition du mélange (mélange de différents extraits).

Les facteurs cette fois ci sont les concentrations (X_i) de chaque constituant (i) du mélange. Les réponses (Y) sont exprimées en fonction de ces concentrations. Il faut tenir compte de la contrainte suivante : la somme des concentrations des constituants d'un mélange est égale à cent pour cent. Il existe donc la relation suivante entre les X_i , c'est la relation fondamentale des mélanges:

$$\sum x_i = 1 \quad (3.13)$$

Le modèle mathématique exprimant la valeur d'une réponse Y en fonction des concentrations X_i ne peut pas s'écrire selon une formule analogue aux plans factoriels, car il faut tenir compte de la relation (3.13). cette relation impose dans le modèle mathématique :

- La disparition du coefficient ou terme constant ;
- La disparition des coefficients ou termes carrés.

Le modèle mathématique s'écrit donc sous la forme suivante :

$$y = \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \sum a_{i...j} X_i \dots X_j \quad (3.14)$$

Notre objectif par l'application du plan de mélange est d'étudier le comportement de la réponse (EM) en fonction de la nature et du volume de chaque extrait peut rentrer dans la composition du mélange.

Pour ce fait, nous avons choisi le plan de mélange de type Historical Data fourni par Design Expert® Software 7.0.0. Le tableau 3.4 qui suit représente la matrice d'expériences en précisant le nombres d'essais expérimentaux et le nombre et la nature des six constituants possibles de nos mélanges, en introduisant les 13 combinaisons déjà étudiées.

Ainsi, les 13 essais déjà conduits dans la partie précédente (§ 3.3.6.1) ont été transférés dans la matrice d'expériences du plan de mélange historical data (de son nom ce plan permet d'introduire dans le logiciel et d'analyser des essai déjà réalisés ou données historiques).

Les six constituants sont présentés dans la matrice par des lettres majuscules : A, B, C, D, E et F. Il est à noter que ces constituants ne sont pas soumis à des contraintes, donc leur variation oscille entre 0 et 100 % en unités actuelles ou entre 0 et 1 en unités codées.

Comme pour le premier plan, les valeurs de la réponse (EM) sont données en moyennes de trois répétitions, la (pur error) ne sera donc pas calculée par le logiciel.

Tableau 3.4 : Matrice d'expériences du plan de mélange historical data.

Éssai	A : Extrait de pelure de BM (%)	B : Extrait de pelure de DM (%)	C : Extrait de pelure de DK (%)	D : Jus de BM (%)	E : Jus de DM (%)	F : Jus de DK (%)	Y ₁ : (ME) nd
1	50	50	0	0	0	0	0.992
2	50	0	50	0	0	0	1.00
3	0	50	50	0	0	0	0.979
4	33.33	33.33	33.33	0	0	0	0.999
5	50	0	0	50	0	0	0.858
6	0	50	0	0	50	0	1.02
7	0	0	50	0	0	50	0.985
8	25	0	0	75	0	0	0.941
9	0	25	0	0	75	0	0.996
10	0	0	25	0	0	75	0.949
11	10	0	0	90	0	0	1.08
12	0	10	0	0	90	0	1.04
13	0	0	10	0	0	90	0.983

nd : non dimensionné.

3.3.7. Analyses statistiques

Les essais expérimentaux ont été conduits au minimum en triplicata ($n = 3$). Les résultats expérimentaux sont exprimés sous la forme de (moyennes \pm écart-types). Le test t de Student a été appliqué pour l'analyse de la variance à un seul facteur de classification (One-way ANOVA), suivi du test des étendus multiples Tukey HSD, pour la recherche de différences significatives entre deux groupes d'individus avec un seuil de 5 %. Ainsi la différence entre deux moyennes d'une grandeur mesurée, est jugée :

- Significative si ($p < 0.05$) ;
- Hautement significative si ($p < 0.01$) ;
- Très hautement significative si ($p < 0.001$).

L'analyse des corrélations a été faite avec un seuil de signification de 5 %. Ces analyses sont réalisées par le logiciel (Statistica 8. Statsoft, Inc USA).

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Composition physico-chimique et biochimique des grenades

Pour aider les agriculteurs ainsi que les consommateurs algériens dans le choix et la sélection du meilleur cultivar ayant des caractéristiques physico-chimiques intéressantes, d'une part sur le plan de la qualité nutritionnelle, et d'autre part sur le plan des qualités technologiques et commerciales, l'étude de la composition physico-chimique des variétés ou des cultivars s'impose.

Toutefois, pour un cultivar donné et dans des conditions bien définies, la composition physico-chimique du fruit varie en fonction du stade de maturité, des conditions édapho-climatiques et de fertilisation [89]. Dans notre cas, les trois cultivars étudiés nommés : Bordj-mira n°11, Doux de Messaad et Doux de Koléa, ont été cultivés ensembles dans le même verger situé dans la région de Mitidja, et ont été soumis aux mêmes conditions culturales (qualité du sol, dose de fertilisation, conditions climatiques, etc.), et ont été en plus de cela analysés au même stade de maturité.

Nous avons voulu ainsi éliminer les différences dues aux facteurs précédents, et laisser uniquement les différences génétiques naturelles entre les cultivars.

Notre étude vise la classification de ces trois cultivars selon des critères relatifs à la qualité nutritionnelle, technologique et commerciale.

Dans le tableau 4.1, nous avons reporté les différentes caractéristiques physico-chimiques et biochimiques étudiées et leur classification selon trois critères essentiels :

- Qualité nutritionnelle ;
- Qualité technologique et
- Qualité commerciale.

Tableau 4.1 : Classification de caractéristiques étudiées en rapport avec la qualité d'un cultivar.

	Caractéristiques représentant la qualité nutritionnelle	Caractéristiques représentant la qualité technologique	Caractéristiques représentant la qualité commerciale
Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques analysées	Teneur en sucres totaux	Poids moyen des fruits	Poids moyen des fruits
	Teneurs en cendres	Rendement en pulpes	Rendement en pulpes
	Taux de l'acidité titrable	Rendement en jus	Rendement en jus
	Teneur en vitamine C	Taux des solides solubles et indice de maturité	Indice de maturité
	Teneurs en polyphénols	Teneur en sucre et en acidité titrable	Teneur en sucres et en acidité titrable
	Pouvoir antioxydant.	Teneur en protéine des jus.	Teneur en anthocyanine (indice de couleur des pelures et des arilles)

4.1.1. Caractéristiques pomologiques

Les caractéristiques pomologiques des trois cultivars étudiés, sont présentées au niveau du tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Caractéristiques pomologiques des trois cultivars.

Cultivar	Poids moyen des fruits (g)	Poids moyen des arilles (pulpe) (g)	Poids moyen de l'écorce (g)	Rendement en pulpe (%)
Bordj-Mira	228.1 ± 47.54 a	67.93 ± 12.53	21.06 ± 2.32	76.17 ± 1.52 c
Doux de Messaad	152.86 ± 29.93 a	70 ± 2.05	15.7 ± 0.26	81.66 ± 0.53 a
Doux de Koléa	125.63 ± 1.45 ba	89 ± 2.46	25.06 ± 0.64	78.01 ± 0.35 bc

(abc) : Les différentes lettres mentionnées dans la même colonne indiquent des différences significatives ($p < 0.05$).

D'après ce tableau, le poids moyen des fruits est situé entre 125.63 g pour le cultivar DK et 228.1 g pour le cultivar BM. Ces résultats sont dans la gamme de variation du poids moyen de la grenade, avancée par plusieurs auteurs : de 196.89 g à 315.28 g pour des cultivars iraniens [88], de 206.6 g à 506.67 g pour des cultivars marocains [89] et de 101 g à 400 g pour des cultivars tunisiens [22]. La différence observée entre le poids moyen des grenades dépend d'après Tehranifer *et al.* (2010) des cultivars et des conditions climatiques. Par ailleurs, le traitement statistique des résultats a montré qu'il existe une différence significative ($p < 0.05$) entre le poids moyen de BM et de DK.

Le rendement en pulpe ou en arilles, est une propriété très souhaitable dans l'industrie de transformation des grenades en jus ou en autres produits alimentaires. Il existe pour cette caractéristique, une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre BM et DM et entre DM et DK (tableau 4.2). Ce rendement varie entre 76.17 % et 81.66 % pour nos cultivars étudiés. Ces résultats sont nettement plus élevés que ceux avancés par Zaouay *et al.* (2012) pour des cultivars tunisiens (37.8 % - 61.7 %), et ceux de Martinez *et al.* (2012) pour des cultivars marocains (53.2 % - 61.4 %). Les différences observées entre nos résultats et les autres peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas analysé plus de trois cultivars, nous estimons qu'on aurait pu trouver des résultats comparables avec les deux résultats mentionnés ci-dessus, si nous avions travaillé avec un nombre plus ou moins important de cultivars pouvant décrire plus crédiblement la variation de cette grandeur étudiée.

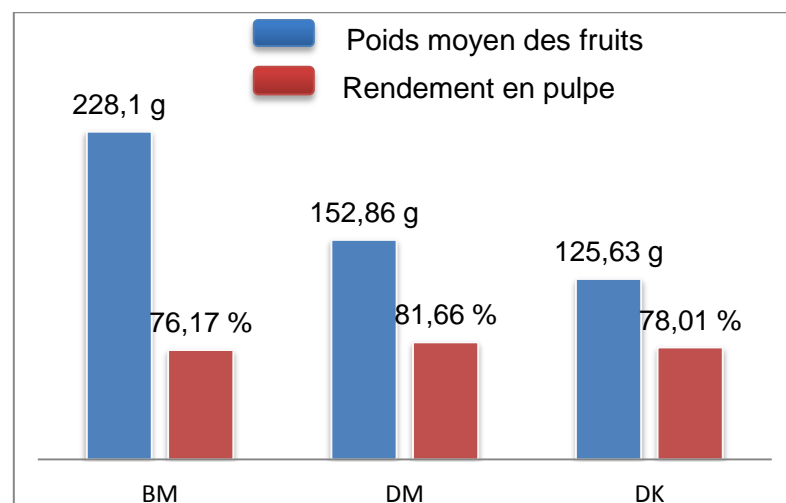


Figure 4.1 : Comparaison des poids moyens et des rendements en pulpes des trois cultivars.

Enfin, l'analyse des caractéristiques pomologiques indique que parmi les trois cultivars étudiés, BM et DM ont des poids et des rendements en pulpe favorables pour la consommation directe ainsi que pour la transformation industrielle (figure 4.1).

4.1.2. Taux de l'humidité et des cendres de la pulpe

L'eau constitue plus de 80 % de poids frais des fruits, elle joue des rôles primordiaux dans divers processus physiologiques végétaux et animaux. Dans l'organisme humain, elle occupe plus de 60 % de son poids frais, et elle est impliquée dans le transport des nutriments et dans le processus de thermorégulation [92]. Le tableau 4.3, représente les teneurs en eau et en cendres des pulpes des trois cultivars de grenade étudiés.

Tableau 4.3 : Teneurs en eau et en cendres des trois cultivars.

Cultivar	Taux d'humidité ou teneur en eau (%)	Teneur totale en cendres (g/100 g MF)
Bordj-mira	78.93 ± 1.81	0.408 ± 0.012
Doux de Messaad	79.05 ± 3.08	0.483 ± 0.103
Doux de Koléa	79.62 ± 1.21	0.474 ± 0.103

La pulpe de la grenade comme pour les autres fruits charnus, est riche en eau. La teneur en eau de nos cultivars étudiés varie de 78.93 % à 79.62 %. Ces teneurs sont comparables avec celles trouvées par Hmid. (2013) [89]. Le traitement statistique n'a montré aucune différence significative entre les teneurs enregistrées ($p > 0.05$).

Les substances minérales se trouvent dans la cellule végétale sous forme de sels organiques ou inorganiques, dissouts dans le jus cellulaire. L'élément minéral majoritaire pour la plupart des fruits est le potassium (K⁺) [92].

La teneur totale en cendres qui représentent l'ensemble des éléments minéraux, varie pour nos cultivars étudiés entre 0.483 et 0.408 g/100 g MF. Les différences entre les trois cultivars ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0.05$).

4.2. Composition physico-chimique et biochimique des jus

4.2.1. Rendement en jus

Le rendement en jus des fruits est une caractéristique très pertinente tant sur le plan économique que technologique, pour apprécier l'aptitude d'un cultivar donné à la transformation industrielle en jus [22]. Le tableau 4.4, représente les rendements en jus de chaque cultivar étudié.

Tableau 4.4 : Rendements en jus des trois cultivars.

	Bordj-mira	Doux de Messad	Doux de Koléa
Rendement en jus (%)	45.33 ± 3.06 b	36.67 ± 1.53 c	54.33 ± 1.53 a

(abc) : les différentes lettres signifient l'existence de différences significatives ($p < 0.05$).

D'après le tableau 4.4, nous observons que le rendement en jus diffère significativement ($p < 0.01$) d'un cultivar à l'autre, il est situé entre 36.67 % pour le cultivar DM et 54.33 % pour le cultivar DK. Ces rendements sont comparables avec ceux trouvés par Hmid. (2013), chez des cultivars marocains (entre 29.73 % et 54.42 %), ainsi qu'avec ceux de Tehranifer *et al.* (2010) pour des cultivars iraniens (entre 26.95 % et 46.55 %), ils sont cependant moins prononcés que ceux trouvés par Zaouay *et al.* (2012) chez des cultivars tunisiens (entre 58.7 % et 88.9 %). Il est à signaler que le rendement en jus est parmi les critères de la qualité qui varient fortement d'un cultivar à l'autre.

Le traitement statistique des résultats a montré qu'il y a une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre DM et DK, et des différences significatives ($p < 0.05$) entre BM et DM et entre BM et DK.

Nous allons donc conclure que les cultivars DK et BM présentent des rendements en jus favorables pour la transformation industrielle en jus.

4.2.2. Taux de solides solubles, de l'acidité titrable, pH et indice de maturité

Les résultats des taux de solides solubles (TSS), de l'acidité titrable et du pH sont illustrés dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Taux des solides solubles, de l'acidité titrables et les pH des jus.

Jus de cultivar	TSS (°Brix)	Acidité titrable (g d'ÉAC/100 ml)	pH
Bordj-mira	12.87 ± 0.90 b	0.50 ± 0.06 b	5.27 ± 0.50 a
Doux de Messaad	14.90 ± 0.53 a	0.80 ± 0.05 a	4.09 ± 0.13 a
Doux de Koléa	16.17 ± 1.53 a	0.31 ± 0.03 c	3.84 ± 0.09 b

(abc) : différentes lettres sur la même colonne indiquent des différences significatives ($p < 0.05$). g d'ÉAC : gramme d'équivalent acide citrique.

Comme est présenté dans le tableau 4.5, le TSS qui est représenté majoritairement par des sucres solubles (essentiellement saccharose, glucose et fructose, voit son niveau le plus élevé chez le cultivar DK (16.17 %) suivi de DM et de BM respectivement. Ces résultats sont en agrément avec ceux avancés par Tehranifer *et al.* (2010), pour des cultivars iraniens (11.37 – 15.07 %), et avec ceux de cultivars marocains (12.33 – 17.17 %) [89], ainsi qu'avec les résultats de Zaouay *et al.* (2012), pour des cultivars tunisiens (14.33 -16.33 %).

Cependant, le TSS du jus de grenade peut atteindre 19 % tel que rapporté par Poyrazoglu *et al.* (2002). À ce niveau, il est à signaler que le TSS des jus de fruits augmente avec l'avancement de la maturation, et diffère d'une variété à l'autre. Par ailleurs, la norme du codex alimentarius des jus de fruits, exige que le TSS du jus de grenade soit supérieur ou égal à 12 % ou bien 12 °Brix [94].

Les résultats des analyses statistiques pour le TSS montre que les différences entre BM et DM et entre BM et DK, sont significatives ($p < 0.05$).

Les valeurs de pH de nos jus varient entre 3.84 pour BM et 5.27 pour DK. Ces valeurs sont supérieures à celles de Hmid. (2013), pour des cultivars marocains (2.85 – 4.22) et à celles de Tehranifer *et al.* (2010), pour des cultivars iraniens (3.16 – 4.9). Par contre, les jus des cultivars tunisiens analysés par Zaouay *et al.* (2012), montrent un caractère plus acide (pH entre 2.72 et 4.24).

Le pH du jus de grenade diffère enfaite selon qu'il s'agisse d'un jus issu d'une variété acide, douce-acide ou douce, et selon le stade de maturité à la récolte. Ainsi, le pH du jus de grenade est assez élevé au début de la formation du

fruit et diminue rapidement en juillet puis une légère augmentation est observée en août, septembre et en octobre, due à la maturation du fruit [89].

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre le pH de jus de BM et le pH de jus de DK, et une différence significative ($p < 0.05$) entre le pH de jus de DM et de jus de DK.

L'acidité titrable totale qui représente l'ensemble des acides organiques contenus dans le jus tels que les acides citrique, malique et tartrique, varie pour nos jus entre 0.31 g/100 g et 0.80 g/100 g de MF.

L'acidité titrable du jus de grenade varie largement selon les variétés étudiées et selon le stade de maturité, elle oscille entre 0.14 et 3.7 g/100 g [22,89] ; elle est d'après Gundogdu et Yilmaz. (2012) majoritairement représentée par l'acide citrique et par l'acide gallique.

Cristofori *et al.* (2011), ont signalé qu'un jus de grenade est propre à la consommation directe, si son acidité titrable est inférieure à 1.8 g/100 g.

À partir des valeurs de TSS et des taux d'acidité titrables, nous pouvons établir une classification des trois cultivars étudiés, selon l'indice de maturité (IM) qui exprime le ratio entre le TSS et l'acidité titrable d'un jus (tableau 4.6).

Tableau 4.6 : Classification des trois cultivars en fonction de l'indice de maturité.

Cultivar	Indice de maturité	Classification
Bordj-mira	25.87	Doux
Doux de Messaad	18.64	Doux-aigre
Doux de Koléa	52.58	Doux

Les jus des trois cultivars seront ainsi classés en [20]:

- ✓ Jus d'un cultivar doux, si IM est compris entre 31 et 98 ;
- ✓ Jus d'un cultivar doux-aigre, si IM est compris entre et 17 et 24 et en
- ✓ Jus d'un cultivar aigre, si IM est compris entre 5 et 7.

D'après le tableau 4.6, nous notons que les deux cultivars BM et DK sont de nature douce (IM égal à 25.87 et à 52.58 respectivement), tandis que DM est de nature douce-aigre (IM égal à 18.64).

Des caractéristiques telles que le taux de solides solubles, l'acidité titrable et par conséquent l'indice de maturité, déterminent en grande partie la qualité gustative de la pulpe et de jus de grenade, et à ce niveau-là la différence variétale joue un rôle important, ce qui impose la caractérisation des différentes variétés et cultivars afin de pouvoir sélectionner celles ou ceux ayant des qualités optimales [20,90,21,22,89].

À la lumière des observations précédentes, il en ressort que nos trois cultivars étudiés sont propres à la consommation directe (richesse en TSS et faibles niveaux d'acidité) et sont également utiles pour la transformation industrielle (TSS supérieurs à 12 %).

4.2.3. Teneurs en sucres hydrosolubles totaux

Les sucres ou les hydrates de carbone constituent le constituant majeur des fruits, ils représentent environ 90 % de la matière sèche de ces aliments. Ils sont produits dans les tissus végétaux par biosynthèse [92].

Du point de vue nutritionnel, les sucres occupent plus de la moitié des apports énergétiques de la plupart des gens. En effet, dans une ration alimentaire équilibrée, les sucres remplissent entre 50 à 55 % de l'apport énergétique totale [95].

Les teneurs des jus en sucres totaux exprimées en (g/100ml de jus frais) sont présentées dans le tableau 4.7.

Tableau 4.7 : Teneurs en sucres totaux des jus étudiés.

Jus de cultivar	Bordj-mira	Doux de Messaad	Doux de Koléa
Teneur en sucres totaux (g/100 ml MF)	16.33 ± 1.61 a	11.33 ± 0.58 ba	14.33 ± 2.31 a

(ab) : la différence est significative ($p < 0.05$) entre BM et DM.

D'après ce tableau, nous trouvons que le jus de cultivar BM présente la teneur en sucre la plus élevée (16.33 g/100 ml) suivi du jus de DK (14.33 g/100 ml)

et du jus de DM (11.33 g/100 ml) respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux avancés par Melgarejo *et al.* (2000), pour des variétés cultivées en Espagne (de 11.07 % pour des variétés aigres à 15.89 % pour des variétés douces).

La fraction glucidique du jus de grenade est composée majoritairement de glucose et de fructose, suivis de saccharose et de maltose en très faibles concentrations [96].

L'analyse statistique de nos résultats a signalé qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) entre les jus de BM et de DM.

4.2.4. Teneurs en protéines

La matière azotée totale se trouvent dans les fruits sous différentes formes : protéines, acides aminés, amines, amides, nitrates, etc. Elle ne dépasse en générale pas la limite de 1 % chez les fruits charnus, et de cette matière azotée totale les protéines sont les plus dominantes [92].

Les protéines apportent à l'organisme humain les différents acides aminés dont il a besoin pour la construction des tissus ; elles devraient représenter de 12 à 13 % des calories quotidiennes. Cependant, et mises à part les protéines du soja, les protéines apportées par les végétaux sont de faible valeur biologique par rapport aux protéines animales, à cause de leur composition en acides aminés moins équilibrée, ainsi que leur déficience en acides aminés indispensables [46].

Bien que les protéines n'apporteraient pas de plus à la qualité nutritionnelle des jus, elles peuvent affecter leur qualité organoleptique par le fait qu'elles ont la faculté de se précipiter, en plus de la présence de protéines enzymatiques responsables de la modification de la stabilité organoleptique des jus au cours du stockage [26].

À ce titre, nous citons par exemple les polyphénols oxydases responsables du brunissement enzymatique des jus (altération de la couleur), et les pectinases telles que la pectinestérase et la β -D-glacturonase, responsables de la dégradation des substances pectiques d'où la précipitation de la pulpe et la diminution de la stabilité colloïdale des jus [26]. Les teneurs en protéines des trois jus étudiés sont présentées dans le tableau 4.8.

Tableau 4.6 : teneurs des jus en protéines

Jus de cultivar	Bordj-mira	Doux de Messaad	Doux de Koléa
Teneur en protéines (g/100 ml MF)	0.300 ± 0.037	0.297 ± 0.071	0.374 ± 0.053

Ces teneurs sont proches de celles trouvées par Hmid. (2013), dans des jus extraits de cultivars marocains (0.147 % - 0.851 %).

Le traitement statistique des résultats a montré que les différences obtenues entre les jus ne sont pas significatives ($p > 0.05$).

4.2.5. Teneurs en vitamine C

Les vitamines sont des substances organiques indispensables sans valeur énergétique propre, que l'Homme ne synthétise pas ou en quantité insuffisante. Elles doivent donc être apportées par l'alimentation [97].

La vitamine C ou l'acide L-ascorbique, doit être apportée à une dose de 110 mg par jours de la ration alimentaire de l'adulte [46].

La vitamine C intervient dans deux types de réactions : (i) les réactions d'hydroxylation nécessaires à la synthèse du collagène (hydroxylation de la lysine et de la proline), essentiellement ; (ii) les réactions d'oxydoréduction, où elle joue un rôle de réducteur (réduction des nitrites et réduction du fer ferrique en fer ferreux). Toutes ces fonctions font intervenir l'échange d'un ou deux protons au bénéfice de la molécule de substrat. De plus, elle représente le principal antioxydant en milieu aqueux, c'est un antioxydant, bloquant la production des radicaux libres, et aussi un oxydant puissant, lorsque du fer se trouve à l'état libre dans le cytoplasme [97]. Le tableau 4.9, illustre les teneurs en vitamine C des trois jus étudiés, exprimées en (mg/100 ml MF).

Tableau 4.9 : Teneurs en vitamine C des jus étudiés.

Jus de cultivar	Bordj-mira	Doux de Messaad	Doux de Koléa
Teneur en vitamine C (mg/100 ml MF)	4.8 ± 1.73	8.53 ± 7.60	11.60 ± 16.12

Les résultats trouvés montrent de faibles teneurs en vitamine C comparativement à la teneur en vitamine C du jus de grenade de la variété *Wonderful* (16.82 mg/100 ml) [72], et aux teneurs trouvées par Tehranifer *et al.* (2010), chez des jus iraniens (entre 9.91 % et 20.92 %).

Les différences entre les teneurs des jus en vitamine C ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0.05$).

Les différences observées entre nos résultats et la littérature, peuvent s'expliquer par deux raisons : la première est la variabilité qui existe naturellement entre les variétés, la deuxième pourrait être due au fait que nous avons réalisé le dosage de la vitamine C, sur des jus non frais, stockés dans le réfrigérateur plus de trois mois. Ainsi, Arendse *et al.* (2014), ont étudié la stabilité de la composition chimique du jus de grenade durant le stockage, en fonction des températures et des durées de conservation. Ils sont arrivés à conclure que la teneur en vitamine C du jus de grenade diminue graduellement durant la période de conservation, même au froid.

Enfin, nous notons que le jus de DK renferme la teneur la plus élevée en vitamine C (11.60 mg/100 ml MF).

4.2.6. Composition polyphénolique

4.2.6.1. Teneurs en polyphénols totaux

La teneur des grenades en polyphénols, est l'un des plus importants paramètres pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle d'une variété ou d'une récolte donnée [22].

Comme ce sont des antioxydants ubiquistes chez le végétal considéré, les polyphénols ont été largement étudiés dans de nombreux fruits. Ainsi, le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses protéines (enzymes, facteurs de transcription, etc.) et de leurs propriétés antioxydantes [48].

Les résultats des différents composés phénoliques des jus ainsi que des pelures, sont rassemblés dans les mêmes illustrations de cette partie, afin de faire une comparaison entre la composition polyphénolique des jus et des pelures. Le tableau 4.10, représente les teneurs en polyphénols totaux (PPT) des jus

(exprimées en g d'EAG/100 ml MF) et des pelures correspondantes (exprimées en g d'EAG/100 g de la poudre de pelure) de chaque cultivar.

Tableau 4.10 : Teneurs en polyphénols totaux des trois cultivars.

Cultivar \ Teneur	Teneurs en polyphénols totaux	
	Jus (en g d'EAG/100 ml MF) b	Pelure (en g d'EAG/100 g) a
Bordj-mira	0.399 ± 0.066 a	3.377 ± 1.109
Doux de Messaad	0.266 ± 0.066 a	3.688 ± 2.778
Doux de Koléa	0.257 ± 0.0153 ba	5.155 ± 1.368

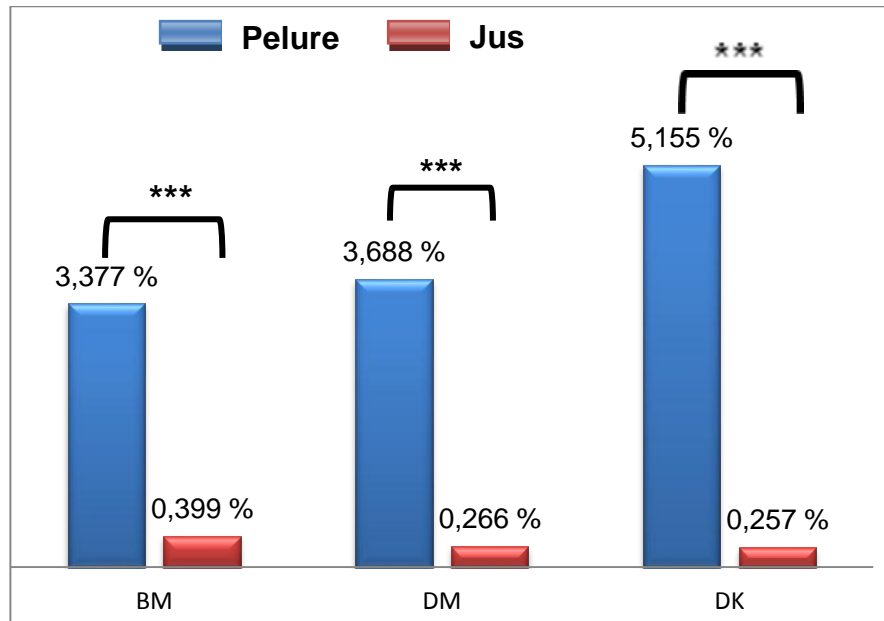
(ab) : des lettres différentes en la même colonne indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

Le tableau 4.10, indique que le jus de BM renferme plus de polyphénols que les deux autres jus ; et la différence est significative ($p < 0.05$) entre le jus de BM et le jus de DK. Les teneurs de nos jus en PPT sont comparables avec celles trouvées par Hmid. (2013) dans des jus de cultivars marocains (teneurs comprises entre 0.128 et 0.947 g d'EAG/100 ml). D'autres auteurs ont également trouvés des résultats dans la même gamme de variation : entre 0.295 et 0.985 g d'EAG/100 g de jus, par Tehranifer *et al.* (2010), entre 0.133 et 0.350 g d'EAG/100 ml, par Zaouay *et al.* (2012), entre 0.108 et 0.944 g d'EAG/100 g de jus, par Caliskan et Bayazit. (2012) et entre 0.285 et 0.450 g d'EAG/100 ml de jus, par Fawole *et al.* (2011).

Par ailleurs, la teneur en polyphénols totaux du jus de grenade peut être plus élevée si le jus est obtenu par pression des grenades entières (avec pelures). Gil *et al.* (2000), ont expliqué ce phénomène par le fait que les polyphénols contenus dans les pelures des grenades, diffusent dans le jus durant la pression des fruits entiers.

On ressort également du tableau 4.10 et de la figure 4.2, que les pelures des grenades renferment des teneurs en polyphénols nettement plus importantes que celles des jus (environ de 8.46 à 20.02 fois plus élevées). Les différences sont très hautement significatives ($p < 0.001$). Cette tendance est pareille pour tous les fruits, car les organes externes des végétaux (pelures des fruits), sont plus

exposés aux attaques parasitaires et aux contraintes de l'environnement. Ils synthétisent de ce fait plus de substances protectrices dont les polyphénols [3].



(***) : La différence entre les pelures et les jus est très hautement significative ($p < 0.001$)

Figure 4.2 : Comparaison entre la teneur en PPT des jus et des pelures.

Les teneurs en PPT des pelures étudiées sont proches avec celles rapportées par Elfalleh *et al.* (2012), qui sont de l'ordre de 8.56 g d'EAG/100 g MS), et avec les teneurs trouvées par Tabaraki *et al.* (2012), qui varient en fonction de la méthode d'extraction entre 5.506 et 8.923 g d'EAG/100 g MS.

L'analyse statistique de ces résultats des PPT a montré que dans les jus, la seule différence significative enregistrée ($p < 0.05$) est entre le jus de BM et de DK. En outre, les différences entre les pelures et les jus de chacun des trois cultivars, sont très hautement significatives ($p < 0.001$).

Notre analyse des résultats rapportés par la bibliographie nous amène à conclure que la teneur en polyphénols des jus et des pelures des grenades varie sensiblement en fonction des critères ci-après :

- ✓ Conditions de l'arboriculture fruitière (agriculture conventionnelle ou biologique, fertilisation, etc.) ;
- ✓ Conditions climatique durant la maturation des fruits (températures et degré d'ensoleillement par exemple) ;

- ✓ Les stades de maturités ;
- ✓ Les différences génétiques entre les variétés et cultivars ;
- ✓ Le procédé d'élaboration des jus ;
- ✓ Les moyens de conservation des jus ;
- ✓ Les conditions d'extraction des polyphénols à partir des pelures.

À la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les pelures des grenades constituent une très bonne source de composés phénoliques extractibles, et que la teneur de ces constituants est sous influence des conditions d'extraction. Pour avoir des extraits riches en polyphénols bioactifs, les conditions d'extraction doivent être optimisées.

4.2.6.2. Teneurs en flavonoïdes

Le tableau 4.11, illustre les teneurs des jus et des pelures des trois cultivars en flavonoïdes (exprimées en g d'équivalent quercétine par 100 ml de jus et par 100 g de pelure).

Tableau 4.11 : Teneurs en flavonoïdes des trois cultivars.

	Teneurs en flavonoïdes	
	Jus (en mg d'EQ/100 ml MF) b	Pelure (en mg d'EQ/100 g) a
Bordj-mira	0.0135 ± 0.00325	5.20 ± 0.13
Doux de Messaad	0.0124 ± 0.00150	3.45 ± 1.88
Doux de Koléa	0.0128 ± 0.00483	6.34 ± 3.78

(ab) : la différence entre les pelures et les jus est très hautement significative ($p < 0.001$).

Les teneurs en flavonoïdes des jus étudiés se rapprochent de celles trouvées par Hmid. (2013) dans des cultivars marocains (entre 0.0144 et 0.0569 g d'équivalent rutine/100 ml). Les différences entre les trois jus étudiés sont statistiquement non significatives ($p > 0.05$).

Dans une étude *in vivo*, réalisée par Sudheesh et Vijayalakshmi. (2005), l'administration orale de l'extrait de flavonoïdes de la grenade chez des rats à la dose de 10 mg/kg/jour, a permis l'amélioration du statut antioxydant en diminuant significativement les marqueurs de la peroxydation lipidique dans le foie.

Comme le montre le tableau 4.11, les pelures des grenades renferment significativement ($p < 0.001$) plus de flavonoïdes que les jus. Les teneurs enregistrées sont proches de la teneur de 5.15 g d'ER/100 g MS) rapportée par Elfellah *et al.* (2012).

4.2.6.3. Teneurs en tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des polyphénols de structures plus ou moins complexes, réparties en deux catégories : la première concerne les tannins galliques, ceux qui sont formés par estérification de l'acide gallique ; et la deuxième catégorie est celle des tannins ellagiques formés à la base de l'acide ellagique, un dimère de l'acide gallique [2].

Ces composés ont également de différentes combinaisons de glucose, d'acide gallique, d'acide hexahydroxydiphénique (qui donne naissance à l'acide ellagique après hydrolyse) et d'acide tétragallique [89]. Parmi ces structures la punicaline, punicalagine et granatine peuvent constituer un critère de reconnaissance dans le contrôle de la qualité des jus et des extraits de la grenade [8]. Les teneurs des jus ainsi que des pelures en tannins hydrolysables (TH), sont mentionnées dans le tableau 4.12.

Tableau 4.12 : Teneurs en tannins hydrolysables des trois cultivars.

	Teneurs en tannins hydrolysables	
	Jus (en g d'EAT/100 ml MF) b	Pelure (en g d'EAT/100 g) a
Bordj-mira	0.0131 ± 0.000115 c	2.338 ± 0.81
Doux de Messaad	0.0167 ± 0.0012 b	3.85 ± 0.63
Doux de Koléa	0.020 ± 0.00156 a	3.43 ± 0.53

(abc) : Pour les jus, la différence entre DM et DK est significative ($p < 0.05$), alors que les deux autres différences sont hautement significatives ($p < 0.01$). g d'EAT : g d'équivalent acide tannique.

Le tableau ci-dessus, indique que la teneur en TH des jus varie entre 0.0131 à 0.0202 g d'équivalent acide tannique par 100 ml de jus frais), sachant que le jus de DK renferme significativement ($p < 0.05$) plus de TH que les deux autres jus, il semblerait alors que le jus de ce cultivar présente une qualité gustative moindre à cause de l'astringence caractéristique des tannins hydrolysables. Nos résultats

sont en concordance avec ceux de Hmid. (2013), qu'a trouvé que les teneurs en TH de quelques jus de grenade marocains varient entre 0.0230 et 0.0480 g d'EAT/100 ml.

Comme s'est montré dans le tableau 4.12, les pelures sont significativement ($p < 0.001$) plus riche en TH que les jus, et ça c'est vrai pour les trois cultivars. Elfellah *et al.* (2012), ont rapporté une teneur plus élevée (13.9 g d'EAT/100 g MS). Ces différences peuvent s'expliquées par la nature de la variété analysée et la nature du solvant utilisé pour l'extraction des composés phénoliques de la pelure.

4.2.6.4. Teneurs en anthocyanines

Les anthocyanines qui sont des pigments naturels sont responsables de la couleur rose brillante des jus de grenade. C'est l'un des plus importants critères qui commandent l'acceptabilité du jus de grenade chez le consommateur [22].

Les teneurs des trois jus en anthocyanines exprimées en mg d'équivalent cyanidine-3-glucoside par litre de jus, sont rapportées dans le tableau 4.13.

Tableau 4.13 : Teneurs en anthocyanines des trois cultivars.

Jus de cultivar	Bordj-mira	Doux de Messaad	Doux de Koléa
Teneur en anthocyanines (en mg d'ECG/L)	74.92 ± 13.6	102.63 ± 5.2	92.13 ± 5.8

ECG : équivalent cyanidine-3-glycoside.

D'après le tableau ci-dessus, le jus de DM renferme la teneur la plus élevée en anthocyanines, même si les différences entre les teneurs en anthocyanines des trois jus ne sont pas significatives ($p > 0.05$). Ces teneurs sont moins importantes par rapport à celles trouvées par Hmid. (2013), dans des jus marocains (teneurs variées entre 64.16 et 188.7 mg d'ECG/L), et à celles de Fawole *et al.* (2011) (entre 165.3 et 269.3 mg d'ECG/L).

Les faibles teneurs en anthocyanines enregistrées dans nos jus, sont probablement dues à la dégradation des anthocyanines sous l'effet du froid durant la conservation des jus au congélateur. Ainsi, Mirsaeedghazi *et al.* (2011), ont

trouvé que la teneur du jus de grenade en anthocyanines diminue de 10 % après 20 jours de conservation à – 25 °C.

4.2.6.5. Pouvoir antioxydant

✓ Activité anti-radicalaire

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH est couramment utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres. Le degré de décoloration du réactif DPPH (passant du violet au jaune) (appendice C) traduit le potentiel de piégeage d'antioxydant. La rapidité de la perte de couleur est directement proportionnelle à l'activité antioxydante du donneur d'hydrogène [80]. Lors de nos travaux expérimentaux, nous avons remarqué le virage instantané de la couleur violette de la solution de DPPH au jaune, une fois qu'un volume de jus ou d'extrait de pelure est ajouté, cela donc traduit d'après Grigoras. (2012) la forte activité antioxydante de nos échantillons étudiés.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des jus et des extraits des pelures, exprimés en termes de pourcentages d'inhibition ou de réduction du radical DPPH, sont présentés dans le tableau 4.14.

Tableau 4.14 : Activités anti-radicalaires des trois cultivars.

	Activité anti-radicalaire	
	Pourcentage d'inhibition exercée par le jus (%) b	Pourcentage d'inhibition exercée par l'extrait de pelure (%) a
Bordj-mira	71.43 ± 6.67	83.73 ± 2.19
Doux de Messaad	66.72 ± 2.69	87.081 ± 1.34
Doux de Koléa	68.18 ± 2.84	85.067 ± 0.86

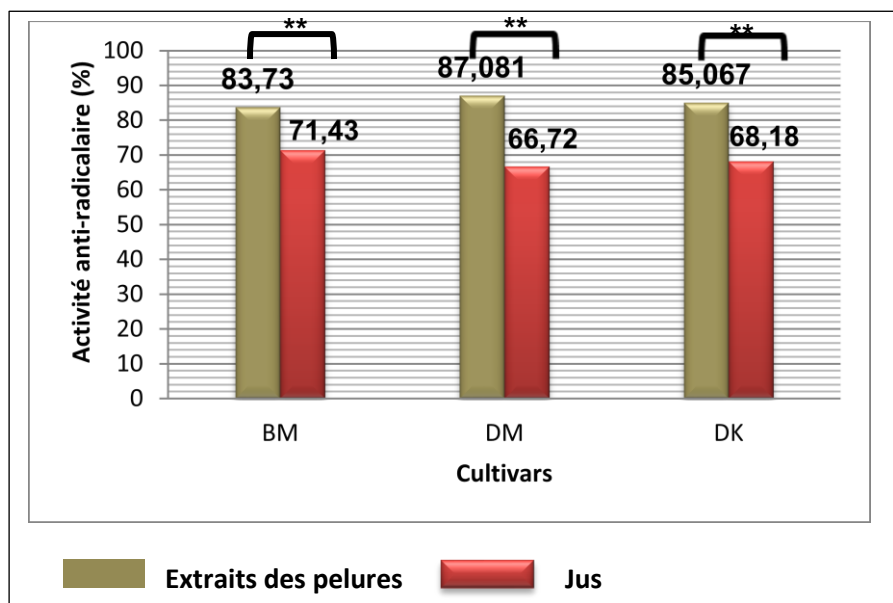
(ab) : les différences entre les jus et les extraits des pelures sont hautement significatives ($p < 0.01$), cultivars confondus.

D'après le tableau ci-dessus, nous remarquons que le jus de BM a l'activité anti-radicalaire la plus forte suivi de jus de DK et de DM respectivement. Il semblerait que nos trois jus analysés présentent des activités anti-radicalaires plus importantes que celles signalées par d'autres auteurs : elles sont en effet comprises entre 31.16 et 66.82 % dans des jus de grenades marocains [89], et entre 15.59 et 40.72 % dans des jus iraniens [90]. Ces différences pourraient être

expliquées par le fait que certains de ces auteurs ont analysé l'activité anti-radicalaire dans des jus dilués.

L'analyse statistique a montré que les différences entre les activités anti-radicalaires des trois jus, ne sont pas significatives ($p > 0.05$).

La figure 4.3, illustre la différence entre l'activité anti-radicalaire des jus et des extraits des pelures.



(**) : La différence entre les pelures et les jus est hautement significative ($p < 0.01$)

Figure 4.3 : Comparaison entre l'activité anti-radicalaire des jus et des extraits des pelures.

D'après le tableau 4.14 et la figure 4.3, les extraits des pelures ont des activités anti-radicalaires (situées entre 83.73 pour BM et 87.081 % pour DM) significativement ($p < 0.01$) plus élevées que les jus. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Tabaraki *et al.* (2012), qui ont trouvé une variation de l'activité anti-radicalaire des extraits des pelures de la grenade entre 60.55 et 83.52 %.

✓ Pouvoir réducteur

La quantification de l'activité antioxydant d'un extrait par le biais du pouvoir réducteur (PR) implique la capacité des antioxydants analysés à transformer le fer (III) en fer (II), grâce à leur faculté donatrice d'électron. Nos résultats du pouvoir

réducteur des jus et des extraits des pelures, exprimés en termes d'absorbances, sont regroupés dans le tableau 4.15.

Tableau 4.15 : Pouvoir réducteur des trois cultivars.

	Pouvoir réducteur (en absorbances)	
	Jus	Extraits des pelures
Bordj-mira	1.749 ± 0.052	1.945 ± 0.057
Doux de Messaad	1.788 ± 0.0026	1.876 ± 0.026
Doux de Koléa	1.737 ± 0.065	1.897 ± 0.015

D'après le tableau ci-dessus, le jus de DM a le meilleur pouvoir réducteur suivi de jus de BM et de DK respectivement, alors que l'extrait de pelure de BM exerce le meilleur pouvoir réducteur suivi des extraits de DK et de DM respectivement.

Les différences entre les jus sont non significatives ($p > 0.05$), et entre les jus et les extraits des pelures ne sont également pas significatives, sachant que les pelures présentent plus de PPT et une meilleure activité antioxydante relevée par le test de DPPH.

D'une manière générale, les polyphénols exercent leur action antioxydante au niveau physiologique, par le biais de deux mécanismes distincts : le premier fait intervenir la faculté des composés phénoliques à céder des atomes d'hydrogènes et/ou d'électrons singulés, en faveur des radicaux libres (particules chimiques ayant un ou plusieurs électrons célibataires capables de porter des modifications aux biomolécules, acides nucléiques, protéines, sucres et lipides) dans le milieu (figure 4.4) [3].

Par la suite à ce transfert, les radicaux libres se stabilisent, et le noyau phénolique qu'a cédé l'électron subit à son tour une auto-stabilisation par résonance (figure 4.5). Ce mécanisme est dit mécanisme anti-radicalaire [3].

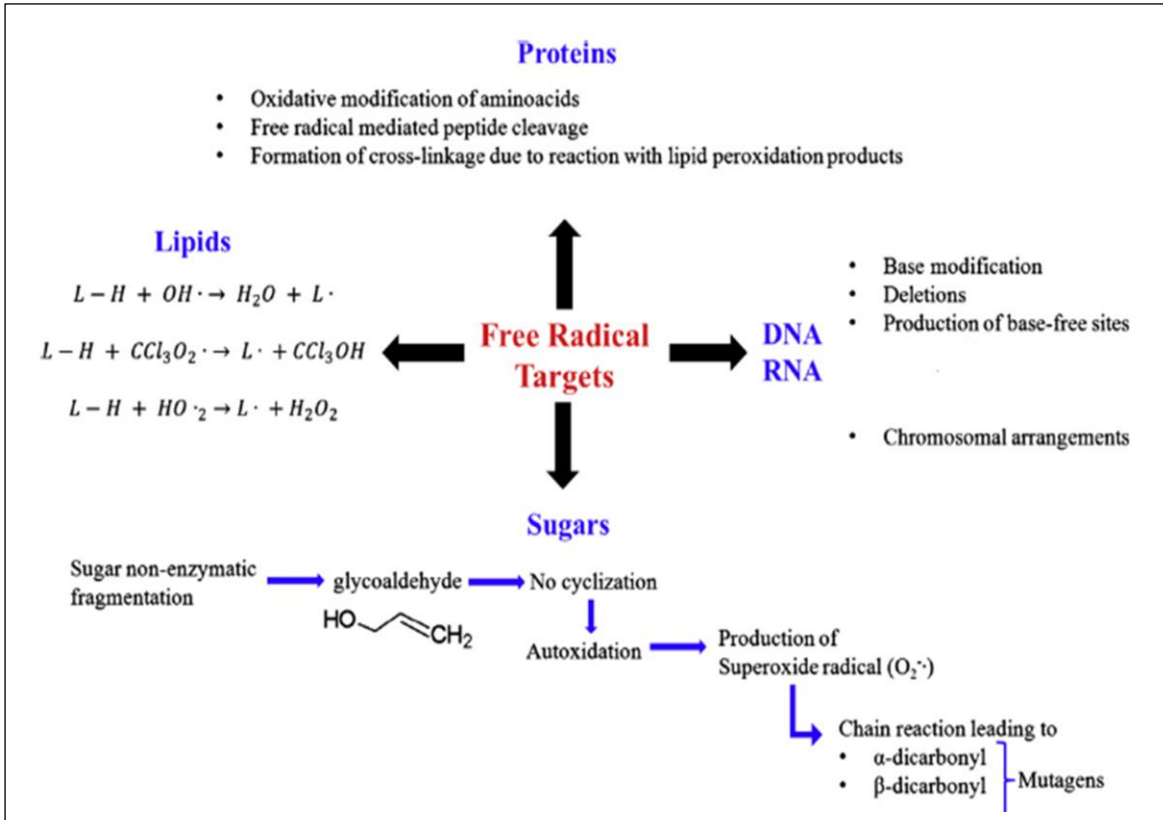


Figure 4.4 : Cibles et actions des radicaux libres dans la cellule [103]

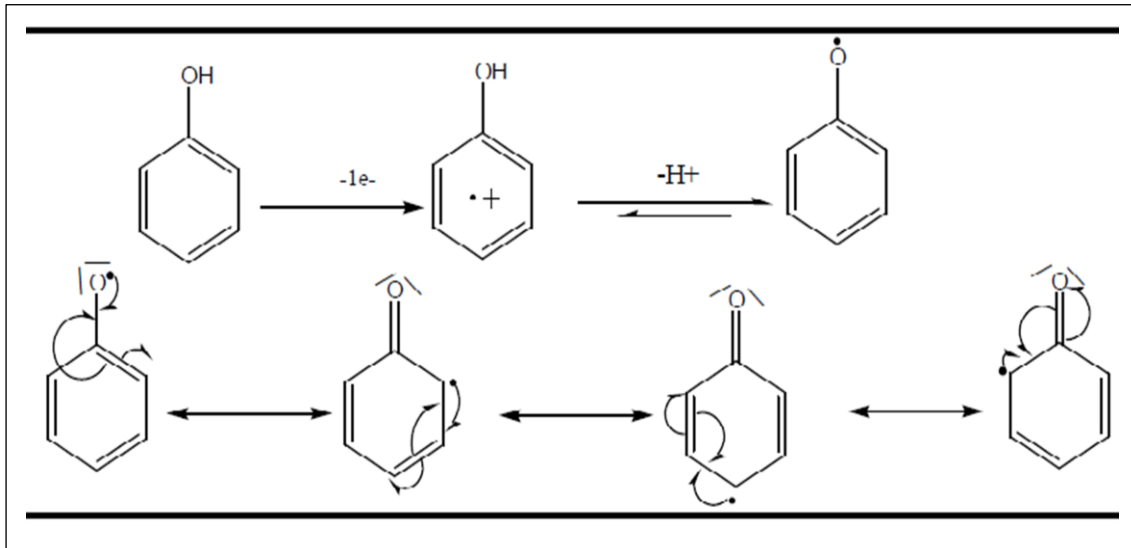


Figure 4.5 : Schéma du transfert d'électron et d'hydrogène et de stabilisation du noyau phénolique [104].

Le deuxième mécanisme est le *mécanisme des interactions* des composés phénoliques avec les protéines enzymatiques catalysant les réactions d'oxydation, tels que les peroxydases et les lipoxygénases [4], et leurs interactions avec les ions métalliques dont fer et cuivre cofacteurs de la peroxydation lipidique [104].

Okonogi *et al.* (2007), ont trouvé que les extraits des pelures des grenades exercent la meilleure activité anti-radicalaire (DPPH), comparée avec les extraits d'autres espèces fruitières. Allene. (2009), à son tour a montré que l'extrait de pelure de la grenade de variété Algérienne, présente le meilleur pouvoir réducteur, comparativement aux extraits de 28 espèces fruitières locales. Il convient sur la base de ces résultats, de noter que la pelure de la grenade est une très bonne source d'antioxydants naturels.

✓ Table de composition des trois cultivars

Dans le tableau 4.16, nous avons récapitulé la composition nutritionnelle des trois cultivars étudiés sous forme d'une table de composition, afin de mieux percevoir les différences entre les trois cultivars.

Tableau 4.16 : Table de composition des trois cultivars.

Caractéristique	Bordj-mira	Doux de Messaad	Doux de Koléa
Poids moyen (g)	228.1	152.86	125.63
Rendement en pulpe (%)	76.17	81.66	78.01
Rendement en jus (%)	45.33	54.33	36.67
Teneur en eau (%)	78.93	79.05	79.62
Teneur en acides organiques (%)	0.50	0.80	0.31
Sucres totaux (%)	16.33	11.33	14.33
Protéines (%)	0.300	0.297	0.374
Cendres (%)	0.408	0.483	0.474
Vitamine C (mg/100 ml)	4.8	8.53	11.60
Polyphénols totaux (%)	0.399	0.266	0.257
Flavonoïdes (%)	0.0155	0.0124	0.0128
Tannins hydrolysables (%)	0.0131	0.0167	0.020
Anthocyanines (mg/100 ml)	7.492	10.263	9.213
Pouvoir antioxydant (%)	71.43	66.72	68.18

D'après l'ensemble des résultats obtenus ci-avant, nous pouvons conclure que les trois cultivars étudiés (Bordj-mira n°11, Doux de Messaad et Doux de Koléa), présentent d'une part une qualité nutritionnelle acceptable, vue leur richesse en matières sèches solubles, en sucres et en polyphénols antioxydants. D'autre part, les trois cultivars ont également de bonnes qualités technologiques et commerciales, grâce aux critères pomologiques et technologiques optimaux, notamment le poids moyen de fruits, le rendement en pulpe, le rendement en jus, le taux de solides solubles, l'acidité titrable et l'indice de maturité.

4.3. Corrélations entre les caractéristiques étudiées

Par le biais de l'analyse des corrélations, on détermine ce que n'appelle : les coefficients des corrélations. Le coefficient de corrélation $r(X,Y)$ traduit la liaison entre deux variables X et Y. Il varie entre deux valeurs $- 1$ et $+ 1$; la valeur $- 1$ ou $+ 1$ signifie qu'il existe une relation linéaire exacte, décroissante ou croissante respectivement, entre les deux variables. Par contre, une valeur faible (proche de 0) du coefficient de corrélation peut traduire, non seulement l'absence de liaison linéaire, mais éventuellement l'existence d'une liaison non linéaire entre les deux variables [106].

Dans le tableau 4.17, nous trouvons les valeurs des coefficients des corrélations entre les caractéristiques des jus, ainsi que le niveau de signification de chaque corrélation.

D'après la matrice des corrélations des caractéristiques du jus (figure 4.17), nous signalons la présence des corrélations significatives à ($p < 0.05$) suivantes :

- ✓ La corrélation entre le rendement en pulpes et les sucres totaux des jus des trois cultivars, est négative avec un coefficient de corrélation ($r = - 0.997327$) ;
- ✓ La corrélation entre les cendres et les flavonoïdes des jus des trois cultivars, est négative avec un coefficient de corrélation ($r = - 0.999961$) ;
- ✓ La corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les anthocyanines des jus des trois cultivars, est négative avec le coefficient de corrélation ($r = - 0.997030$).

Tableau 4.17 : Matrice des corrélations entre les caractéristiques des jus.

Variable	PM	RP	RJ	H	C	TSS	AT	IM	ST	PPT	TH	F	ACY	AAR	PR
PM	1,000000	-0,564382	0,245758	-0,811375	-0,932499	-0,991302	0,130156	-0,547523	0,623194	0,979508	-0,971555	0,929292	-0,799634	0,843505	-0,037212
RP	-0,564382	1,000000	0,661495	-0,024609	0,824439	0,450828	0,745034	-0,381770	-0,997327	-0,719079	0,352835	-0,829376	0,947010	-0,919460	0,845944
RJ	0,245758	0,661495	1,000000	-0,766001	0,120928	-0,371193	0,993072	-0,945685	-0,604927	0,045494	-0,468319	-0,129638	0,385554	-0,313350	0,959515
H	-0,811375	-0,024609	-0,766001	1,000000	0,545491	0,881246	0,685159	0,933372	-0,048505	-0,677022	0,926719	-0,538112	0,297803	-0,370437	-0,553928
C	-0,932499	0,824439	0,120928	0,545491	1,000000	0,876654	0,236731	0,208338	-0,863589	-0,986132	0,820443	-0,999961	0,962538	-0,980561	0,395624
TSS	-0,991302	0,450828	-0,371193	0,881246	0,876654	1,000000	0,259513	0,652890	-0,514846	-0,944481	0,994271	-0,872599	0,713650	-0,765478	-0,094629
AT	0,130156	0,745034	0,993072	-0,685159	0,236731	-0,259513	1,000000	-0,900936	-0,694303	-0,072203	-0,361253	-0,245252	0,491302	-0,422765	0,985963
IM	-0,547523	-0,381770	-0,945685	0,933372	0,208338	0,652890	0,900936	1,000000	0,313213	-0,367770	0,730113	-0,199744	-0,064663	-0,012380	-0,815836
ST	0,623194	-0,997327	-0,604927	-0,048505	-0,863589	-0,514846	0,694303	0,313213	1,000000	0,767936	-0,420263	0,867982	-0,967949	0,945732	-0,804716
PPT	0,979508	-0,719079	0,045494	-0,677022	-0,986132	-0,944481	0,072203	-0,367770	0,767936	1,000000	-0,903951	0,984637	-0,904190	0,934399	-0,237715
TH	-0,971555	0,352835	-0,468319	0,926719	0,820443	0,994271	0,361253	0,730113	-0,420263	-0,903951	1,000000	-0,815392	0,634685	-0,692314	-0,200496
F	0,929292	-0,829376	-0,129638	-0,538112	-0,999961	-0,872599	0,245252	-0,199744	0,867982	0,984637	-0,815392	1,000000	-0,964881	0,982246	-0,403671
ACY	-0,799634	0,947010	0,385554	0,297803	0,962538	0,713650	0,491302	-0,064663	-0,967949	-0,904190	0,634685	-0,964881	1,000000	-0,997030	0,629827
AAR	0,843505	-0,919460	-0,313350	-0,370437	-0,980561	-0,765478	0,422765	-0,012380	0,945732	0,934399	-0,692314	0,982246	-0,997030	1,000000	-0,568138
PR	-0,037212	0,845944	0,959515	-0,553928	0,395624	-0,094629	0,985963	-0,815836	-0,804716	-0,237715	-0,200496	-0,403671	0,629827	-0,568138	1,000000

Correlations (Spreadsheet1)

Marked correlations are significant at $p < ,05000$

N=3 (Casewise deletion of missing data)

Légende de la matrice :

PM = poids moyens, RP = rendement en pulpe, RJ = rendement en jus, H = humidité, C= cendres, AT = acidité titrable, ST = sucres totaux, F = flavonoïdes, ACY= anthocyanines, AAR = activité anti-radicalaire, PR = pouvoir réducteur.

D'autres corrélations sont également fortes, mais non significatives au seuil 5 %. Parmi ces dernières nous citons :

- ✓ La corrélation positive entre le rendement en jus et l'acidité titrable ;
- ✓ La corrélation positive entre l'acidité titrable et le pouvoir réducteur des jus ;
- ✓ Les corrélations positives entre les polyphénols totaux et le poids moyen des jus, entre les polyphénols totaux, les flavonoïdes et le pouvoir anti-radicalaire des jus ;
- ✓ La corrélation positive entre les tannins hydrolysables et le taux de solides solubles des jus.

Sur la base des corrélations significatives citées plus haut, nous pouvons présumer que les cultivars de grenade ayant des rendements en pulpe importants, sont aussi les plus riches en sucres. Les cultivars dont les jus sont riches en cendres, sont moins riches en flavonoïdes. Enfin, les anthocyanines des jus de grenade ne participent pas à leur pouvoir anti-radicalaire.

Les corrélations entre les caractéristiques des pelures sont données par le tableau 4.18.

Tableau 4.18 : Matrice des corrélations entre les caractéristiques de la pelure.

Correlations (Spreadsheet1)							
Marked correlations are significant at $p < ,05000$							
N=3 (Casewise deletion of missing data)							
Variable	PM	PP	PPT	TH	F	AAR	PR
PM	1,000000	-0,174821	-0,811967	-0,861878	-0,137713	-0,622289	0,846816
PP	-0,174821	1,000000	0,716663	-0,348631	0,999294	-0,661943	0,375653
PPT	-0,811967	0,716663	1,000000	0,403812	0,689960	0,048363	-0,377124
TH	-0,861878	-0,348631	0,403812	1,000000	-0,383592	0,933301	-0,999580
F	-0,137713	0,999294	0,689960	-0,383592	1,000000	-0,689632	0,410201
AAR	-0,622289	-0,661943	0,048363	0,933301	-0,689632	1,000000	-0,943318
PR	0,846816	0,375653	-0,377124	-0,999580	0,410201	-0,943318	1,000000

PP = poids de la pelure, PM = poids moyen du fruit.

Parmi les caractéristiques étudiées des pelures, nous distinguons que :

- ✓ Les flavonoïdes des pelures sont significativement corrélés avec leurs poids ($r = 0.999294$) ;
- ✓ Le pouvoir réducteur des pelures est négativement corrélé avec leur contenu en tannins hydrolysables ($r = - 0.999580$).

Le tableau 4.19, représente la matrice des corrélations entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des grenades étudiées.

Tableau 4.19 : Matrice des corrélations entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des grenades étudiées.

Correlations (Spreadsheet29)					
Marked correlations are significant at $p < ,01000$					
N=6 (Casewise deletion of missing data)					
Variable	PPT	TH	FT	AAR	PR
PPT	1,000000	0,954362	0,971158	0,945353	0,878641
TH	0,954362	1,000000	0,878516	0,971757	0,838596
FT	0,971158	0,878516	1,000000	0,902682	0,929763
AAR	0,945353	0,971757	0,902682	1,000000	0,878899
PR	0,878641	0,838596	0,929763	0,878899	1,000000

Abréviations : FT = flavonoïdes totaux, AAR = activité anti-radicalaire, PR = pouvoir réducteur.

De cette matrice nous distinguons des corrélations hautement significatives (au seuil de 1 %). Ce sont les suivantes :

- ✓ Les polyphénols totaux sont positivement corrélés aux tannins hydrolysables avec un coefficient de corrélation de ($r = 0.954362$), avec les flavonoïdes ($r = 0.971158$) et avec l'activité anti-radicalaire ($r = 0.945353$) ;
- ✓ Les tannins hydrolysables sont positivement corrélés ($r = 0.971757$) avec l'activité anti-radicalaire ;
- ✓ Les flavonoïdes sont positivement corrélés ($r = 0.971158$) avec les polyphénols totaux et avec le pouvoir réducteur ($r = 0.929763$).
- ✓ L'activité anti-radicalaire de la grenade est due aux tannins hydrolysables, tandis que le pouvoir réducteur est dû plutôt aux flavonoïdes.

D'après Orak *et al.* (2012), les polyphénols totaux de jus sont significativement corrélés avec les tannins. Dans la pelure, les polyphénols totaux sont significativement corrélés avec les flavonoïdes. Par ailleurs, l'activité anti-radicalaire des jus est significativement corrélée avec les polyphénols totaux

et avec les tannins. Dans la pelure, des corrélations positives existent entre l'activité anti-radicalaire, les polyphénols totaux, les tannins et les flavonoïdes.

À la lumière de ces observations, nous pouvons conclure que les polyphénols sont responsables du pouvoir antioxydant de la grenade, et que les tannins hydrolysables et les flavonoïdes contribuent majoritairement à cette propriété.

4.4. Extraction des polyphénols de la pelure

4.4.1. Etude et optimisation de l'extraction par plan factoriel à deux niveaux

✓ Analyses de la réponse Y1 ou polyphénols totaux (PPT)

Après avoir construit la matrice d'expériences du plan factoriel complet à deux niveaux, chaque réponse du plan a été soumise à des analyses statistiques conduites par le logiciel Design Expert® Software 7.0.0. La signification du modèle mathématique postulé a été estimée, et les termes non significatifs du modèle sont éliminés automatiquement en utilisant l'option backward. Les résultats de l'analyse de la variance pour la réponse (Y1 ou polyphénols totaux PPT) sont rassemblés dans le tableau 4.20.

Tableau 4.20 : Table de l'ANOVA pour la réponse (PPT).

Source de variation	Somme des carrées	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur du rapport F	Valeur de probabilité $p > F$	Signification
Modèle	151	4	37.9	62.1	0.00324	significatif
A : temps de l'extraction	0.142	1	0.142	0.233	0.662	non significatif
B : hydromodule	148	1	148	243	0.000574	significatif
C : concentration de l'éthanol	0.130	1	0.130	0.213	0.676	non significatif
AC : interaction	3.05	1	3.05	4.99	0.112	non significatif

La valeur F du rapport de Fisher nous renseigne si le modèle postulé peut exprimer les variations de la réponse Y1 en fonctions des variables étudiées. Cette valeur est calculée par la formule suivante :

$$F = \frac{SCM/(p-1)}{SCRES/(N-1)}$$

Avec :

SCM : c'est la somme des carrés moyens ;

SCRES : la somme des carrés des résidus ;

N : le nombre d'essais expérimentaux et

P : le nombre de termes ou coefficients du modèle postulé.

La valeur F du modèle postulé est de 62.1 ce qui implique que le modèle choisi est significatif, c'est-à-dire qu'il est censé décrire plus ou moins correctement les variations de PPT en fonction des facteurs étudiés.

Pour un terme donné, si la valeur de probabilité ($p > F$) est inférieure au seuil 0.05, cela indique que ce terme est significatif, c'est-à-dire que l'influence du facteur au quel ce terme est associé dans l'équation du modèle, est jugée significative. Dans ce cas, et d'après les données de la table d'ANOVA, le seul facteur significatif est l'hydromodule (B) ($p < 0.000574$).

Le coefficient de corrélation linéaire multiple R^2 , doit être le plus proche de la valeur 1 que possible, ce coefficient est calculé par la relation suivante :

$$R^2 = \frac{SCM}{SCT} \quad \text{Ou bien :} \quad R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}$$

Avec :

SCM : somme des carrés moyens ;

SCT : somme des carrés totale ;

\hat{y}_i : réponse calculée ;

Y_i : réponse expérimentale ;

\bar{Y} : réponse moyenne.

Le coefficient R^2 ajusté doit également être maximal :

$$R^2_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{SCRES/(N-p)}{SCT/(N-1)}$$

Ces critères d'ajustement du modèle sont donnés par le tableau 4.21 :

Tableau 4.21 : Critères d'ajustement du modèle postulé pour la réponse PPT.

Type du modèle	R ²	R ² ajusté	R ² prédit
Modèle factoriel	0.988	0.972	0.915

Pour ce modèle le coefficient R² est assez important, il est égal à 0.988, celle du coefficient ajusté est R² ajusté est égal à 0.972 et le R² prédit est égal à 0.915. On observe que R² ajusté prédit est en agrément avec le R² prédit. Les caractéristiques du modèle factoriel mentionnées dans le tableau 4.21, indiquent que ce modèle est bien ajusté et qu'il décrit crédiblement la variation de PPT en fonction des facteurs étudiés.

✓ Le tracé de probabilité et le diagramme de Pareto

Nous pouvons schématiser l'ampleur de l'effet de chaque facteur étudié sur la réponse PPT, en traçant d'une part, les probabilités en fonction des effets, c'est le tracé de probabilité ou droite de Henry (figure 4.6), et d'autre part, le diagramme de Pareto qui représente les différences entre les effets de facteurs sous forme d'un histogramme (figure 4.7).

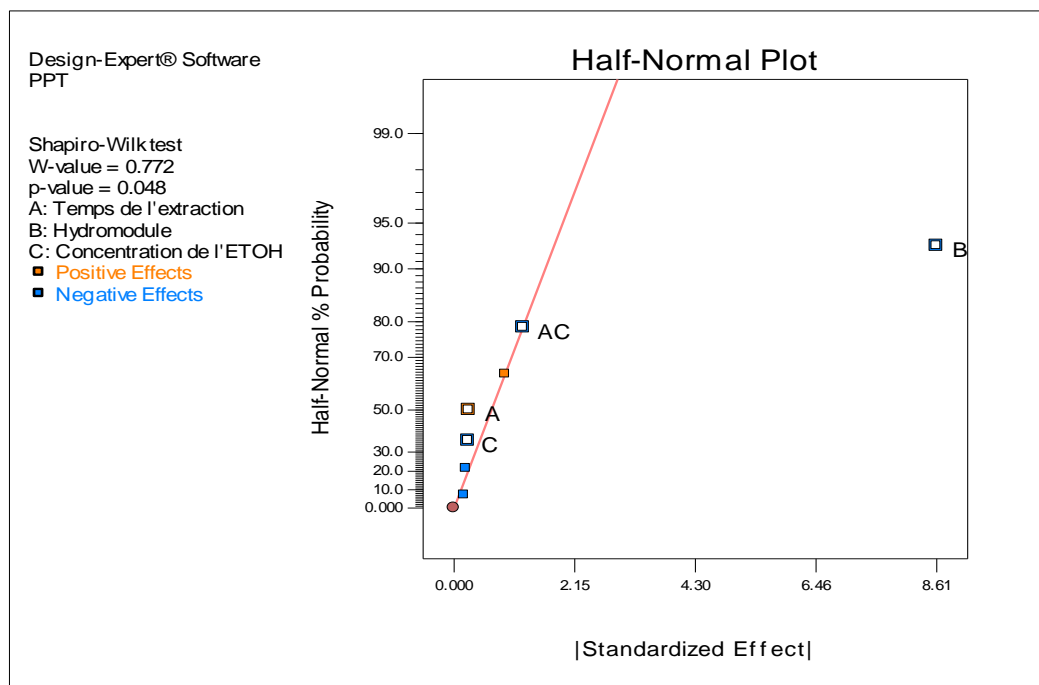


Figure 4.6 : Tracé de probabilité pour la réponse PPT.

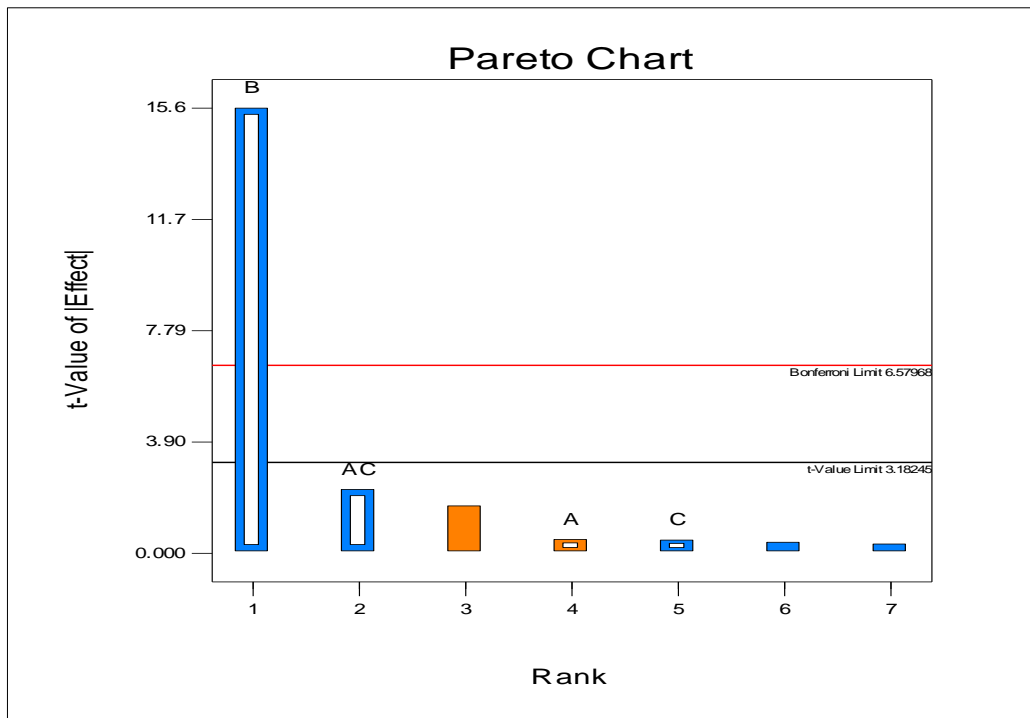


Figure 4.7 : Diagramme de Pareto de la réponse PPT.

Le tracé de probabilité (figure 4.6) indique que le seul facteur qui a une influence négative notable, est l'hydromodule (B), cette remarque est confirmée par le diagramme de Pareto (figure 4.7).

✓ Tracé des réponses actuelles en fonction des réponses prédites

La figure 4.8, représente le tracé des réponses PPT actuelles ou expérimentales en fonction de celles prédites, c'est à dire calculées par l'équation du modèle factoriel postulé.

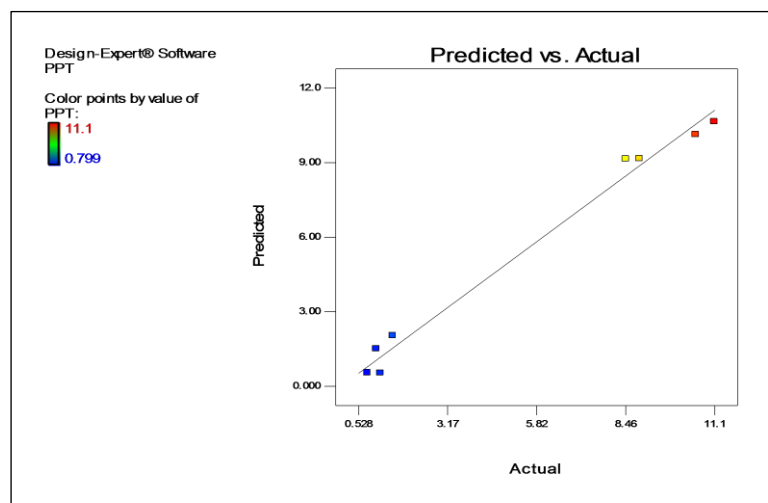


Figure 4.8 : Tracé des valeurs PPT prédites en fonction des valeurs actuelles.

Nous observons dans la figure 4.8, une bonne linéarité entre les valeurs de PPT expérimentales (actuelles) avec les valeurs de PPT prédites par l'équation du modèle factoriel postulé.

✓ Equations du modèle factoriel décrivant la réponse PPT

Le modèle factoriel choisi peut avoir deux équations de $PPT = f(A, B, C \text{ et } AC)$, une équation en termes de facteurs actuels et l'autre en termes de facteurs codés.

➤ Equation du modèle en termes de facteurs actuels :

$$PPT (\%) = 11.2 + 0.0652 \times (A) - 0.108 \times (B) + 0.0109 \times (C) - 0.00107 \times (AC) \quad (4.1)$$

➤ Equation en termes de facteurs codés :

$$PPT (\%) = 5.45 + 0.133 \times (A) - 4.30 \times (B) - 0.128 \times (C) - 0.617 \times (AC) \quad (4.2)$$

Avec :

A : Temps de l'extraction (h), B : l'hydromodule, C : la concentration de l'éthanol (%) et AC : l'interaction entre A et C.

Selon l'analyse statistique toutes les autres interactions qui restent sont éliminées du modèle, car leur présence dans le modèle diminue son ajustement.

✓ Courbes des effets individuels, d'isorréponses et de surface de réponses PPT

Les courbes des figures 4.9, 4.10 et 4.11, représentent graphiquement l'effet individuel de chaque facteur étudié sur la réponse PPT, avec les coefficients de corrélations correspondants.

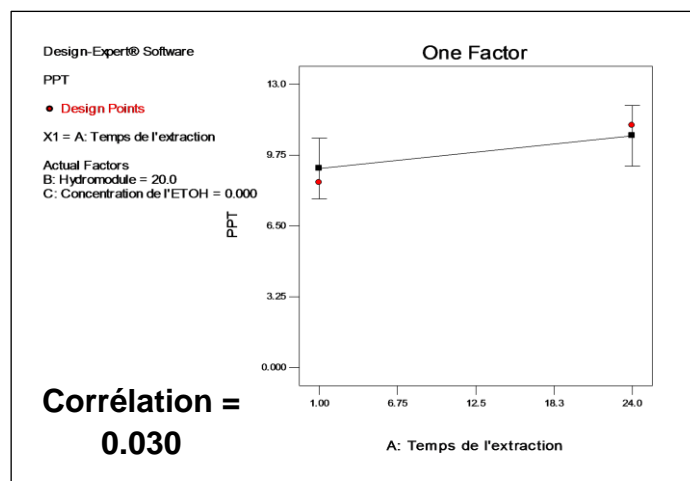


Figure 4.9 : Représentation de l'effet du temps d'extraction sur les PPT.

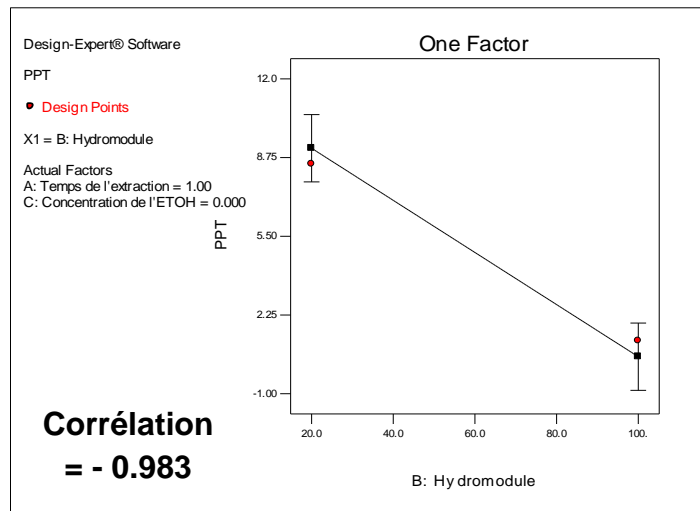


Figure 4.10 : Représentation de l'effet de l'hydromodule sur les PPT.

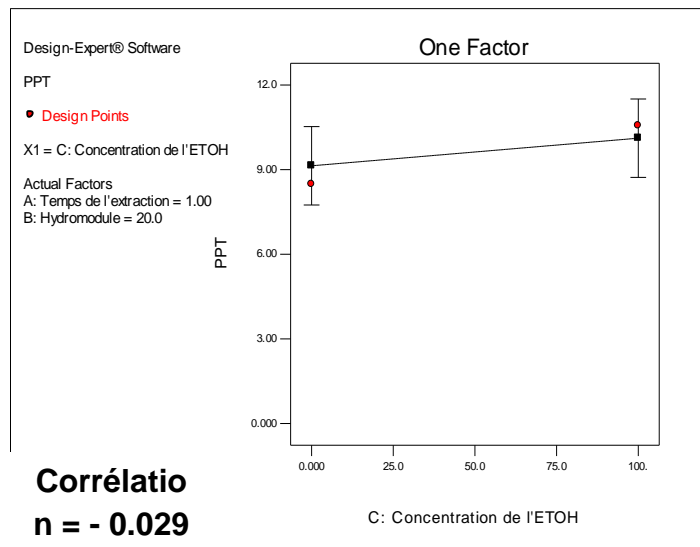


Figure 4.11 : Représentation de l'effet de la concentration de l'éthanol dans le solvant sur PPT

D'après les trois dernières figures ci-avant, nous distinguons que :

- Le temps d'extraction exerce un effet positif léger sur la réponse PPT ;
- L'hydromodule exerce un effet négatif considérable sur la réponse PPT et
- La concentration de l'éthanol dans le solvant, exerce un effet négatif léger sur la réponse PPT.

La figure 4.12, montre l'effet comparé du temps d'extraction entre une macération à 0 % éthanol c'est-à-dire à 100 % eau, et une macération à 100 % d'éthanol.

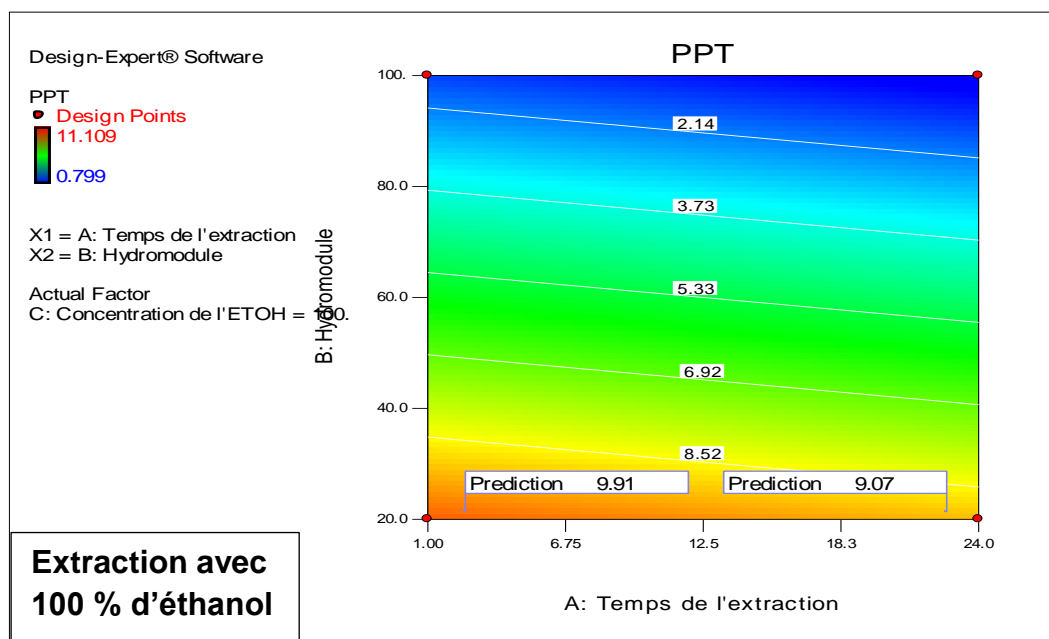
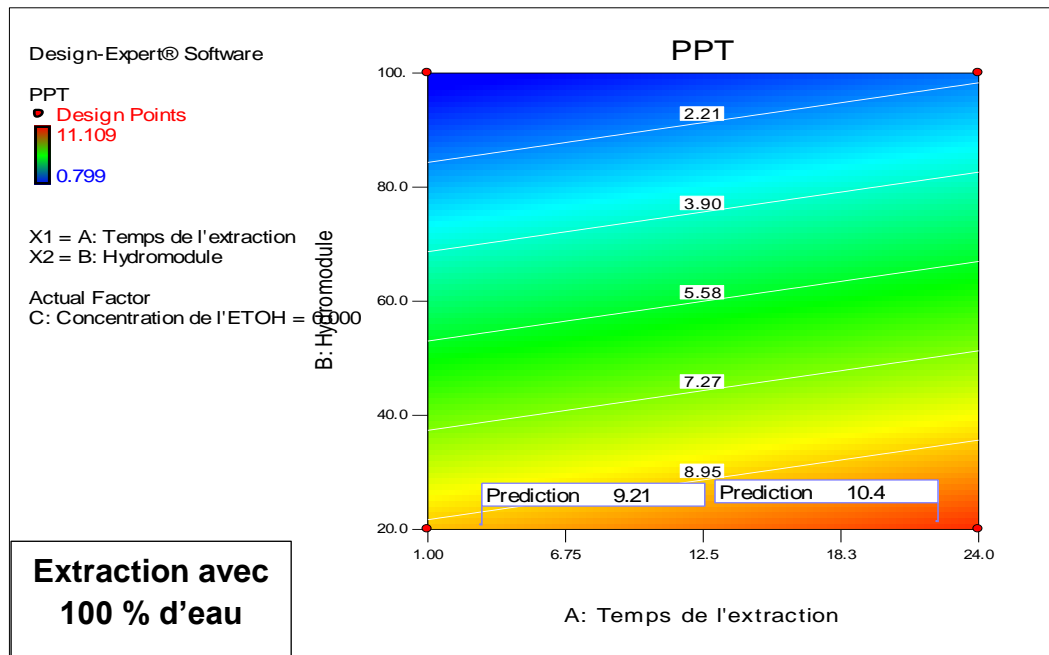


Figure 4.12 : Effets comparés du temps d'extraction entre une extraction aqueuse et éthanolique.

D'après la figure 4.12, nous remarquons que lors d'une extraction avec 100 % d'eau, l'allongement de la durée d'extraction favorise l'augmentation de la teneur en polyphénols totaux extraits (elle passe en effet de 9.21 à 10.4 %), mais lors d'une extraction avec 100 % d'éthanol l'inverse se produit (passant de 9.91 à 9.07). Cette différence qui reste statistiquement non significative ($p > 0.05$), est probablement due aux différences de propriétés physico-chimiques des deux solvants (eau et éthanol), surtout la viscosité et le coefficient de diffusion.

Les courbes des figures 4.13, 4.14 et 4.15, illustrent les variations de PPT en fonction de différents facteurs, sous forme 3D (surface de réponses) et 2D (courbe d'isoréponses). Dans ces représentations nous pouvons extérioriser la valeur de PPT prédite avec ces combinaisons de facteurs, à n'importe quel point de la courbe isoréponses, en utilisant l'option (Add flag).

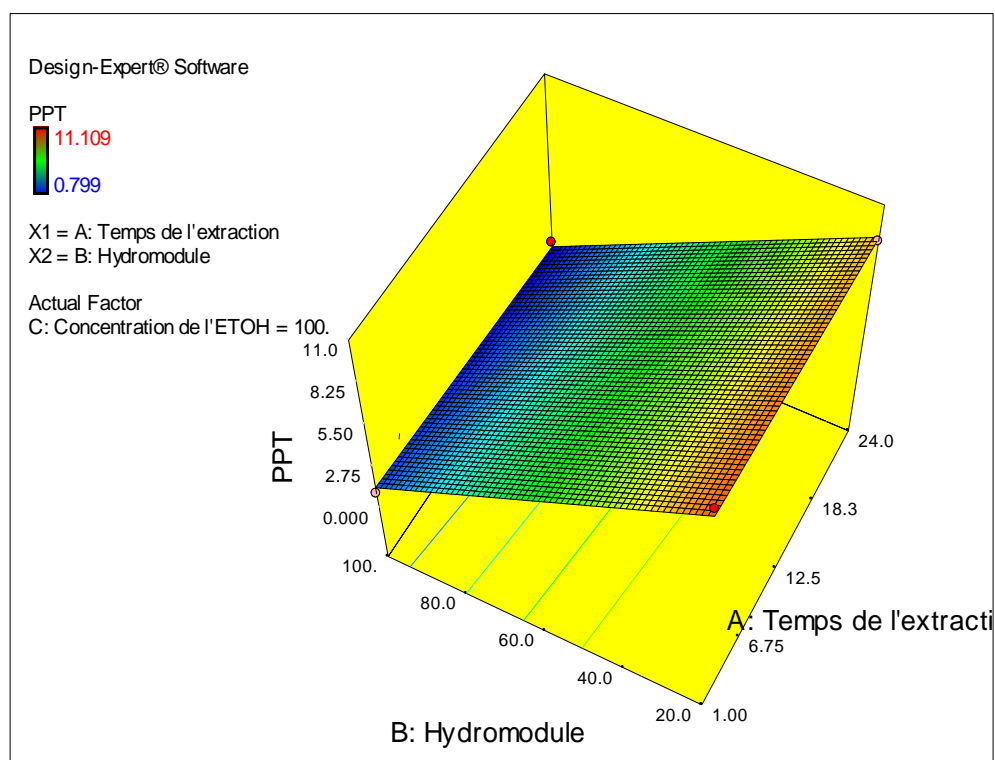


Figure 4.13 : Surface de réponses PPT en fonction du temps d'extraction et de l'hydromodule (interaction AB).

Nous remarquons des figures 4.13 et 4.14, que l'hydromodule à un effet négatif sur les PPT, c'est-à-dire plus le volume du solvant augmente en fixant la masse du matériel végétal, plus les PPT des extraits se trouvent diminués.

Nous pouvons expliquer cette tendance par un effet de dilution que des volumes élevés de solvant exercent sur les polyphénols dissouts dans la matrice végétale, car la quantité de ces solutés dans la matrice étant fixes, donc l'augmentation du volume de solvant peut entraîner la diminution de la concentration des solutés ; et il faut signaler à ce fait, que des volumes modérés et pas trop faibles de solvant, suffisent pour réaliser une extraction rentable.

Par contre et d'après la littérature [84,99], l'utilisation des grands volumes de solvants pour l'extraction des polyphénols, facilite l'opération d'extraction et

favorise l'augmentation des rendements d'extraction, suite à l'augmentation du gradient des concentrations du soluté entre la matrice végétal et le solvant.

Il convient cependant de distinguer entre rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux de l'extrait, ces deux grandeurs ne sont pas forcément corrélées du moment où la totalité des polyphénols du matériel végétal est épuisée par le solvant, et si après ça on continue l'extraction, le rendement d'extraction augmente et la teneur en polyphénols extraits diminue, par le fait de l'extraction d'autres solutés contenus dans la matrice végétale.

Les courbes d'iso-réponses et de surface de réponses PPT en fonction de la concentration de l'éthanol dans le solvant et de l'hydromodule (interaction BC), sont présentées dans la figure 4.14.

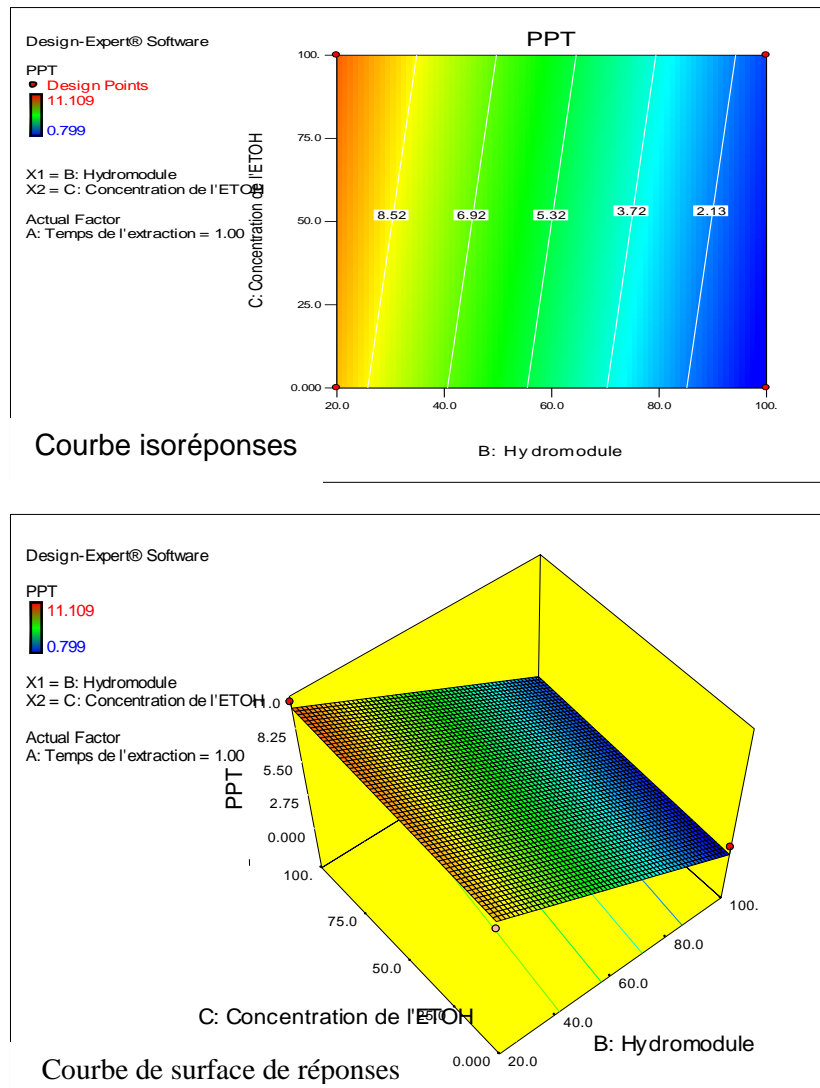


Figure 4.14 : Représentations des réponses PPT en fonction de la concentration en éthanol et d'hydromodule (interaction BC).

Les courbes de la figure 4.14, font sortir qu'il n'y a pas une grande différence entre l'effet de l'éthanol et de l'eau sur l'extraction des PPT de la pelure de grenade, la différence étant non significative ($p > 0.05$). Nous pouvons donc pour des raisons économiques privilégier l'utilisation de l'eau au lieu de l'éthanol pour l'extraction des polyphénols à partir de la pelure de grenade.

De leur côté, Çam et Cihat İçyer. (2013), ont préconisé l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction des polyphénols de la pelure de grenade, après avoir montré que la différence entre l'extraction à l'eau et au méthanol est statistiquement non significative.

L'efficacité de l'eau pour l'extraction des polyphénols de la grenade réside probablement dans la nature hydrosoluble des tannins hydrolysables [82], qui représentent une grande partie des polyphénols totaux [6].

Les courbes d'isoréponses et de surface de réponses PPT en fonction de la concentration de l'éthanol dans le solvant et du temps d'extraction (interaction AC), sont présentées dans la figure 4.15.

Observant les surfaces de réponses des trois interactions, on trouve pourquoi on choisit l'interaction AC comme seule interaction à ajouter dans le modèle factoriel. En effet, et contrairement aux autres interactions, toutes les réponses réparties dans la surface AC sont favorables (PPT maximisées), car elles sont colorées en orange (figure 4.15). Sur ça, on a trouvé utile d'ajouter AC au modèle factoriel avec lequel on veut par la suite maximiser la réponse PPT dans l'étape d'optimisation.

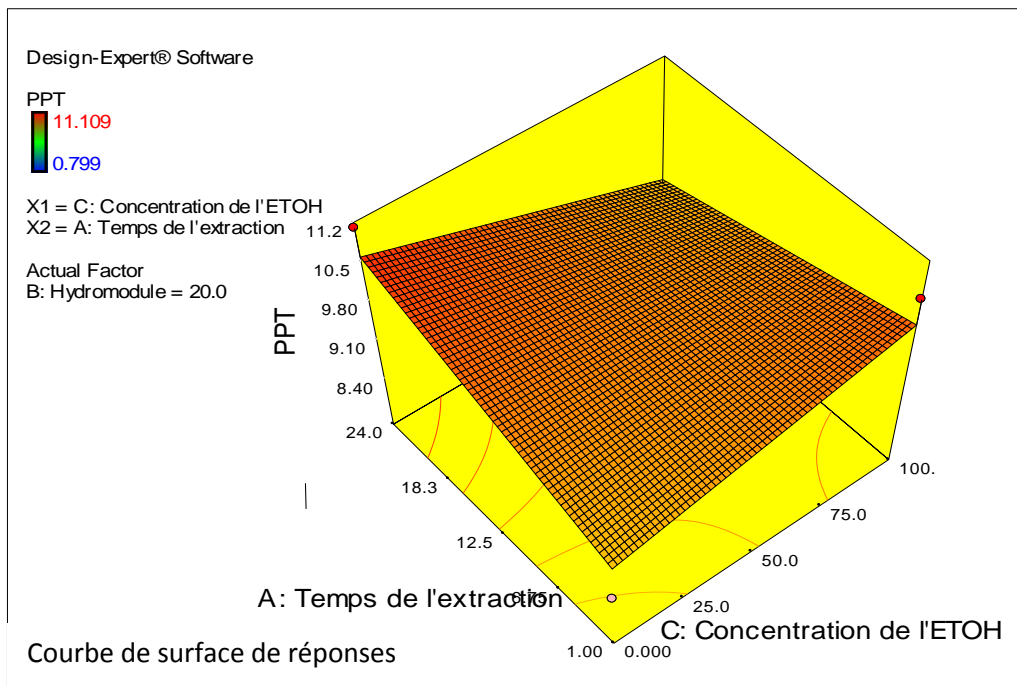
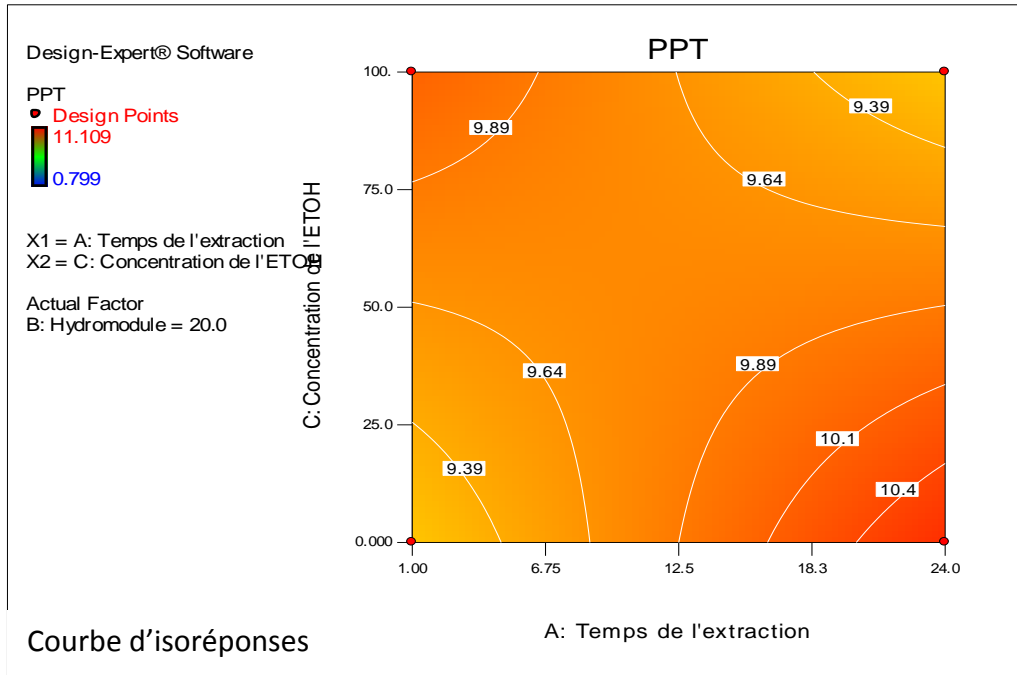


Figure 4.15 : Représentations des PPT en fonction du temps d'extraction et de la concentration de l'éthanol (interaction AC).

✓ Analyses de la réponse Y_2 ou activité antioxydante (AA)

Les résultats de l'ANOVA de la réponse AA sont donnés dans le tableau 4.22.

Tableau 4.22 : Table de l'ANOVA de la réponse AA.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur F	Probabilité $p > F$	Signification
Modèle	131	3	43.5	20.3	0.00698	significatif
B : hydromodule	67.3	1	67.3	31.4	0.00499	significatif
C : Concentration de l'éthanol	10.0	1	10	4.67	0.0968	non significatif
BC : interaction	53.3	1	53.3	24.8	0.00758	significatif

Une valeur du rapport de Fisher F égale à 20.3, implique que le modèle postulé est significatif ($p = 0.00698$), c'est-à-dire que c'est le meilleur modèle expliquant la réponse AA. Il reste juste de chercher les moyens pour l'ajuster. Pour ce fait, on désélectionne par l'option (backward) les termes des facteurs provoquant un manque d'ajustement du modèle. Ici on trouve que B et BC sont les seuls termes à effet significatif ($p = 0.00499$ et $p = 0.00758$, respectivement). Les critères d'ajustement du modèle sont mentionnés dans le tableau 4.23.

Tableau 4.23 : Critères d'ajustement du modèle postulé pour AA.

Type du modèle	R^2	R^2 ajusté	R^2 prédit
Modèle factoriel	0.938	0.892	0.753

De ce tableau, nous remarquons que le coefficient de corrélation linéaire multiple ou R^2 pour la réponse AA est assez convaincant ($R^2 = 0.938$), et que le R^2 ajusté est en agrément avec le R^2 prédit.

Sur la base de ces données, nous signalons que le modèle factoriel postulé pour la description de la variation des AA est de bonne qualité prédictive. Les équations de ce présent modèle sont données par la suite.

✓ Equations du modèle postulé en termes de facteurs actuels et codés

➤ Equation en termes de facteurs codés

$$AA (\%) = 74.9 - 2.90 \times (B) + 1.12 \times (C) - 2.58 \times (BC) \quad (4.3)$$

➤ Equation en termes de facteurs actuels

$$AA (\%) = 74.3 - 0.00798 \times (B) + 0.0998 \times (C) - 0.00129 \times (BC) \quad (4.4)$$

Avec :

AA : activité antioxydante de l'extrait, B : hydromodule, C : concentration de l'éthanol dans le solvant, BC : interaction entre B et C.

✓ Tracé de probabilité et diagramme de Pareto de la réponse AA

Les figures 4.16 et 4.17, illustrent l'ampleur des effets des facteurs étudiés sur la réponse AA, par deux représentations graphiques : le tracé de probabilité (droite de Henry) et le diagramme de Pareto.

Le tracé de probabilité (figure 4.16) indique que deux facteurs ont des effets négatifs remarquables, ce sont les facteurs hydromodule et l'interaction entre l'hydromodule et l'éthanol du solvant (B et BC).

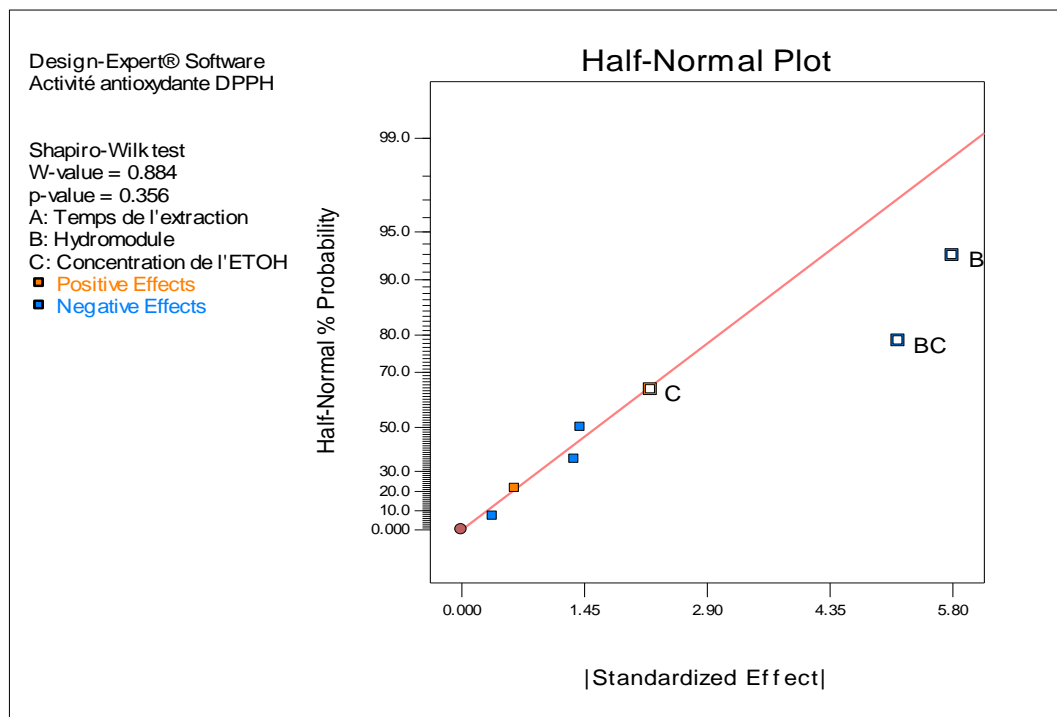


Figure 4.16 : Tracé de probabilité pour la réponse AA.

La remarque tirée du tracé de probabilité et confirmée par le traçage du diagramme de Pareto (figure 4.17).

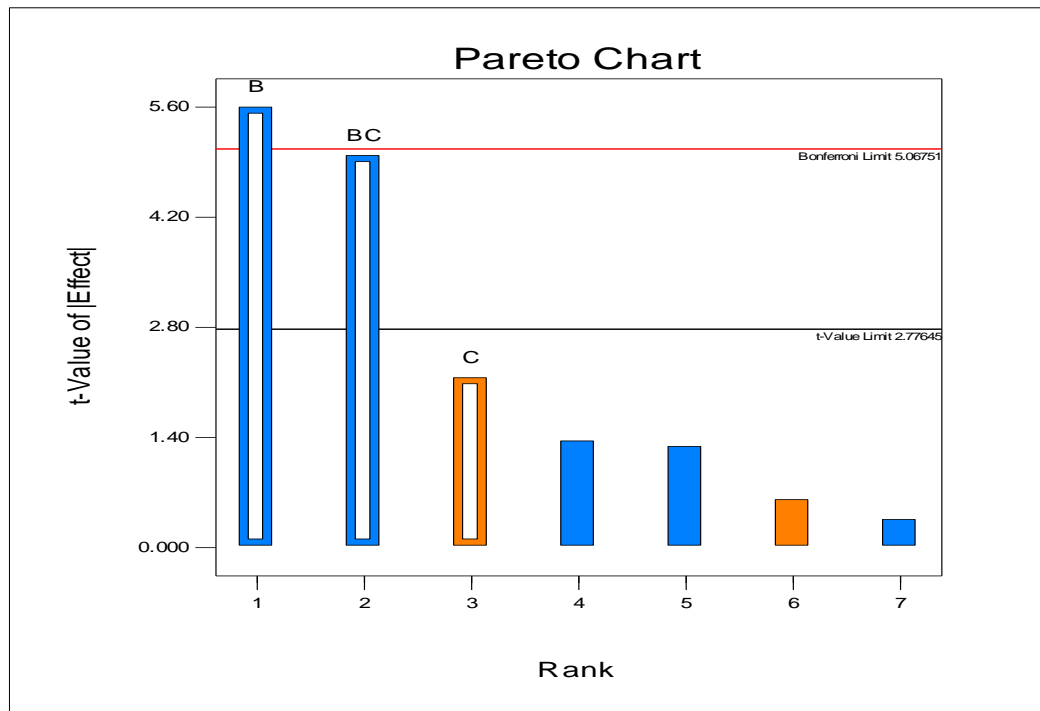


Figure 4.17 : Diagramme de Pareto pour la réponse AA.

La figure 4.17, montre que l'hydromodule (B) a un effet significatif ($p < 0.05$) sur la réponse AA, selon les tests de Student (ligne noire) et de Bonferroni (ligne rouge). L'interaction BC présente à son tour un effet significatif ($p < 0.05$) sur la réponse AA, selon le test de Student.

✓ Tracé des valeurs de AA actuelles en fonction des valeurs prédites

Le tracé des valeurs de la réponse AA actuelles en fonction des valeurs prédites, c'est-à-dire calculées par l'équation du modèle factoriel, permet d'évaluer graphiquement l'ajustement de ce modèle. La figure 4.18, représente ce tracé :

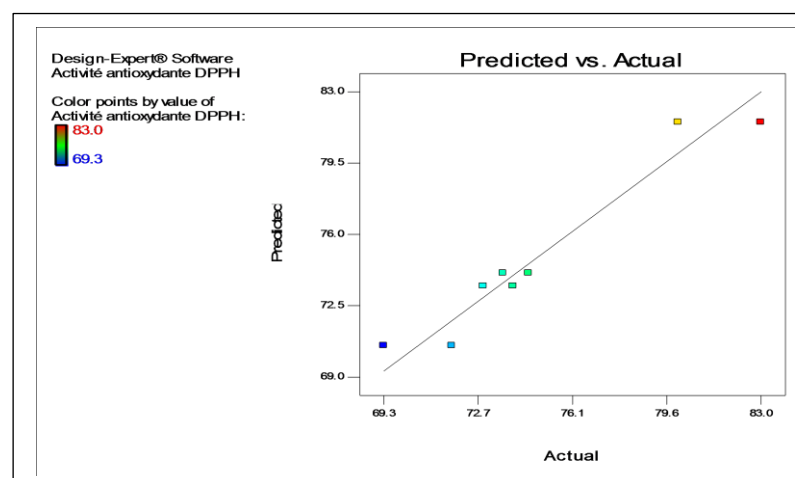


Figure 4.18 : Tracé des réponses AA prédites en fonction des réponses actuelles.

Une linéarité acceptable est observée entre les réponses AA actuelles et les réponses prédites, cela témoigne le bon ajustement du modèle factoriel. Ce modèle peut donc être utilisé pour l'optimisation de la réponse AA.

✓ Courbes des effets individuels, d'isoréponses et de surface de réponses de AA

Les courbes des figures 4.19, représente graphiquement l'effet individuel du facteur B (hydromodule) sur la réponse AA, avec le coefficient de corrélation correspondant.

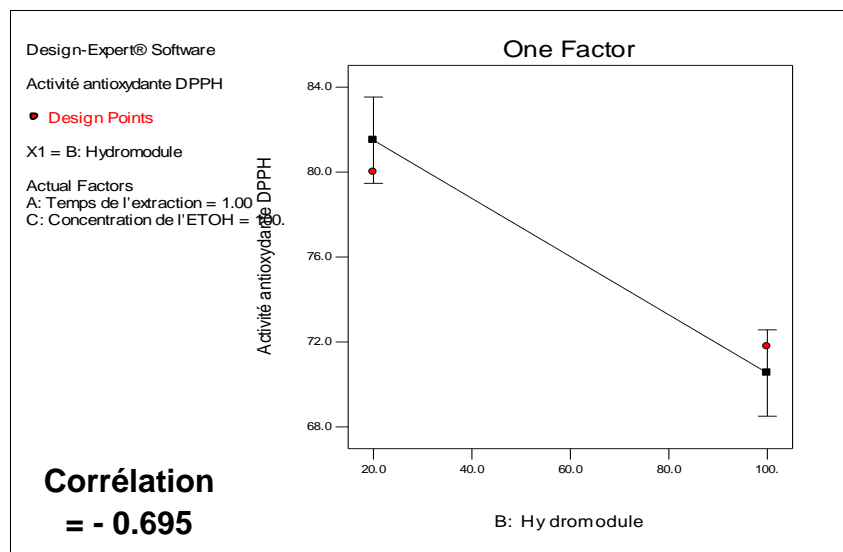


Figure 4.19 : Effet de l'hydromodule (B) sur AA.

D'après la figure 4.19, l'hydromodule provoque également un effet négatif sur l'activité antioxydante de l'extrait, cela signifie que les forts volumes de solvants sont préjudiciables pour les antioxydants de l'extrait.

Sur la figure 4.20, nous observons que le temps d'extraction n'influence pas beaucoup sur l'activité antioxydante de l'extrait (corrélation = 0.076). Il doit donc être maintenu à son niveau bas, d'un côté pour économiser le facteur temps, et d'un autre côté pour éviter les dégradations éventuelles des polyphénols durant des temps excessifs d'extraction [84].

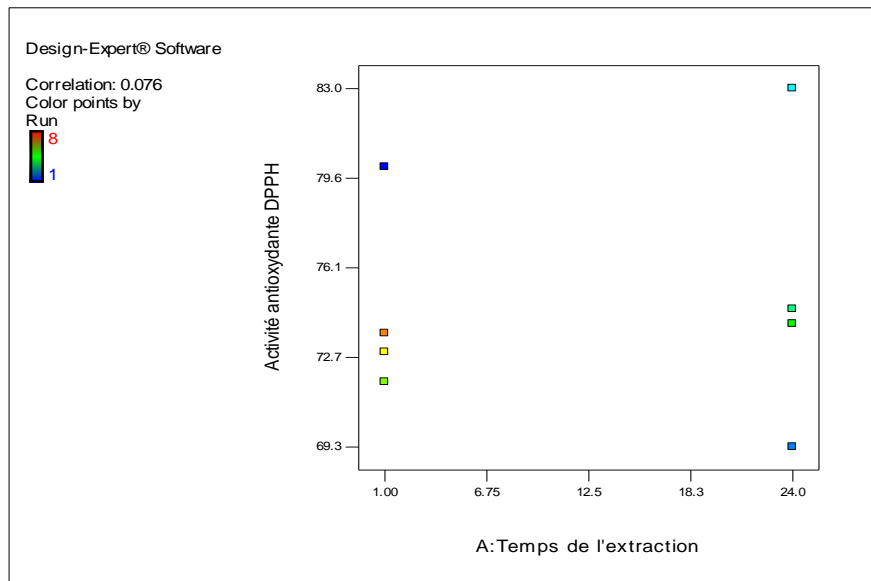


Figure 4.20 : Effet du temps d'extraction sur la réponse AA.

La figure 4.21, illustre les effets de la concentration de l'éthanol sur l'activité antioxydante de l'extrait, en fonction de l'hydromodule

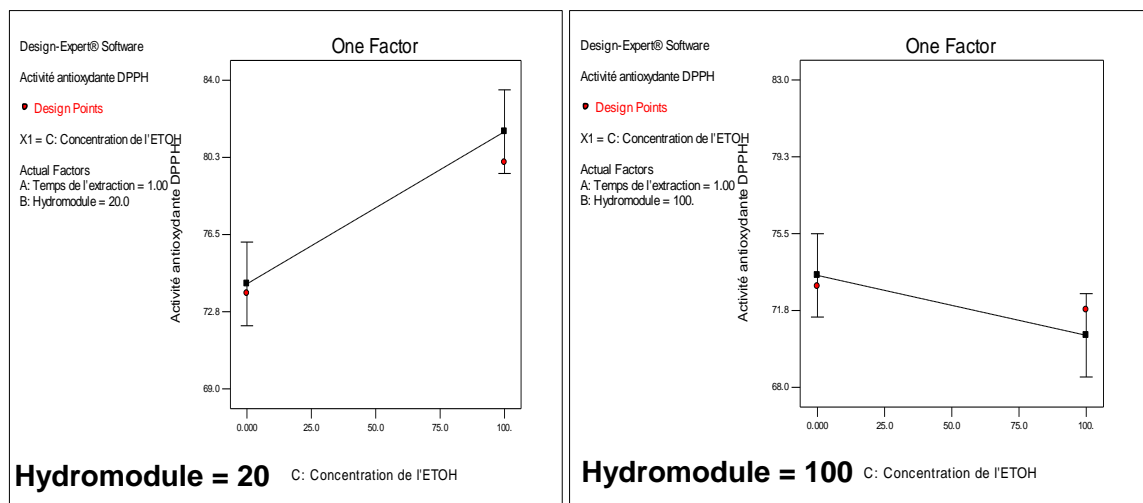


Figure 4.21 : Variation de l'effet de l'éthanol sur AA en fonction de l'hydromodule.

D'après la figure 4.21, nous remarquons que l'effet de la concentration de l'éthanol dans le solvant sur l'activité antioxydante de l'extrait, varie en fonction de l'hydromodule appliqué pour l'extraction. En effet, pour un hydromodule faible (égal à 20), plus la concentration de l'éthanol du solvant augmente, plus l'activité antioxydante de l'extrait augmente ; et par contre si l'hydromodule est élevé (égal à 100), l'activité antioxydante de l'extrait diminue par l'augmentation de la concentration de l'éthanol du solvant.

Les courbes des figures 4.22 et 4.23, illustrent les variations de AA en fonction de différents facteurs, sous forme 3D (surface de réponses) et 2D (courbe d'isoréponses). Dans ces représentations on peut extérioriser la valeur de AA prédite avec ces combinaisons de facteurs, à n'importe quel point de la courbe isoréponses, en utilisant l'option (Add flag).

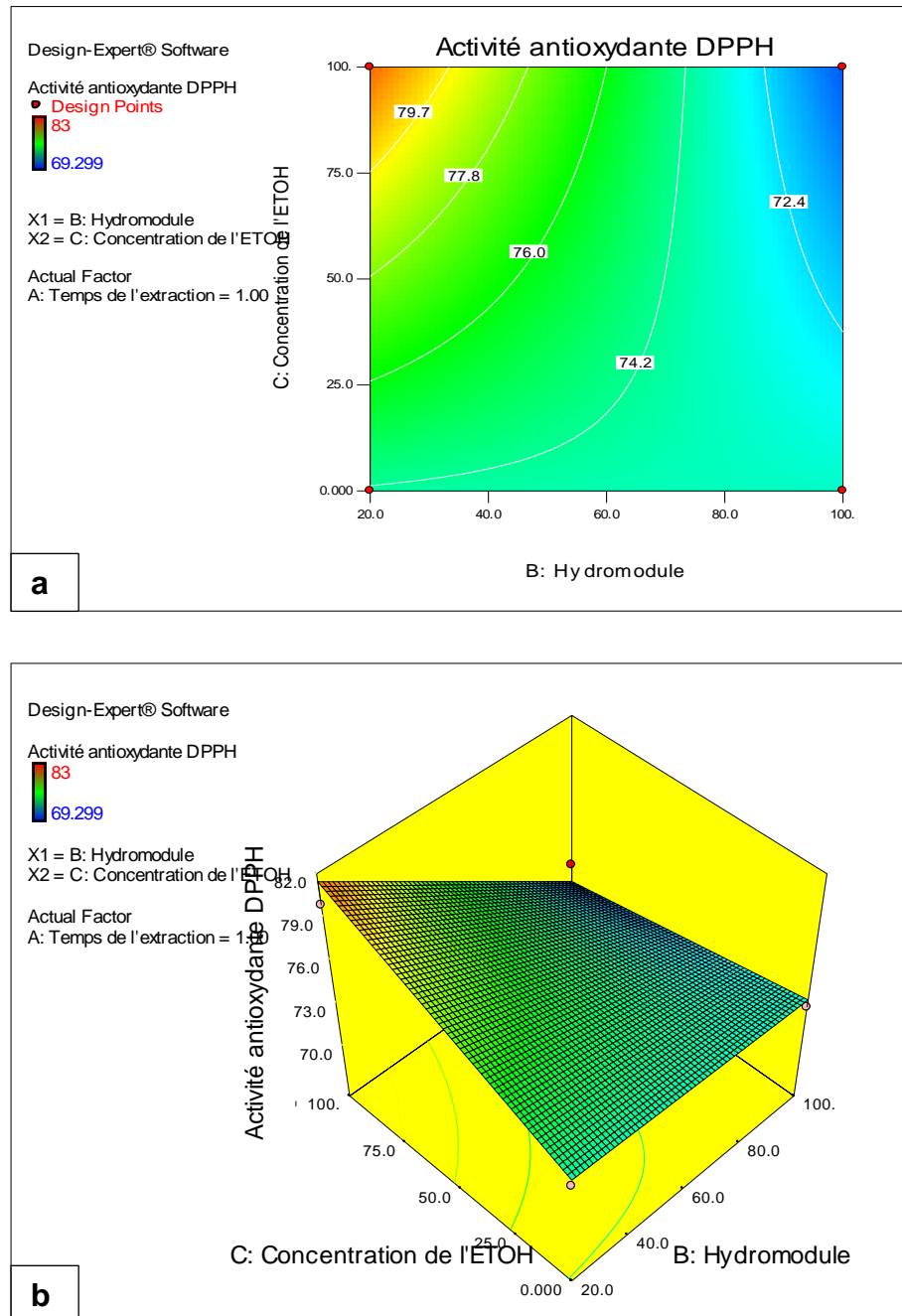


Figure 4.22 : Courbes d'isoréponses (a) et de surface de réponses (b) de AA en fonction de l'hydromodule et de la concentration en éthanol.

Sur la figure 4.23, le changement d'effet de l'éthanol sur l'activité antioxydante selon qu'il s'agit d'une extraction avec des volumes élevés ou avec des volumes faibles de l'éthanol, est clairement visualisé. L'influence de l'éthanol sur l'efficacité antioxydante de l'extrait dépende du volume de l'éthanol appliqué pour l'extraction. Par ailleurs, l'effet du temps d'extraction sur l'activité antioxydante, n'est que négligeable à n'importe quel procédé d'extraction (c'est à dire à n'importe qu'elle combinaison donnée de facteurs) (figure 4.23).

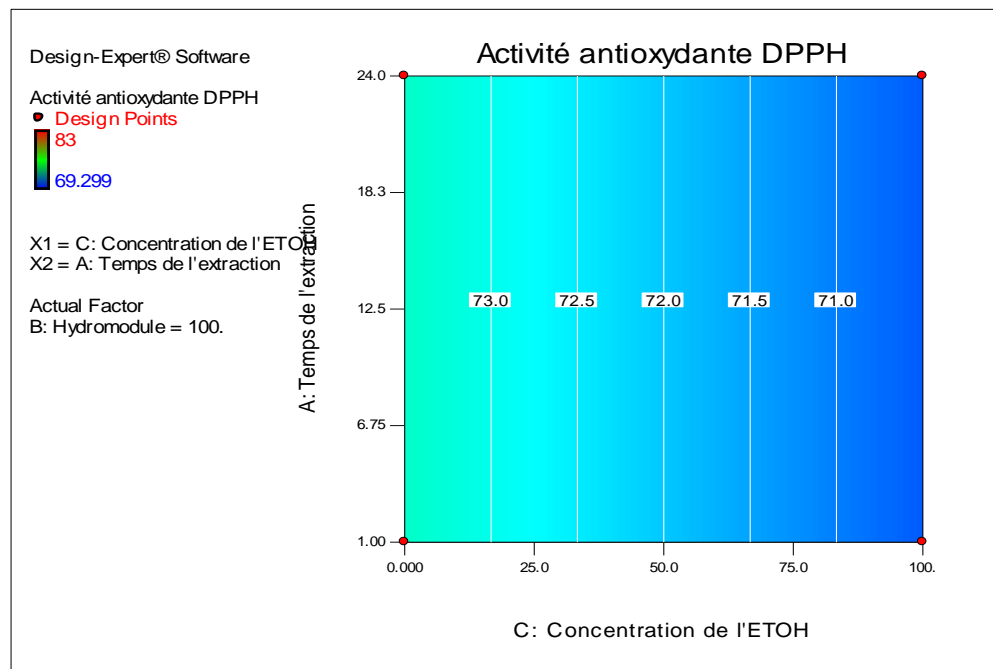
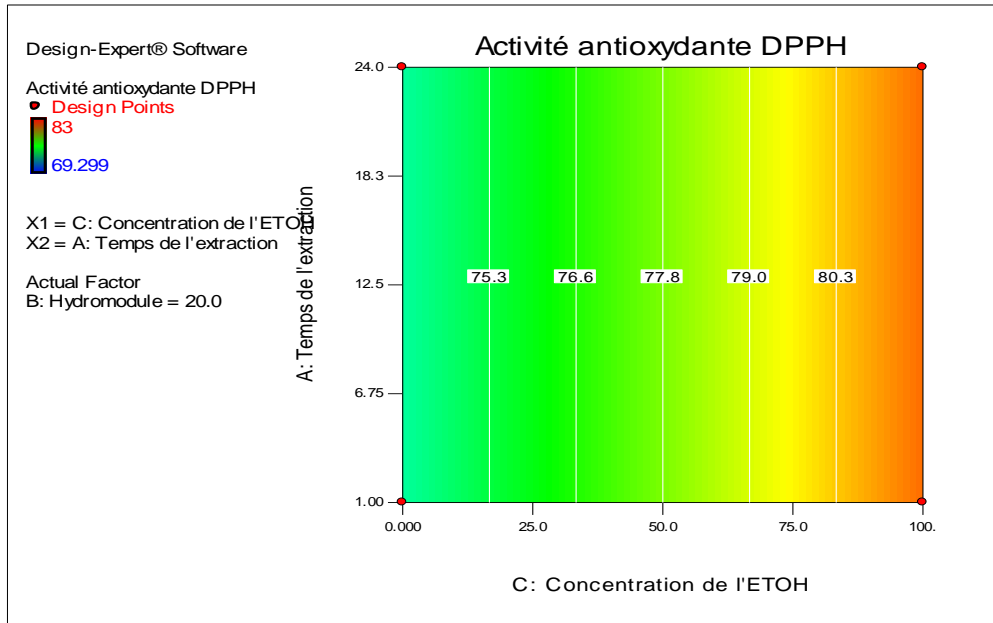


Figure 4.23 : Comparaison des effets de l'éthanol sur AA en fonction de l'hydromodule et du temps d'extraction.

Comme conclusion à l'ensemble des observations précédentes, il est préférable pour une extraction éthanolique, de travailler avec *de faibles volumes de solvant* pour permettre à ce dernier (l'éthanol) d'améliorer l'activité antioxydante de l'extrait, et de *diminuer également le temps d'extraction* puisque ce dernier n'aura pas d'influence. Ceci offre un *intérêt économique* à l'extraction par solvant des antioxydants des pelures des grenades.

✓ Corrélation entre PPT et AA

La figure 4.24, donne la courbe qui relie les deux réponses PPT et AA entre elles, ainsi que le coefficient de corrélation entre les deux réponses. Ce coefficient de corrélation ($r = 0.683$) témoigne l'existence d'une corrélation positive élevée entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydante des extraits. Toutefois, cette corrélation est statistiquement non significative ($p > 0.05$). Nous pensons que cela est dû au fait que le meilleur solvant d'extraction des PPT des pelures de la grenade (qui est l'eau dans notre cas), n'est pas un milieu favorable pour une solubilisation parfaite du radical DPPH ni pour un bon transfert d'atome d'hydrogène du composé antioxydant vers le radical DPPH. Cette réaction étant possible seulement dans un milieu alcoolique (éthanol et méthanol généralement) permettant une bonne solubilisation des molécules de DPPH [78].

En outre, il est possible que l'activité antioxydante des extraits des pelures, ne soit pas corrélée fortement avec les polyphénols totaux des extraits, autant qu'avec un groupe ou une famille de composés phénoliques bien définie (exemples les tannins hydrolysables et les flavonoïdes).

Ainsi si on revient à la matrice des corrélations des caractéristiques de la pelure (figure 4.18, p 107), nous remettons en avant que l'activité anti-radicalaire des extraits des pelures est plus fortement corrélée avec les tannins hydrolysables ($r = 0.933$), qu'avec les polyphénols totaux ($r = 0.048$).

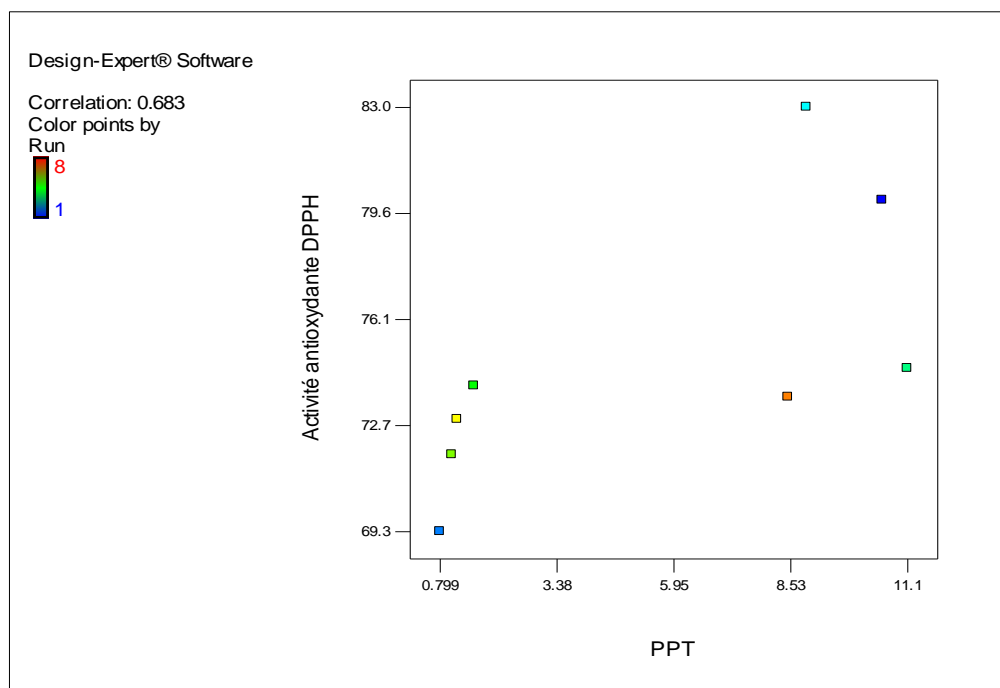


Figure 4.24 : Corrélation entre PPT et AA.

✓ Optimisation simultanée des deux réponses

À la recherche des conditions économiques optimales pour récupérer le maximum de polyphénols correspondant à la meilleure activité antioxydante, nous avons opté à une optimisation numérique du procédé d'extraction, en maximisant les deux réponses tout en minimisant l'utilisation de l'éthanol, du volume total du solvant ainsi que du temps d'extraction. Les résultats de cette optimisation sont donnés dans le tableau 4.24 :

Tableau 4.24 : Solutions optimales choisies.

Solution	Temps d'extraction (h)	Hydromodule	Concentration de l'éthanol (%)	Polyphénols totaux de l'extrait (%)	Activité antioxydante de l'extrait (%)
1	1	20	42.5	9.55	77.2
2	1	20	42.9	9.55	77.3
3	1	20	50	9.62	77.8
4	1	20	25.7	9.39	76
5	1	20	84	9.96	80.3
6	1	20	79.4	9.91	80

Des auteurs ont préconisé dans des travaux antérieurs sur l'extraction des polyphénols et d'antioxydants, des protocoles semblables aux solutions 5 et 6 : Mukherjee *et al.* (2012), ont proposé de procéder à l'extraction des polyphénols et antioxydants du gingembre avec 75 % d'éthanol et 25 % d'eau, Tabaraki *et al.* (2012), ont proposé (70 - 30 %) pour l'extraction des polyphénols de la pelure de grenade.

L'avantage de réaliser l'extraction des polyphénols avec solvants constitués de mélanges entre éthanol et eau, est d'augmenter le rendement d'extraction par la récupération de composés phénoliques très polaires, plus solubles donc dans l'eau que dans l'éthanol [48].

Le tableau 4.25, fait une comparaison entre les valeurs expérimentales et prédites des deux réponses.

Tableau 4.25 : Comparaison entre valeurs prédites et valeurs expérimentales.

Polyphénols totaux (%)		Activité antioxydante (%)	
Valeurs prédites	Valeurs expérimentales	Valeurs prédites	Valeurs expérimentales
9.14	8.48	73.5	72.9
10.6	10.1	81.5	80
1.51	1.07	71.8	70.5
9.15	8.89	70.5	69.3

4.4.2. Comparaison entre la macération, la décoction et l'infusion

Le but de cette comparaison est de fournir au consommateur des informations simples et utiles à son échelle culinaire, concernant les principales méthodes d'extraction des polyphénols de la grenade, réalisées à cette échelle. Il s'agit de la macération aqueuse, la décoction, l'infusion et en plus de ça la macération par mélange de trois solvants (eau, éthanol et méthanol aux proportions égales).

Le tableau 4.26, donne une comparaison entre ces méthodes en termes des teneurs en polyphénols totaux extraits et des activités antioxydantes des extraits.

Tableau 4.26 : Comparaison entre la macération, la décoction et l'infusion aqueuses des pelures de la grenade.

	Macération	Décoction	Infusion	Macération à trois solvants
Quantité de principes actifs extraits : Polyphénols totaux (%)	1.33	1.6	1	1.53
Pourcentage de l'effet bénéfique : Activité antioxydante (%)	72.76 b	74.47	77.32	82.52 a

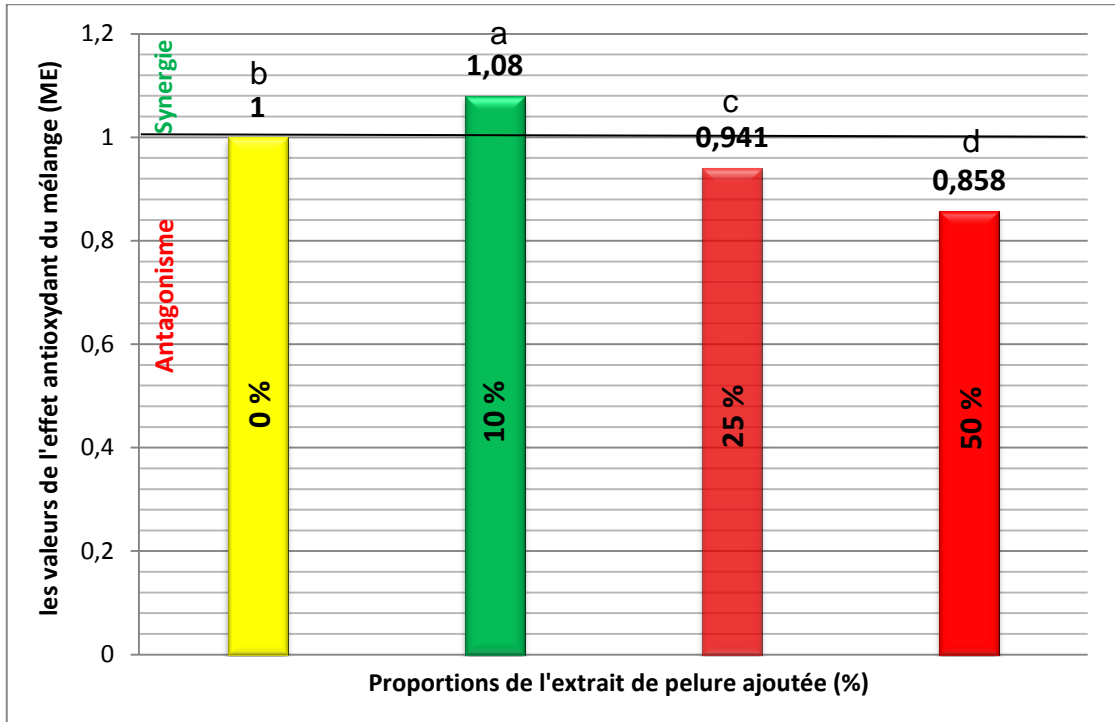
Comme moyen d'extraction aqueuse, la décoction s'est révélée plus efficace que l'infusion et la macération (teneur en polyphénols totaux égale à : 1.6 %, 1 % et 1.33 %, respectivement), mais l'activité antioxydante du décocté est moins prononcée que l'infusé (74.47 % contre 77.32 %), sauf que la différence ici est non significative ($p > 0.05$). Il sera donc plus préférable à l'échelle culinaire, d'appliquer l'infusion que la décoction.

La macération par trois solvants n'a pas permis de récupérer significativement plus de polyphénols que la macération aqueuse, mais par contre l'activité antioxydante de l'extrait par trois solvants est significativement plus forte que celle du macéré aqueux ($p < 0.01$). La cause probable de cette différence est que le mélange de trois solvants de polarités différentes, permet d'extraire des composés antioxydants ayant des polarités différentes répartis entre les trois solvants, obéissant au principe de (*like dissolve like*), c'est-à-dire que chaque solvant d'une polarité donnée, extrait les composés phénoliques ayant la même polarité. L'extrait qui résulte peut être qualitativement plus riche en antioxydants. C'est ainsi que la notion d'effet synergique rentre.

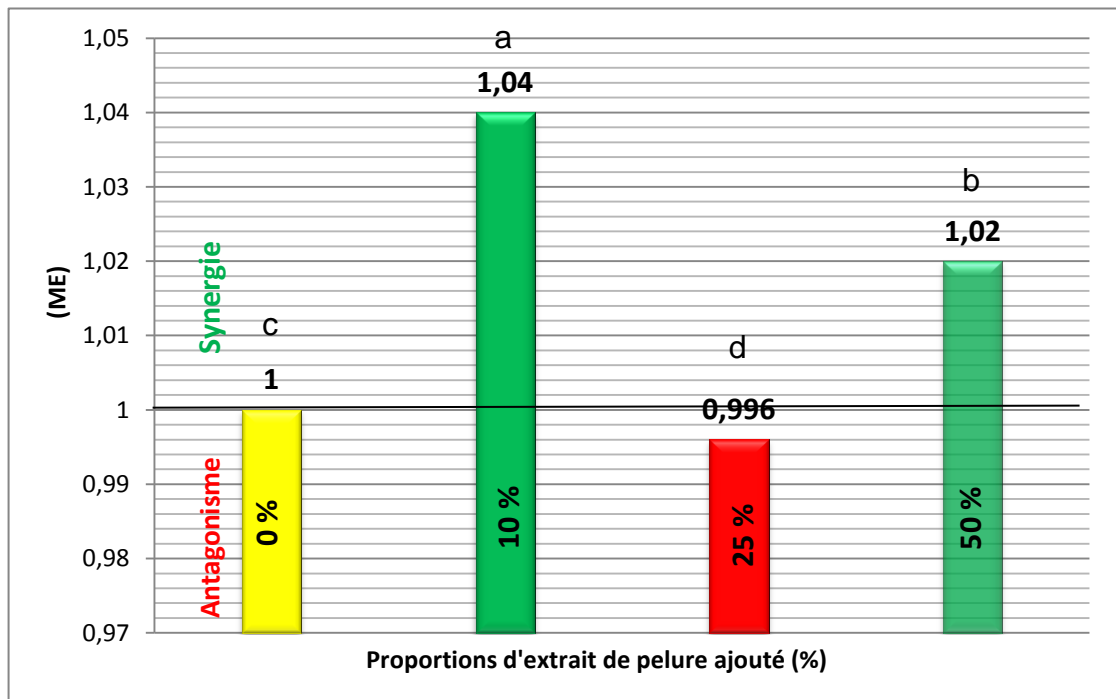
4.5. Etude de l'effet antioxydant synergique par plan de mélange

Avant de procéder à l'application du plan de mélange, l'effet antioxydant de 13 différents mélanges (EM ou ME) réalisés en laboratoire a été calculé selon la

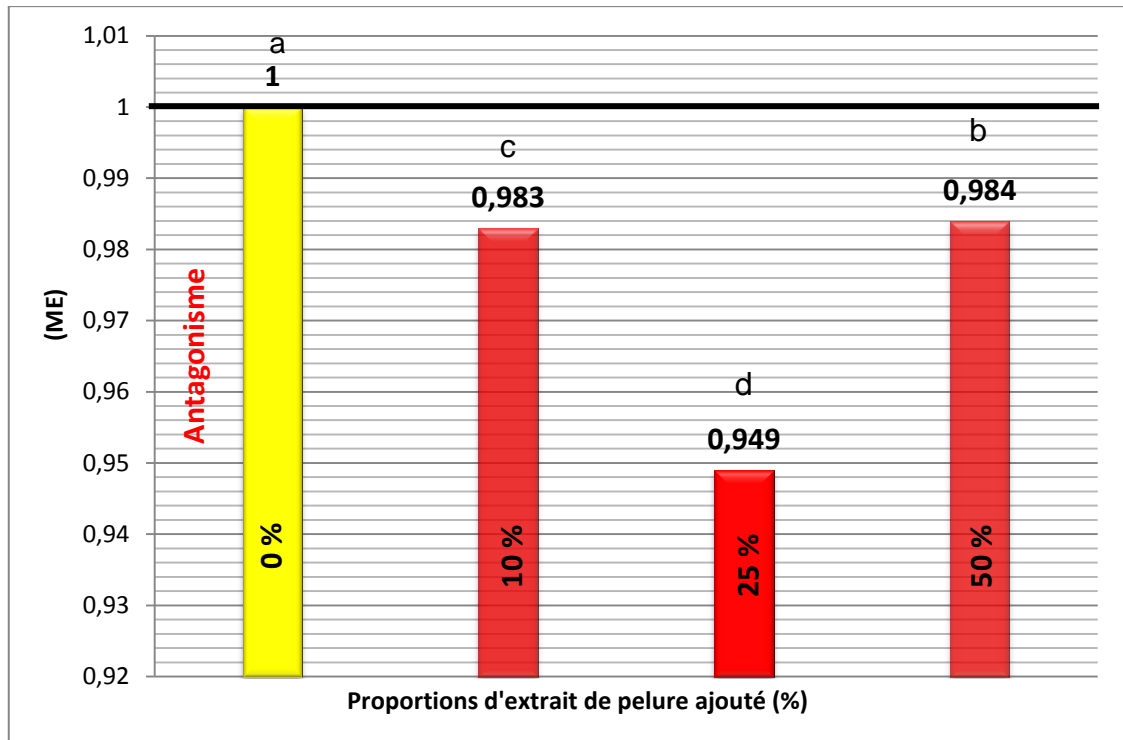
formule Peyrat-Maillard *et al.* Les résultats de (ME) de chaque mélange, jus plus extrait de pelure, sont figurés dans les figures 4.25, 4.26 et 4.27.



(abcd) : toutes les différences sont hautement significatives ($p < 0.01$).
 Figure 4.25 : Effet synergique du cultivar BM.



(abcd) : toutes les différences sont significatives ($p < 0.05$).
 Figure 4.26 : Effets synergiques du cultivar DM.



(abcd) : toutes les différences sont significatives ($p < 0.05$).

Figure 4.27 : Effets antagonistes du cultivar DK.

Rappelons que pour un mélange donné, l'effet synergique est vérifié si la valeur de l'effet antioxydant du mélange (ME) est supérieure à la valeur du seuil 1. Dans le cas où la valeur de (ME) est inférieure à 1, un effet antagoniste est produit. Les valeurs de (ME) ont été soumises à des comparaisons statistiques, pour que l'interprétation des effets antioxydants des mélanges, soit solide.

Par l'observation des figures 4.25, 4.26 et 4.27, il en ressort que :

1. Le (ME) d'un mélange donné entre le jus et l'extrait de pelure, varie sensiblement en fonction des proportions de l'extrait de pelure appliqués, donnant naissance des fois à un effet synergique et des fois à un effet antagoniste.
- ✓ Le (ME) par ailleurs, varie en fonction des proportions de l'extrait de pelure, suivant une allure fluctuée et non-proportionnelle. En effet, pour le cultivar BM par exemple, le (ME) atteint son niveau maximal avec 10 % d'extrait de pelure, alors qu'il diminue ensuite au fur et à mesure que la proportion de l'extrait de pelure augmente (figure 4.25). La même tendance est observée pour les deux autres cultivars. Il convient de rappeler que la meilleure efficacité antioxydante n'est pas certainement liée à la présence de fortes

doses de composés antioxydants dans le milieu, mais une chose est certainement établie, c'est qu'un antioxydant est efficace à une dose dite « nutritionnelle » ; et ceci est assuré par la consommation régulière de fruits et légumes [46,1].

Six et Gentil. (2008), rapportent que les résultats d'intervention avec des suppléments riches en antioxydants, sont des fois décevantes, dont les antioxydants appliqués provoquent des effets opposés.

Carocho et Ferreira. (2013), rapportent que c'est récemment montré que les antioxydants, et dans certaines situations peuvent devenir prooxydants, c'est-à-dire des agents qui engendrent le stress oxydatif. Les composés phénoliques en fait, peuvent jouer le rôle de prooxydants dans un système contenant des métaux de transition (fer et cuivre) en présence de l'oxygène de l'air.

- ✓ L'expression du (ME) donc de l'effet synergique dans un mélange, diffère d'un cultivar à l'autre. L'effet synergique est produit deux fois dans le cas du cultivar DM (figure 4.26), et produit une seul fois dans le cas du cultivar BM (figure 4.25), par contre aucun effet synergique n'est produit dans le cas du cultivar DK (figure 4.27).

Sur la base de ces derniers résultats, il nous a parait avantageux d'utiliser la méthodologie de plan de mélange, pour déterminer en un minimum d'expériences tous les formules de jus enrichis en antioxydants, c'est-à-dire les jus montrant un effet synergique.

Les résultats de (ME) des différents mélanges entre les extraits des pelures, sont récapitulés dans le tableau 4.26.

Tableau 4.27 : Valeurs de (ME) des mélanges des extraits des pelures.

Composition du mélange	Valeur de (ME)	Type d'interaction
50 % extrait de BM + 50 % extrait de DM	0.992	Antagoniste
50 % extrait de BM + 50 % extrait de DK	1.00	Additive
50 % extrait de DM + 50 % extrait de DK	0.979	Antagoniste
1/3 (extrait de BM + extrait de DM + extrait de DK)	0.999	Antagoniste

D'après le tableau ci-avant, aucune association d'extraits n'a montré un effet synergique. Cependant, l'association à moitié entre l'extrait de pelure de BM avec celui de DK, a montré l'absence d'interaction spécifique ; d'après Kurin *et al.* (2012), l'interaction existante dans ce cas est additive, c'est-à-dire que les composés antioxydants de chaque extrait agissent sans affecter l'efficacité antioxydants des composés du deuxième extrait.

Tester plusieurs mélanges d'extraits dans le but de chercher l'effet synergique, est une tâche extrêmement difficile, nous avons par l'application du plan de mélange, la chance d'accéder au maximum d'informations et résultats liées au phénomène d'effet synergique, en un minimum d'expériences.

Nous avons analysé par les figures 4.25, 4.26 et 4.27 et le tableau 4.27, l'effet synergique de 13 mélanges différents. Les résultats de ces 13 essais ont été ensuite introduits dans la matrice d'expériences du plan de mélange historical data, les compositions des 13 mélanges avec les ME correspondants sont données dans le tableau 4.28.

La quasi-totalité des mélanges analysés précédemment montrent des effets antagonistes à additifs, l'objectif donc de ce plan d'expérience est de chercher les mélanges ayant des effets synergiques ainsi que d'analyser les facteurs qui déterminent cet effet, par raccourcissement des démarches expérimentales.

Tableau 4.28 : Matrice d'expériences du plan de mélange historical data.

Essai	A : Extrait de pelure de BM (%)	B : Extrait de pelure de DM (%)	C : Extrait de pelure de DK (%)	D : Jus de BM (%)	E : Jus de DM (%)	F : Jus de DK (%)	Y ₁ : (ME) nd	Type de l'interaction
1	50	50	0	0	0	0	0.992	Antagonisme
2	50	0	50	0	0	0	1.00	Additive
3	0	50	50	0	0	0	0.979	Antagonisme
4	33.33	33.33	33.33	0	0	0	0.999	Antagonisme
5	50	0	0	50	0	0	0.858	Antagonisme
6	0	50	0	0	50	0	1.02	Synergie
7	0	0	50	0	0	50	0.985	Antagonisme
8	25	0	0	75	0	0	0.941	Antagonisme
9	0	25	0	0	75	0	0.996	Antagonisme
10	0	0	25	0	0	75	0.949	Antagonisme
11	10	0	0	90	0	0	1.08	Synergie
12	0	10	0	0	90	0	1.04	Synergie
13	0	0	10	0	0	90	0.983	Antagonisme

nd : non dimensionné.

✓ Analyses statistique du plan historical data

Comme pour le plan factoriel, le plan de mélange est soumis aux analyses statistiques. Le tableau 4.29, rassemble les résultats de l'ANOVA pour la réponse étudiée (ME).

Tableau 4.29 : Table de l'ANOVA de la réponse ME.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur du rapport F	Valeur de probabilité p > F	Signification
Modèle quadratique	0.0322	6	0.00573	14.5	0.00245	Significatif
Portion linéaire du modèle	0.00924	5	0.00185	4.98	0.0381	Significative
AD : le mélange entre A et D	0.0230	1	0.0230	61.8	0.000224	Significatif

La valeur du rapport F de Fisher est de 14.5, cela implique que le modèle choisi de type quadratique est significatif ($p = 0.00245$), il est donc sensé d'être le modèle qui décrit bien la réponse ME. La portion linéaire de ce modèle est également significative ($p = 0.0381$).

Une valeur de probabilité $p > F$ inférieur à 0.05 indique le terme en question est significatif, dans ce cas le terme du mélange AD est significatif ($p = 0.000224$), il doit alors se figurer dans l'équation du modèle quadratique postulé ; les termes non significatifs à leurs tours doivent être réduits automatiquement par l'option (Backward), s'ils sont nuisibles à l'ajustement du modèle.

✓ Ajustement du modèle postulé

Le tableau 4.30, donne les coefficients R^2 , R^2 ajusté et R^2 prédit du modèle quadratique après réduction des termes non adéquats.

Tableau 4.30 : Critères d'ajustement du modèle quadratique.

Type du modèle	R^2	R^2 ajusté	R^2 prédit
Modèle quadratique réduit	0.935	0.871	0.715

Le coefficient de corrélation linéaire multiple R^2 du modèle quadratique réduit est assez convaincant, il est égal à 0.935. Le R^2 ajusté est en agrément avec le R^2 prédit, le modèle quadratique réduit est donc bien ajusté et présente les qualités prédictives requises.

✓ Equation du modèle postulé en termes de composantes actuelles

$$ME = 0.0102 \times (A) + 0.00978 \times (B) + 0.00988 \times (C) + 0.0118 \times (D) + 0.0104 \times (E) + 0.00966 \times (F) - 0.000100 \times (AD) \quad (4.5)$$

✓ Equation du modèle en termes de composantes réelles

Sachant que les valeurs des composantes réelles sont calculées par la relation suivante :

$$\text{Valeur de la composante réelle de } x = \frac{\text{Valeur de la composante actuelle}}{100}$$

Avec : x est le symbole d'une composante donnée du mélange (A,B,C,D,E ou F).

L'équation du modèle postulé en termes de composantes réelles s'écrit donc :

$$\text{ME} = 1.02 \times (\text{A}) + 0.978 \times (\text{B}) + 0.988 \times (\text{C}) + 1.18 \times (\text{D}) + 1.04 \times (\text{E}) + 0.966 \times (\text{F}) - 1.00 \times (\text{AD}) \quad (4.6)$$

Avec :

ME: effet antioxydant du mélange, A, B, C, D, E et F (voir matrice d'expériences).

✓ Tracé des réponses actuelles en fonction des réponses prédites

La figure 4.28, représente le tracé des valeurs de ME actuelles en fonction des valeurs prédites par le modèle postulé. Une bonne linéarité s'observe entre ces deux séries de valeurs, montrant cette fois-ci d'une façon graphique la validité du modèle quadratique réduit.

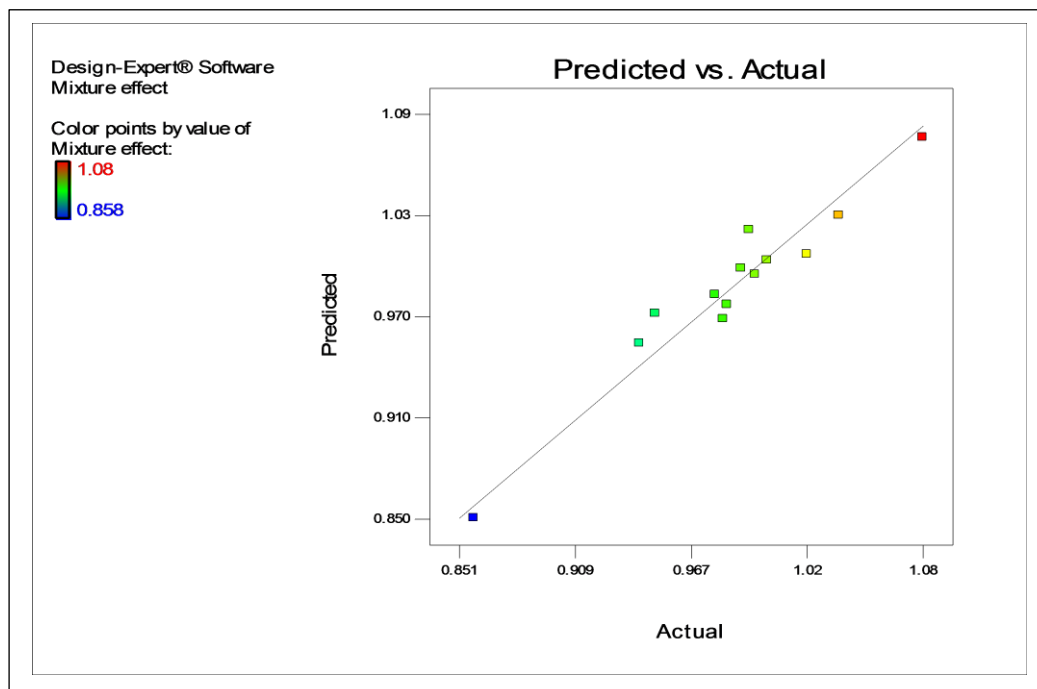


Figure 4.28 : Tracé des réponses ME prédites en fonction de celles actuelles.

✓ Effet de chaque constituant des mélange sur la réponse ME.

Le tableau 4.31, récapitule les effets de chaque constituants des mélanges sur la réponse ME étudiée, chaque effets est exprimé en termes d'un coefficient de corrélation.

Tableau 4.31 : Coefficients des corrélations entre les six constituants et la réponse ME.

Nature de constituant	Coefficient de corrélation	Interprétation de l'effet du constituant sue le ME
A : Extrait de pelure de BM	-0.370	- - -
B : Extrait de pelure de DM	0.203	+ +
C : Extrait de pelure de DK	-0.020	-
D : Jus de BM	-0.064	-
E : Jus de DM	0.352	+ + +
F : Jus de DK	-0.161	- -

Legende : (+ + +) = effet renforçant considérable, (+ +) = effet renforçant moins important, (- - -) = effet déletère considérable, (- -) et (-) = effets déletères moins importants.

D'après ces coefficients des corrélations, nous observons que :

- ✓ Les polyphénols de cultivar Doux de Messaad que ça soit dans le jus ou dans l'extrait de la pelure, ont un effet renforçant sur ME, donc ils favorisent semblablement l'effet synergique dans un mélange ;
- ✓ Les polyphénols de l'extrait de la pelure du cultivar Bordj-mira, ont un effet déletère sur ME, c'est-à-dire qu'ils ne favorisent pas semblablement l'effet synergique ;
- ✓ Les polyphénols de jus de cultivar Doux de Koléa, ont un effet déletère sur ME, c'est-à-dire qu'ils ne favorisent pas semblablement l'effet synergique.

À la lumiere de ces dernières observations, il parait que l'influence des polyphénols contenus dans les jus et les pelures sur l'effet synergique, varie d'un cultivar à l'autre, et ça c'est lié essentiellement à la nature des composés phénoliques contenus dans chaque cultivar, et n'on plus à leurs concentration dans le fruit, puisque les différences entre les teneurs en polyphénols des pelures ne sont pas statistiquement significatives (voir § 4.2.6.1), et la même chose entre les teneurs en polyphénols des jus, excépté la différence significative entre le jus de BM et de DK.

Dans notre cas et comme une première vision, il semble que le cultivar Doux de Messaad renferme des composés phénolique qualitativement précieux.

Ainsi, il est important de signaler que les composés phénoliques n'ont pas la même efficacité antioxydante, cette dernière dépend non seulement de la concentration des composés phénoliques dans le milieu, mais aussi de leurs caractéristiques structurales [3].

Plusieurs travaux ont été conduits sur le lien entre structure et activité antioxydante des composés phénoliques [111,112,3,113]. D'après l'ensemble des travaux réalisés, le lien entre la structure et l'activité antioxydante de certaines familles de composés phénoliques a été établie.

Ainsi, chez les acides phénoliques le pouvoir antioxydant dépend du nombre de groupements hydroxyls dans la molécule. En outre, les acides phénoliques du groupe hydroxycinnamique, sont plus efficace que leurs homologues du groupe hydroxybenzoïque, grace probablement à la présence du groupement $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ attaché au noyau phénolique (figure 4.29) [114].

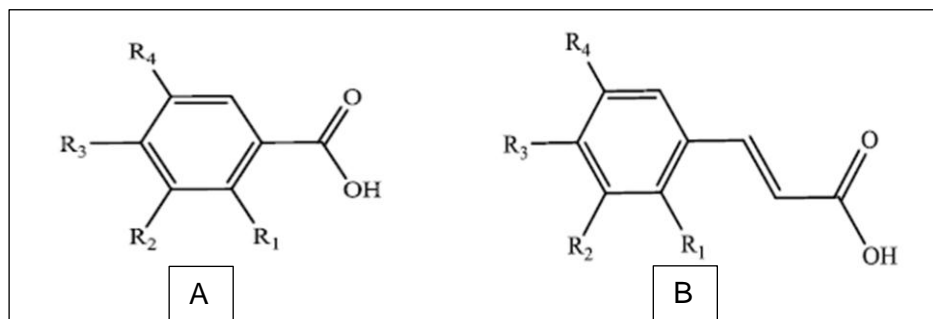


Figure 4.29 : Structures générales des acides hydroxybenzoïques (A) et des acides hydroxycinnamiques (B) [45].

Chez les flavonoïdes (figure 4.30), les facteurs majeurs qui déterminent la bonne activité anti-radicalaire, sont [114] (figure 4.31) :

- ✓ La présence de la structure *ortho*-dihydroxyl dans le cycle B des flavonoïes. Cette structure confère à la molécule un pouvoir donateur élevé d'électrons et participe bien à la stabilité radicalaire du noyau phénolique ;

- ✓ La présence dans le cycle C, d'une double liaison entre le C2 et le C3 avec une fonction 4-oxo. Cette structure est responsable de la délocalisation électronique du cycle B ;
- ✓ La présence dans les cycles A et C, des groupement hydroxyls en C3 et C5 avec une fonction 4-oxo, qui sont essentiels pour un potentiel anti-radicalaire maximum ;
- ✓ La présence d'un groupement hydroxyl en C3 est importante pour l'activité antioxydante, la glycosylation de C3 réduit cette activité comparativement à la forme aglycone.

La quercétine est un flavonoïde qui possède toutes ces caractéristiques structurales (figure 4.32), c'est pour ça elle est citée parmi les composés phénoliques les plus antioxydants [3].

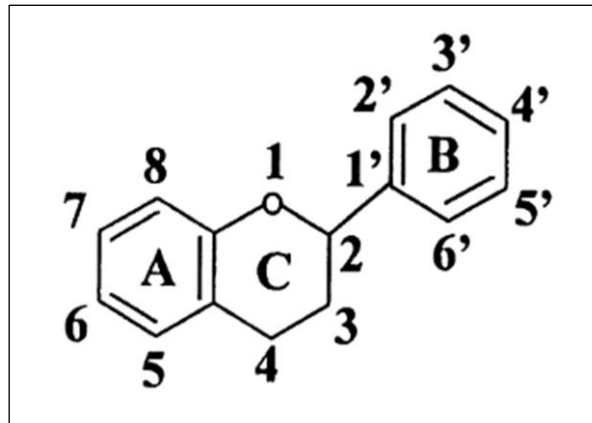


Figure 4.30 : Structure générale des flavonoïdes [112].

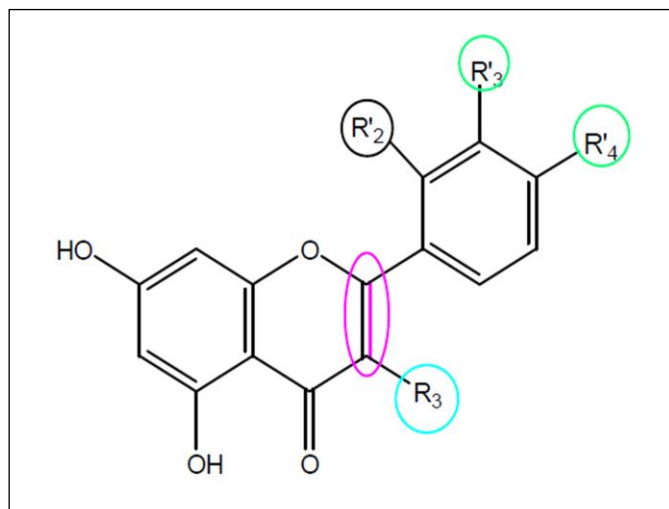


Figure 4.31 : Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes [104]

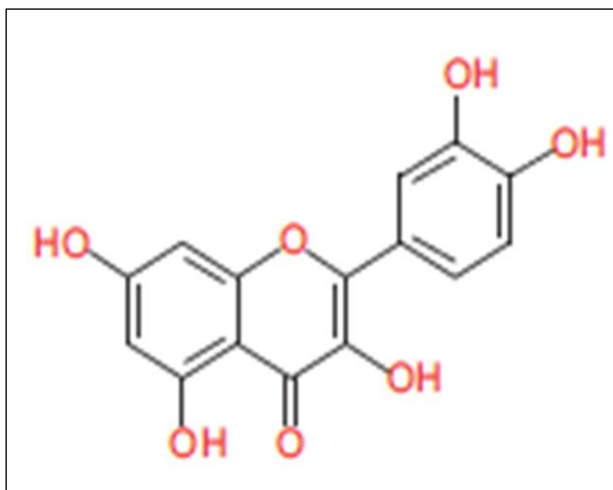


Figure 4.32 : Structure de la quercétine [79].

Enfin et d'après Grigoras. (2012), plus le composé phénolique est porteur de groupements hydroxyls, plus important est son pouvoir anti-radicalaire. Cela peut expliquer le pouvoir anti-radicalaire des polyphénols oligo- et polymériques tels que les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

L'utilisation des techniques d'analyses chimiques de pointe telles que l'HPLC-UV(DAD) (HPLC avec un détecteur UV à barrette de diode) et la LC-MS (HPLC avec un détecteur de spectroscopie de masse), pour l'identification des profils polyphénoliques pour chaque variété ou cultivar, est nécessaire pour expliquer la particularité des polyphénols de cultivar Doux de Messaad.

✓ Courbes des mélanges binaires

Les figures 4.33 et 4.34 représentent, pour les deux cultivars ayant des effets synergiques (BM et DM), les courbes de variation de ME en fonction des proportions des deux constituants, jus et extrait de pelure, non soumis à des contraintes.

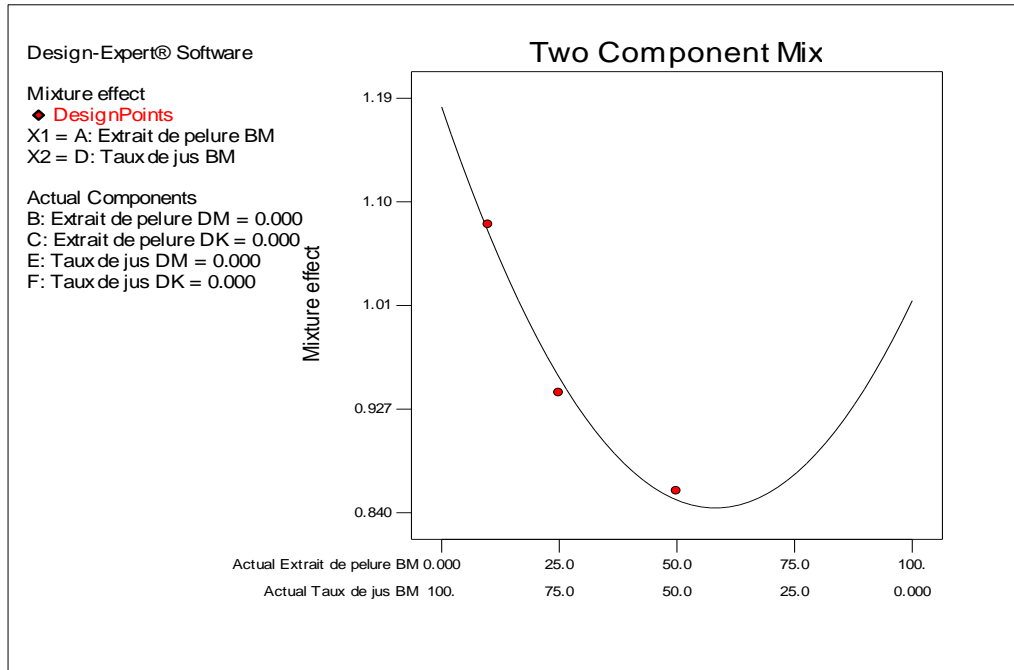


Figure 4.33 : Courbe du mélange binaire (AD).

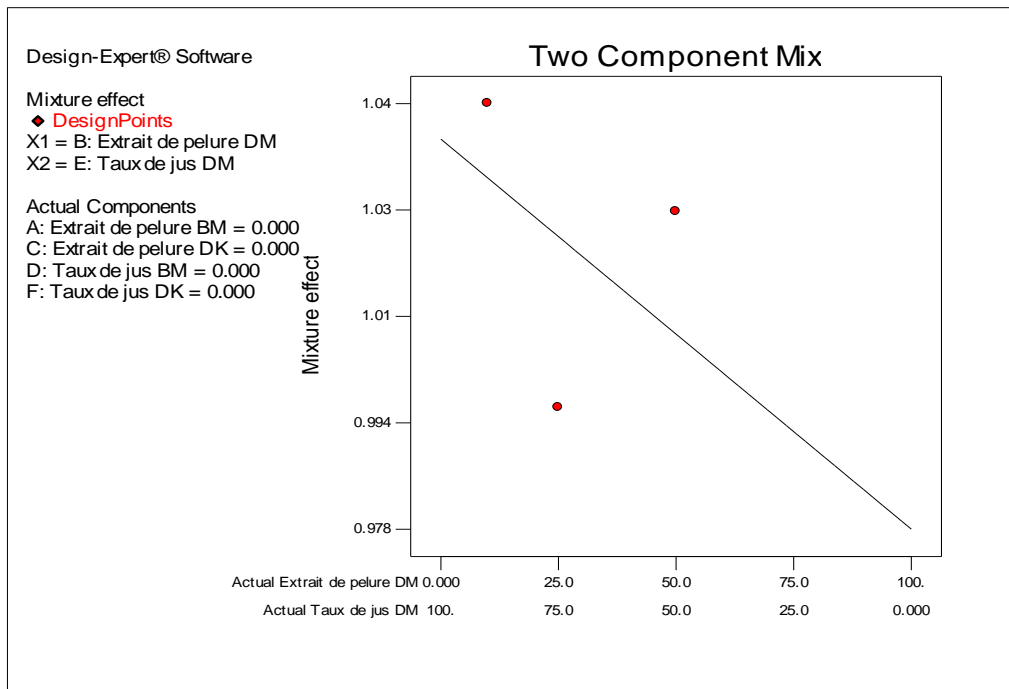


Figure 4.34 : Courbe du mélange binaire (BE).

De la figure 4.33, nous notons l'absence d'effet linéaire sur la réponse ME, pour n'importe quel constituant, jus ou extrait de pelure. Nous pouvons conclure que les valeurs de ME dépendent fortement des proportions de chaque constituant dans le mélange binaire (AD), sauf que cette relation est non-proportionnelle, dans le cas du cultivar Bordj-mira.

D'après la figure 4.34, l'inverse se produit dans le cas du cultivar Doux de Messaad, c'est-à-dire que le ME du mélange, jus de DM plus extrait de pelure de DM, est proportionnel à la quantité de jus dans le mélange, et inversement proportionnel à la quantité d'extrait de pelure dans le mélange.

On observe également que l'effet synergique dans ce mélange se produit pour des proportions de jus supérieurs à 75 % avec des proportions d'extrait de pelure inférieurs à 25 % (lecture dirigée vers l'axe des ordonnées de la courbe de la figure 4.34, dont le ME est supérieur à 1).

Nous concluons donc, que les polyphénols de l'extrait de la pelure de Doux de Messaad ne favorisent pas en association avec les polyphénols du jus un effet synergique, que s'ils sont appliqués à des faibles proportions. Le bénéfice probable de ce cas, est d'obtenir des jus enrichis en antioxydants et de qualités sensorielles peu affectées, puisque les tannins astringents contenus dans la pelure sont en proportions plus ou moins faibles.

✓ Courbes d'isoréponses des mélanges binaires

La figure 4.35, représente la courbe d'isoréponses obtenue sur la base du mélange binaire jus de DM plus extrait de pelure DM.

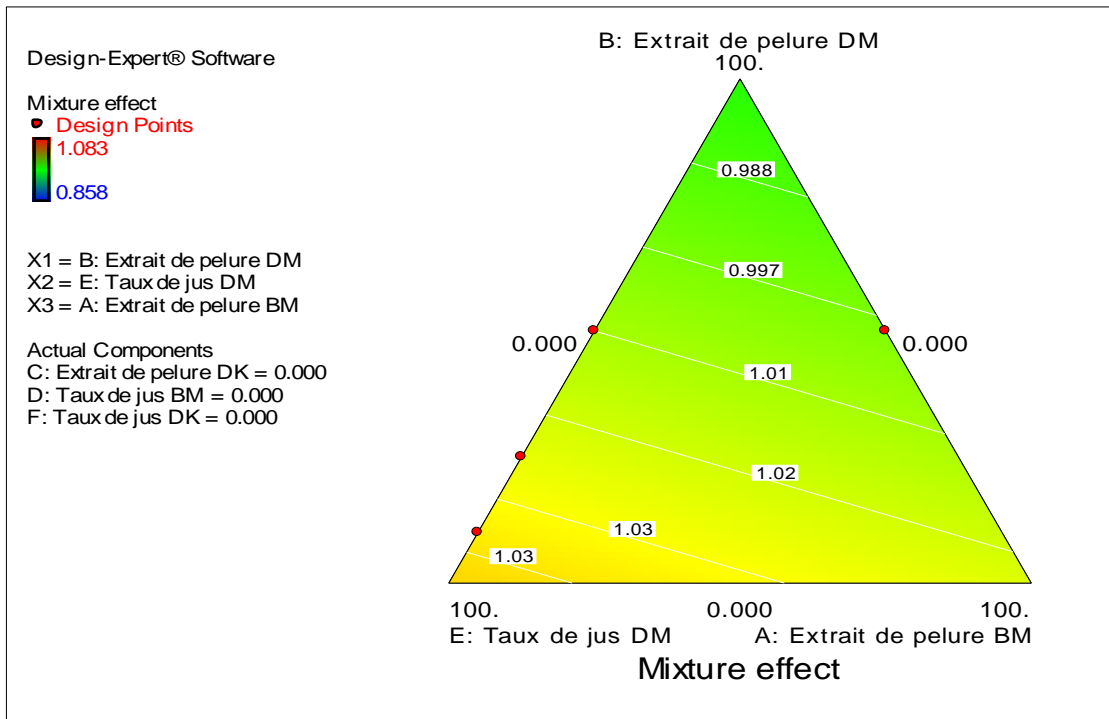


Figure 4.35 : Courbe isoréponses du mélange (BE).

Nous distinguons de cette dernière courbe, que l'effet synergique maximum qu'on peut avoir dans le cas du mélange BE (jus de DM plus extrait de pelure de DM), est $ME = 1.03$.

La figure 4.36, illustre la courbe d'isoréponses obtenue pour le mélange de jus de Bordj-mira plus l'extrait de pelure de Bordj-mira.

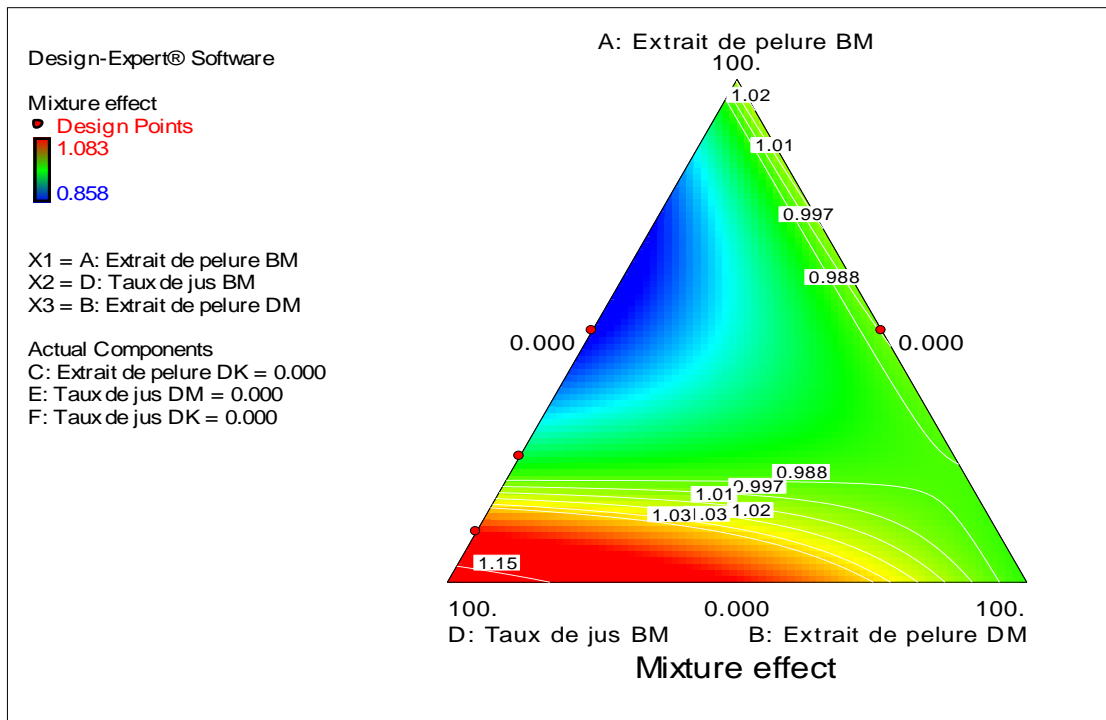


Figure 4.36 : Courbe d'isoréponses du mélange (AD).

L'effet synergique maximum obtenu dans le mélange jus de BM plus extrait de pelure de BM est de $ME = 1.15$. Nous concluons à travers ces deux dernières courbes qu'il existe des effets antioxydants synergiques entre les polyphénols du jus et de la pelure au sein du même cultivar. Nous allons appeler cette synergie par synergie intra-variétale.

Les courbes d'isoréponses suivantes (figures 4.37 et 4.38), illustrent les mélanges qui ont des effets synergiques importants (ME supérieurs à 1.10).

Les figures 4.37 et 4.38, montrent clairement qu'il y a des effets synergiques importants, dans des mélanges de jus et d'extrait de pelure appartenant à deux cultivars différents (synergies inter-variétales), ces effets sont d'ailleurs bien plus forts que ceux des mélanges monovariétaux. En effet, l'effet synergique obtenu entre le jus de BM et l'extrait de pelure de DM est égal à ($ME = 1.15$) (figure 4.37),

et l'effet synergique obtenu dans le mélange entre jus de BM et extrait de pelure de DK est égal à (ME = 1.16) (figure 4.38).

À la lumière de ces résultats, nous pouvons suggérer que l'association entre les polyphénols des différentes variétés, favorise des effets antioxydants synergiques.

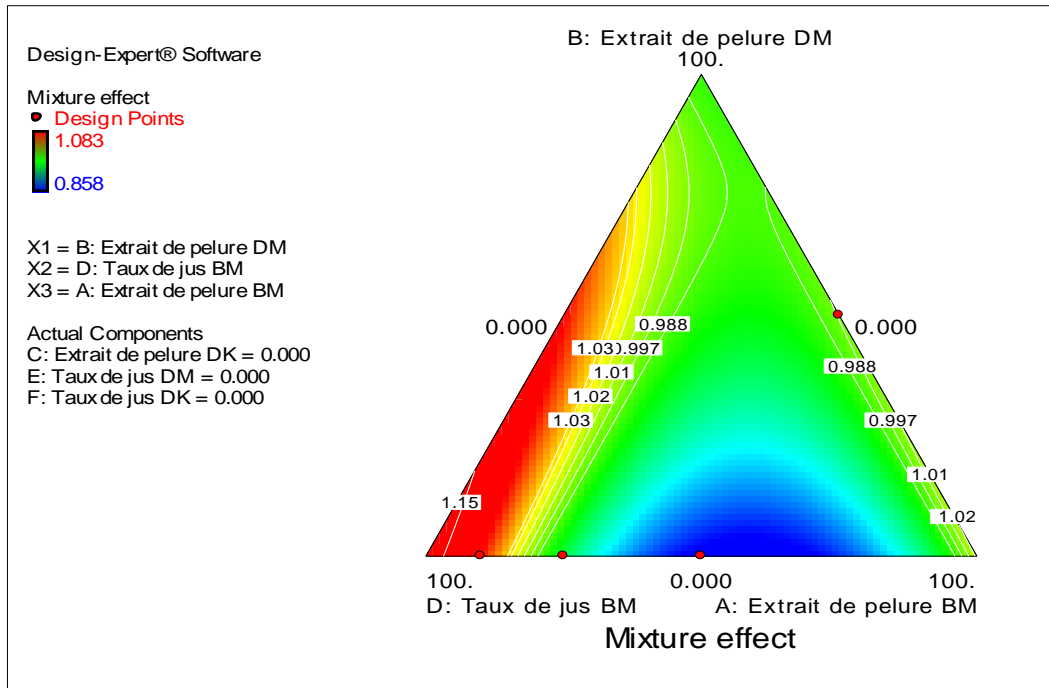


Figure 4.37 : Courbe d'isoresponses du mélange (BD).

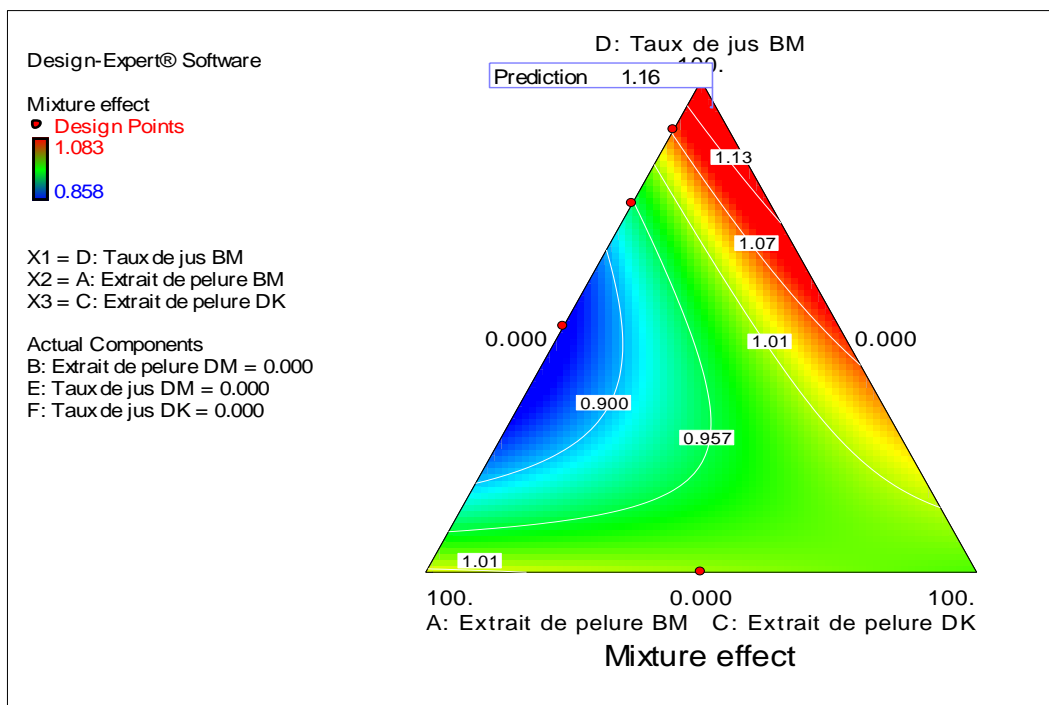


Figure 4.38 : Courbe d'isoresponses du mélange (CD).

La figure 4.39 qui suit, montre que l'effet antioxydant synergique peut se produire entre deux jus de cultivars différents. La figure 4.37, montre également que l'association entre deux variétés de jus quelques soit les proportions, ne produit que des effets synergiques (toute la surface des réponses est colorée en rouge gradué).

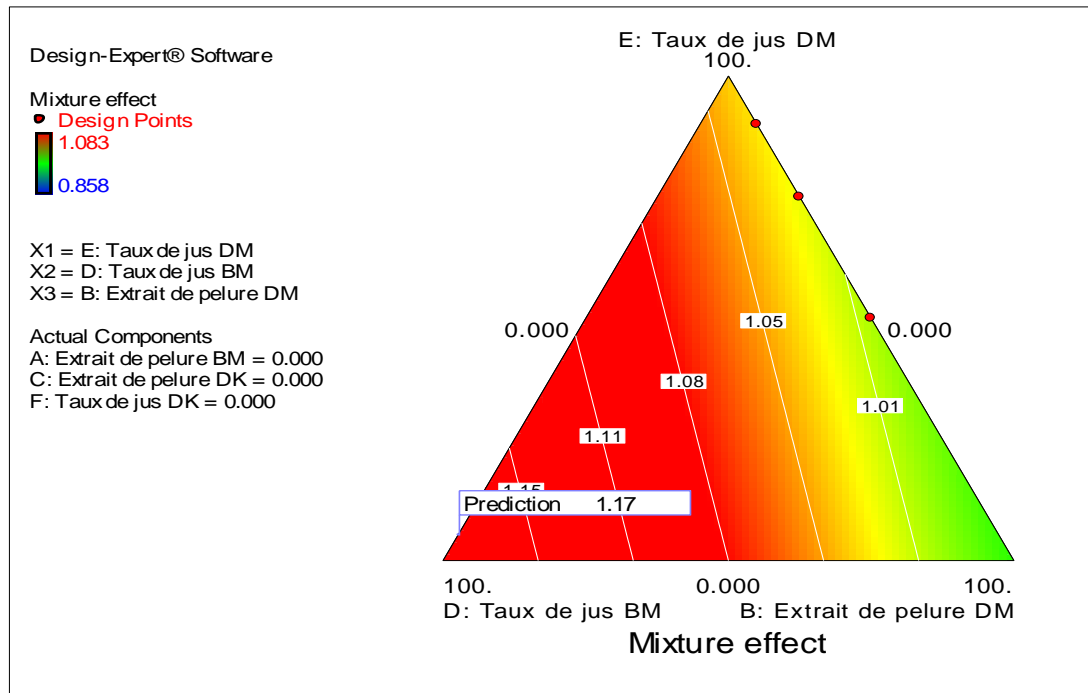


Figure 4.39 : Courbe d'isoréponses du mélange binaire de jus (BM et DM).

✓ Mécanisme proposé de l'effet synergique entre deux antioxydants

Peyrat-Maillard *et al.* en 2003 et d'autres chercheurs après, ont expliqué l'effet synergique entre deux antioxydant par un phénomène de régénération moléculaire, dans lequel des interactions intermoléculaires se déroulent pour donner naissance à de nouvelles molécules dont leur pouvoir antioxydant se trouve diminué dans le cas d'antagonisme et augmenté dans le cas de synergisme.

Ainsi, Aoun et Makris. (2012) [113], expliquent que :

- L'effet antioxydant synergique se produit dans un mélange de composés, si un composé de faible pouvoir antioxydant, génère un autre composé de fort pouvoir antioxydant ;

- L'effet antagoniste se produit dans un mélange de composés, si un composé de fort pouvoir antioxydant, génère un autre composé de faible pouvoir antioxydant.

Ces interactions sont expliquées par la régénération de composés de hauts potentiels d'oxydation à partir d'autres composés ayant de faibles potentiels d'oxydation, par donation des atomes d'hydrogène [113].

✓ Optimisation de l'effet synergique

L'option optimisation numérique nous a permis de chercher les mélanges dans lesquels l'effet synergique est maximum. Le tableau 4.32, recense quelques solutions avancées par le logiciel.

Tableau 4.32 : Solutions optimales de l'effet synergique.

Solution	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)	F (%)	ME
1	0	0	0.971	78.1	20.9	0	1.15
2	0	0	0	0	48.6	51.4	1.16
3	0	0	0	90	10	0	1.17
4	2.76	0	5.07	90	1.88	0.296	1.14

✓ Comparaison entre les valeurs de (ME) prédites et expérimentales

Les valeurs de la réponse (ME) prédites, c'est-à-dire calculées par l'équation du modèle quadratique réduit, et les valeurs de (ME) expérimentales, sont listées dans le tableau 4.33. Les deux séries de valeurs se rapprochent entre elles bien comme il faut, témoignant la validité du modèle quadratique réduit dans la prédiction des valeurs de (ME).

Tableau 4.33 : Comparaison entre les valeurs prédites et expérimentales de (ME).

Valeurs prédites	Valeurs expérimentales
0.999	0.992
0.983	0.979
1.01	1.02
1.03	1.04
0.954	0.941

CONCLUSION

Notre travail s'inscrit dans une initiation à la caractérisation et à la valorisation de notre production locale du fruit de grenadier, surtout en ce qui concerne les variétés et cultivars nouvellement sélectionnées sur la base des critères agronomiques, et qui ne sont à ce jour pas encore caractérisées et sélectionnées sur la base des critères nutritionnels et agro-alimentaires.

La caractérisation physico-chimique et biochimique des pulpes et jus des cultivars Bordj-mira n°11, Doux de Messaad et Doux de Koléa a montré le positionnement acceptable de ces cultivars sur trois échelles importants de la qualité alimentaire, il s'agit de l'échelle nutritionnelle, technologique et commerciale. Les jus des trois cultivars ont montré une richesse en solides solubles, en sucres totaux, et en polyphénols antioxydants (polyphénols totaux, tannins hydrolysables, flavonoïdes et anthocyanines), en plus des faibles taux d'acidité. Cependant et parmi les trois variétés de jus analysées, c'est le jus de Bordj-mira n°11 qui renferme plus de sucre (16.33 %), plus de polyphénols totaux (0.399 %), plus de flavonoïdes (0.0135 %) et présente également la meilleure activité antioxydante (71.43 %).

Outre la composition physico-chimique et biochimique des jus, l'indice de maturité est introduit pour la classification des trois cultivars étudiés. Les deux cultivars Bordj-mira n°11 et Doux de Koléa sont de qualité douce, tandis que le cultivar Doux de Messaad est de qualité aigre-douce. Les pulpes de Bordj-mira n°11 et de Doux de Koléa, sont donc les plus appropriées à la consommation directe ainsi qu'à la transformation industrielle en jus.

Après leur caractérisation, les pelures des grenades ont montré par une richesse exceptionnelle en polyphénols (plus de 2 à 3 % du poids sec), la possibilité de les valoriser dans le domaine agro-alimentaire, par l'extraction des antioxydants naturels pouvant au futur se substituer aux ceux synthétiques.

L'application d'une méthodologie expérimentale moderne (plans d'expériences), sur l'extraction hydro-éthanolique des antioxydants à partir de la pelure des grenades, a montré que l'eau est un solvant efficace pour l'extraction

des polyphénols de la pelure. Cependant, si notre objectif à travers l'extraction est de récupérer des extraits polyphénoliques à la fois rentables et ayant de fortes activités antioxydantes, les mélanges entre eau et éthanol, appliqués à des volumes modérés seront plus efficace comme solvants d'extraction.

L'étude comparée des deux principales méthodes culinaires d'extraction aqueuse, l'infusion s'est montré plus performante que la décoction, surtout pour la préservation de l'efficacité antioxydante de l'extrait.

L'application de la méthode du plan de mélange, dans la recherche des effets antioxydants synergiques entre les différents extraits des grenades, montre que :

- Il existe des effets antioxydants synergiques entre les polyphénols des pelures avec ceux des jus. Ces effets sont en général plus notables pour des faibles proportions d'extraits des pelures ;
- L'effet antioxydant synergique peut s'exprimer entre les polyphénols de deux ou de trois cultivars ;
- Il existe des effets antioxydants synergiques dans des jus de grenade mélangés entre deux cultivars différents ;
- L'expression de l'effet synergique, dépend de la composition polyphénolique qualitative de chaque cultivar.
- Le cultivar Doux de Messaad montre les meilleurs effets synergiques.

L'analyse des résultats des effets antioxydants des mélanges, nous a permis de mettre le point sur deux aspects pouvant intervenir dans l'efficacité antioxydante d'un extrait polyphénolique, notamment :

- Les interactions inter-moléculaires entre les composés antioxydants d'un mélange d'extraits polyphénoliques ;
- Le lien structure - activité antioxydante des composés phénoliques.

L'utilisation des plans d'expériences d'une part pour l'étude de l'extraction des polyphénols de la pelure, et d'autre part pour l'évaluation de l'effet antioxydant synergique entre les différents extraits, a conduit à une meilleure assimilation du procédé d'extraction et du phénomène de synergisme antioxydant étudiés, en plus

qu'elle a fournie des solutions expérimentales ayant des valeurs technologiques et économiques ajoutées.

En guise de perspectives, nous proposons d'insister dans les travaux ultérieurs, sur des points essentiels énumérés dans l'ordre suivants :

- ✓ Dans le but d'établir un inventaire de variétés de la grenade algérienne, nous proposons de faire encore des études sur la composition des cultivars étudiés ainsi que d'autres variétés, cultivées dans notre pays, en faisant appel avant tous à la caractérisation et l'identification génétique de chaque variété, cultivar et clone déjà cultivés ;
- ✓ Procéder par des techniques d'analyses de pointe, telles que les chromatographies, la spectroscopie de masse et de résonance magnétique nucléaire, à l'identification des composés phénoliques contenus dans chaque variété de grenade ;
- ✓ Sélection et multiplication des variétés les plus performantes ;
- ✓ Confirmation des résultats obtenus *in vitro* de l'activité antioxydante des variétés, par des études *in vivo* puis cliniques, dans les qu'elles les aspects métabolisme et biodisponibilité des polyphénols interviennent ;
- ✓ Formulation à l'échelle industrielle des produits alimentaires enrichis en composés phénoliques de la grenade, par l'usage de la méthodologie des plans d'expériences.

APPENDICE A
Appareillage et produits chimiques utilisés

Tableau A.1 : Récapitulatif du matériel non biologique

Appareillage	Produits chimiques
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Matériel courant de laboratoire ✓ Four à moufle ✓ Réfractomètre ✓ pH-mètre ✓ Centrifuge ✓ Spectrophotomètre UV-visible 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hydroxyde de sodium <ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénolphtaléine ✓ Acide sulfurique concentré <ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénol en cristaux ✓ Glucose ✓ Réactif du Folin-Ciocalteu ✓ Carbonate de sodium <ul style="list-style-type: none"> ✓ Acide gallique ✓ Méthanol ✓ Ethanol ✓ Trichlorure d'aluminium <ul style="list-style-type: none"> ✓ Quercétine ✓ Iodate de potassium <ul style="list-style-type: none"> ✓ Acide tannique ✓ Tampons phosphate (pH6.6, pH1.0 et pH4.5) <ul style="list-style-type: none"> ✓ Acide chlorhydrique concentré ✓ Acide oxalique ✓ Acide citrique ✓ Acide L-ascorbique ✓ Dichloroindophénol <ul style="list-style-type: none"> ✓ DPPH ✓ Hexacyanoferrate de potassium ✓ Acide trichloracétique <ul style="list-style-type: none"> ✓ Chlorure ferrique ✓ Sulfate de cuivre pentahydraté (5 H₂O) ✓ Tartrate double sodium potassium <ul style="list-style-type: none"> ✓ Sérum albumine

APPENDICE B

Réaction de complexation entre la quercétine et les ions aluminium

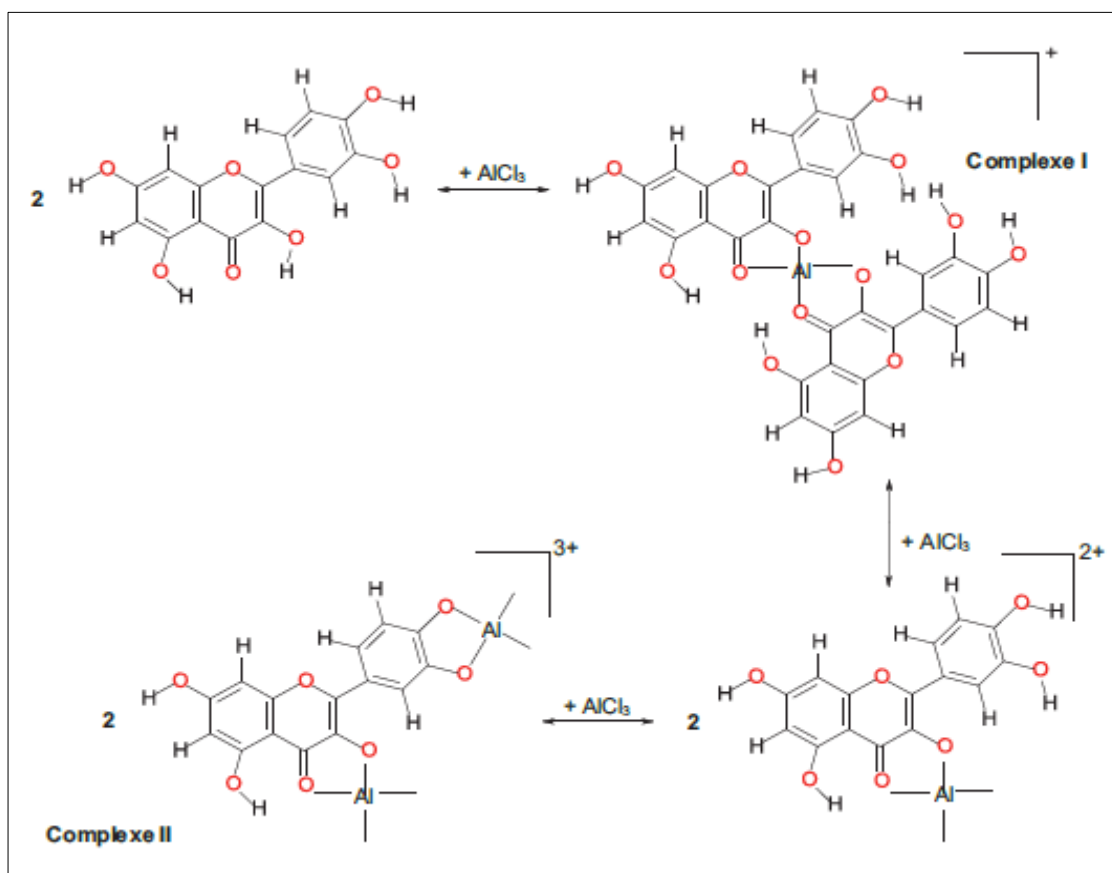


Figure B.1 : Mécanisme de complexation des ions Al^{3+} par la quercétine [80]

APPENDICE C

Courbes d'étalonnage des mesures spectrophotométriques

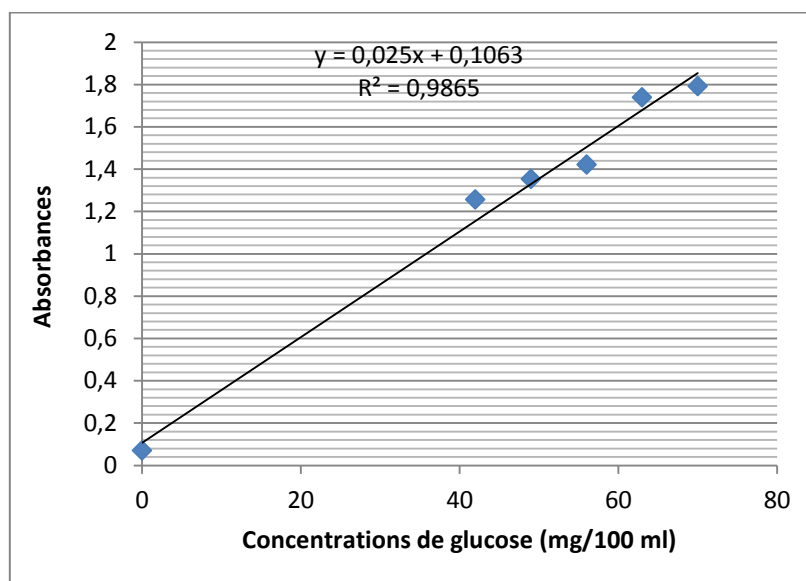


Figure C.1 : Courbe d'étalonnage de glucose.

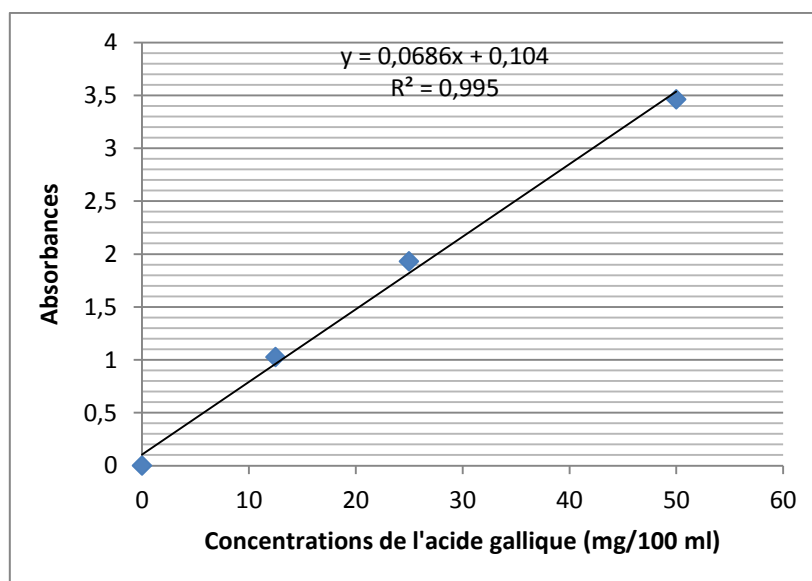


Figure C.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

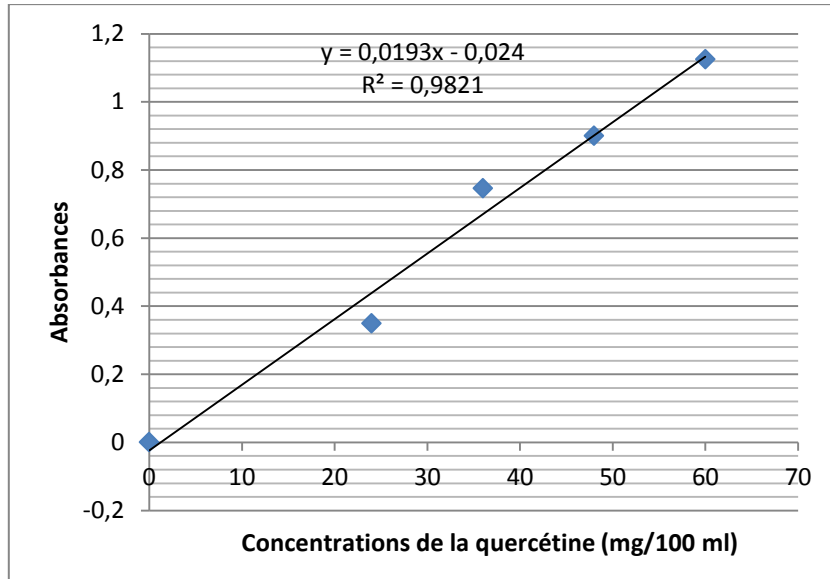


Figure C.3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

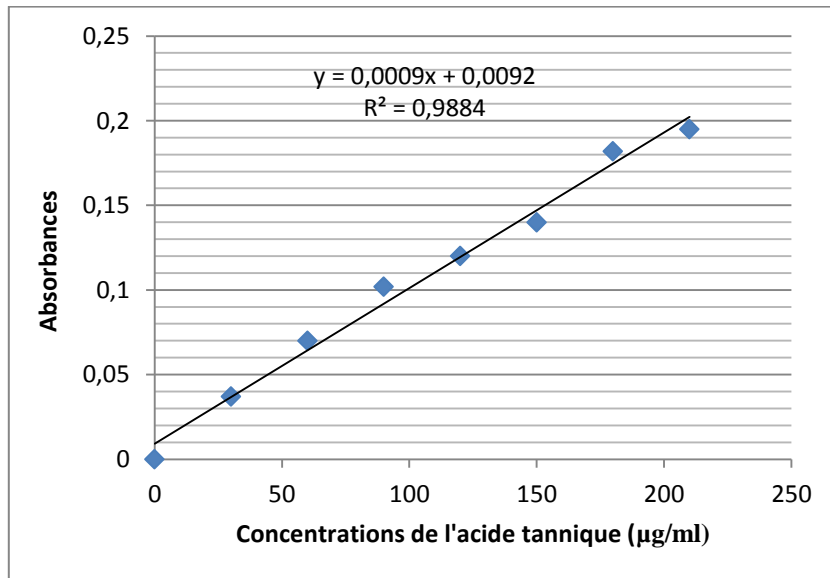


Figure C.4 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

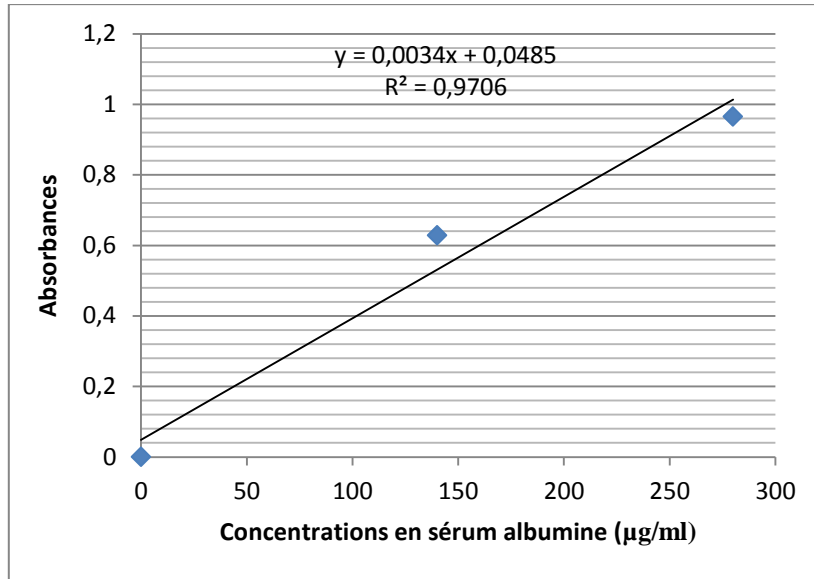


Figure C.5 : Courbe d'étalonnage de la sérum albumine.

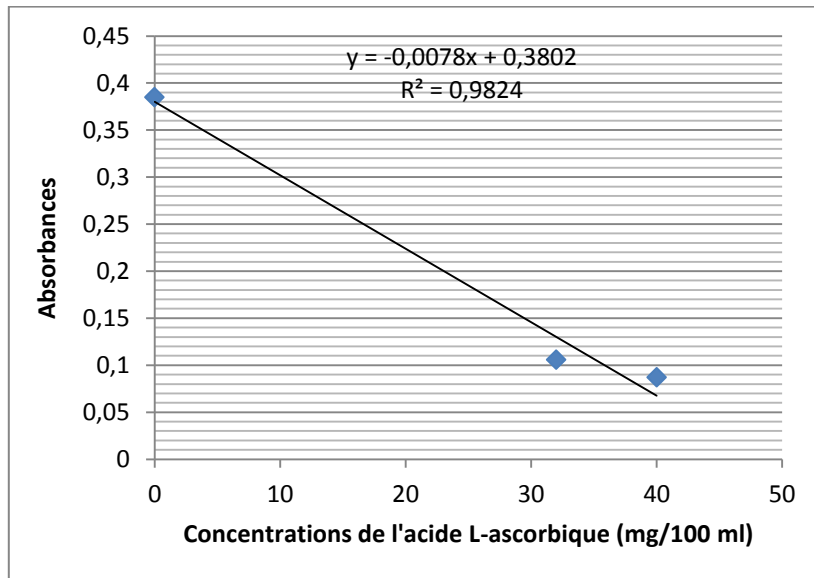


Figure C.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide L-ascorbique.

APPENDICE D
Changement de couleur de la solution de DPPH



Figure D.1 : Changement de couleur de la solution de DPPH, du violet au jaune en présence d'antioxydants [115].

APPENDICE E

Étapes d'utilisation du Design Expert® Software. 7.0.0

E.1. Utilisation du plan factoriel à deux niveaux pour l'extraction des polyphénols

- ✓ Ouverture du plan factoriel à deux niveaux.

2-Level Factorial Design

Design for 2 to 21 factors where each factor is varied over 2 levels. Useful for estimating main effects and interactions. Fractional factorials can be coded to represent the design resolution: Green = Res V or higher, Yellow = Res IV, and Red = Res III.

Runs	Number of Factors												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
4	2 ²	2 ³⁻¹ III											
8		2 ³	2 ⁴⁻¹ IV	2 ⁵⁻² III	2 ⁶⁻³ III	2 ⁷⁻⁴ III							
16			2 ⁴	2 ⁵⁻¹ V	2 ⁶⁻² IV	2 ⁷⁻³ IV	2 ⁸⁻⁴ IV	2 ⁹⁻⁵ III	2 ¹⁰⁻⁶ III	2 ¹¹⁻⁷ III	2 ¹²⁻⁸ III	2 ¹³⁻⁹ III	
32				2 ⁵	2 ⁶⁻¹ VI	2 ⁷⁻² IV	2 ⁸⁻³ IV	2 ⁹⁻⁴ IV	2 ¹⁰⁻⁵ IV	2 ¹¹⁻⁶ IV	2 ¹²⁻⁷ IV	2 ¹³⁻⁸ IV	
64					2 ⁶	2 ⁷⁻¹ V	2 ⁸⁻² IV	2 ⁹⁻³ IV	2 ¹⁰⁻⁴ IV	2 ¹¹⁻⁵ IV	2 ¹²⁻⁶ IV	2 ¹³⁻⁷ IV	
128						2 ⁷	2 ⁸⁻¹ VIII	2 ⁹⁻² VI	2 ¹⁰⁻³ V	2 ¹¹⁻⁴ V	2 ¹²⁻⁵ IV	2 ¹³⁻⁶ IV	
256							2 ⁸	2 ⁹⁻¹ IX	2 ¹⁰⁻² VI	2 ¹¹⁻³ VI	2 ¹²⁻⁴ VI	2 ¹³⁻⁵ V	

- ✓ Spécification des nombres et des noms des facteurs et des réponses.

2-Level Factorial Design

Factors

	Name	Units	Type	Low	High
A:	A		Numeric	-1	1
B:	B		Numeric	-1	1
C:	C		Categoric	-1	1

2-Level Factorial Design

Responses: 2 (1 to 999)

Name	Units
R1	
R2	

✓ Construction de la matrice d'expériences.

C:\Users\Octet Plus\Desktop\Nouveau dossier\Optimisation de l'extraction my design.dx7 - Design-Expert 7.0.0

File Edit View Display Options Design Tools Help

Std	Run	Block	Factor 1 A: Temps de l'extraction h	Factor 2 B: Hydromodule nd	Factor 3 C: Concentration de l'ETOH %	Response 1 PPT %	Response 2 Activité antioxydante DPPH %
5	1	Block 1	1.00	20.0	100.	10.6	80.0
8	2	Block 1	24.0	100.	100.	0.799	69.3
6	3	Block 1	24.0	20.0	100.	8.89	83.0
2	4	Block 1	24.0	20.0	0.000	11.1	74.6
4	5	Block 1	24.0	100.	0.000	1.55	74.0
7	6	Block 1	1.00	100.	100.	1.07	71.8
3	7	Block 1	1.00	100.	0.000	1.18	72.9
1	8	Block 1	1.00	20.0	0.000	8.48	73.6

✓ Analyses statistiques du plan factoriel, ouverture de l'option Analysis.

Notes for Optimisation de l'

Design (Actual)

Summary

Graph Columns

Evaluation

Analysis

PPT (Analyzed)

Activité antioxydant

Optimization

Numerical

Graphical

Point Prediction

Transform Effects ANOVA Diagnostics Model Graphs

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-value
Model	151.	4	37.9	62.1	0.00324
A-Temps de l'extr	0.142	1	0.142	0.233	0.662
B-Hydromodule	148.	1	148.	243.	0.000574
C-Concentration c	0.130	1	0.130	0.213	0.676
AC	3.05	1	3.05	4.99	0.112
Residual	1.83	3	0.610		
Cor Total	153.	7			

The Model F-value of 62.08 implies the model is significant. There is only a 0.32% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

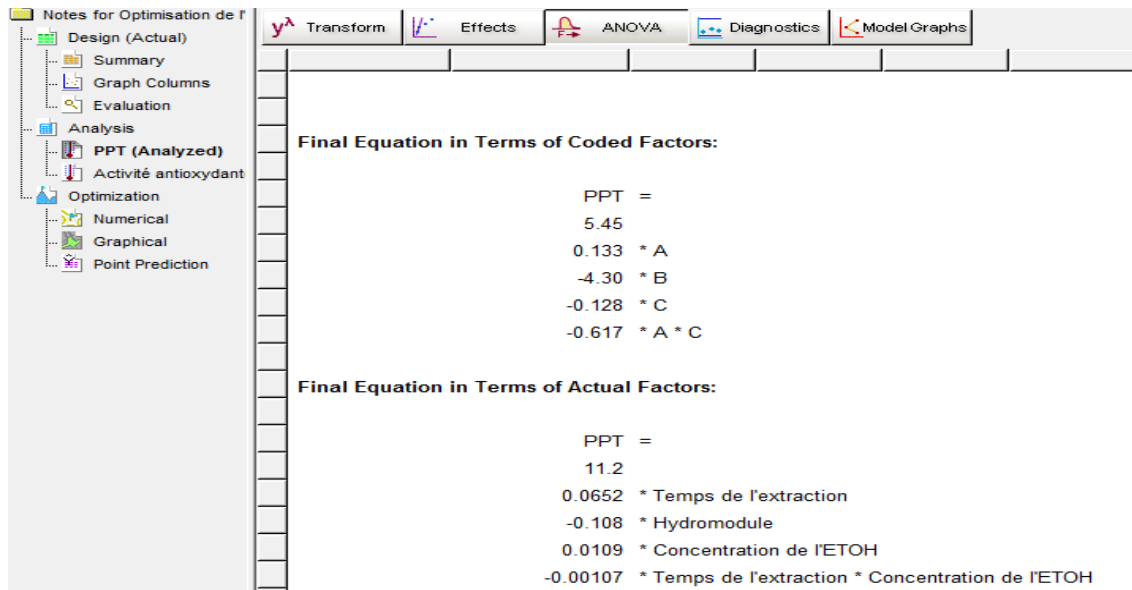
Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case B are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

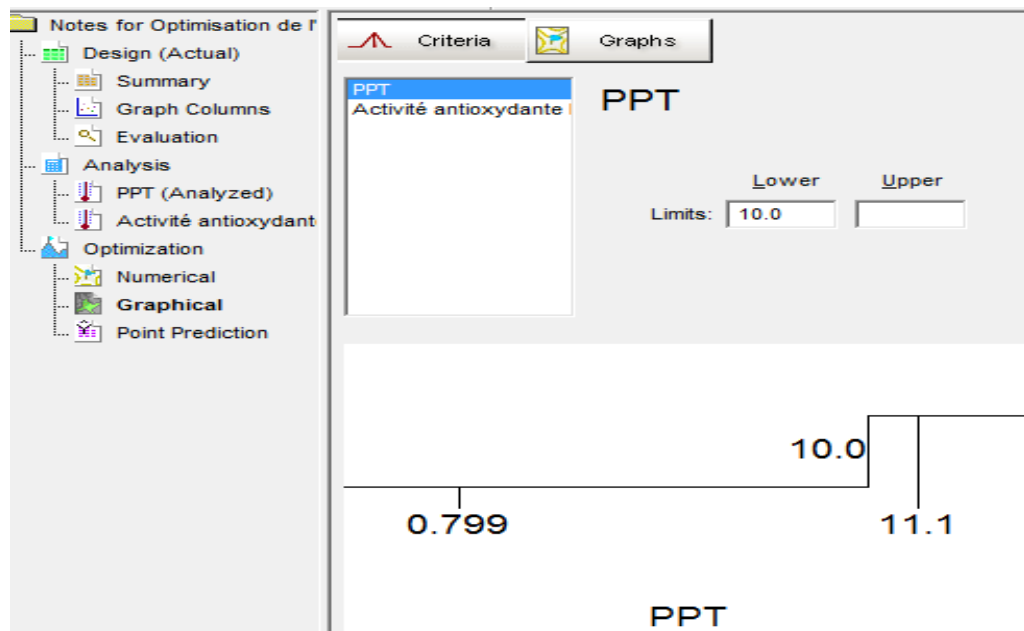
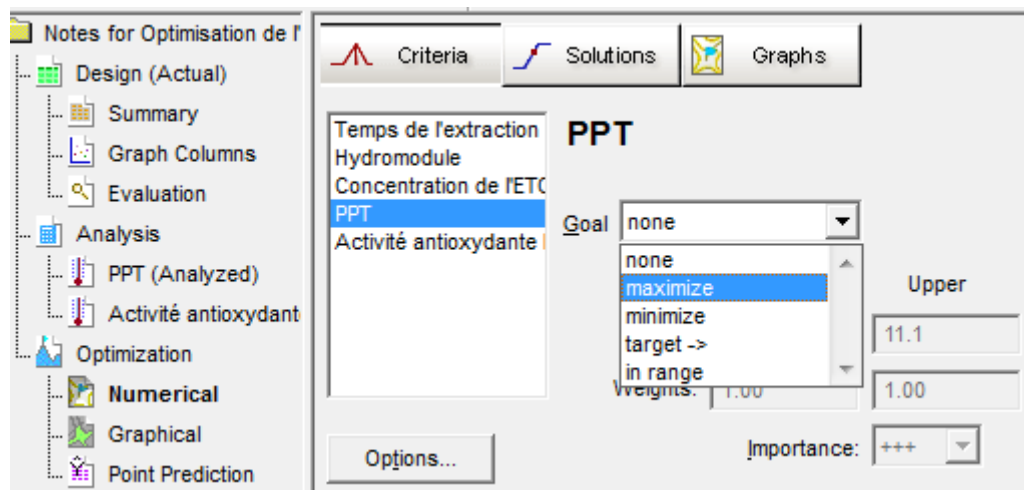
Std. Dev.	0.781	R-Squared	0.988
Mean	5.45	Adj R-Square	0.972
C.V. %	14.3	Pred R-Square	0.915
PRESS	13.0	Adeq Precisc	16.4

The "Pred R-Squared" of 0.9151 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9721.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 16.369 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

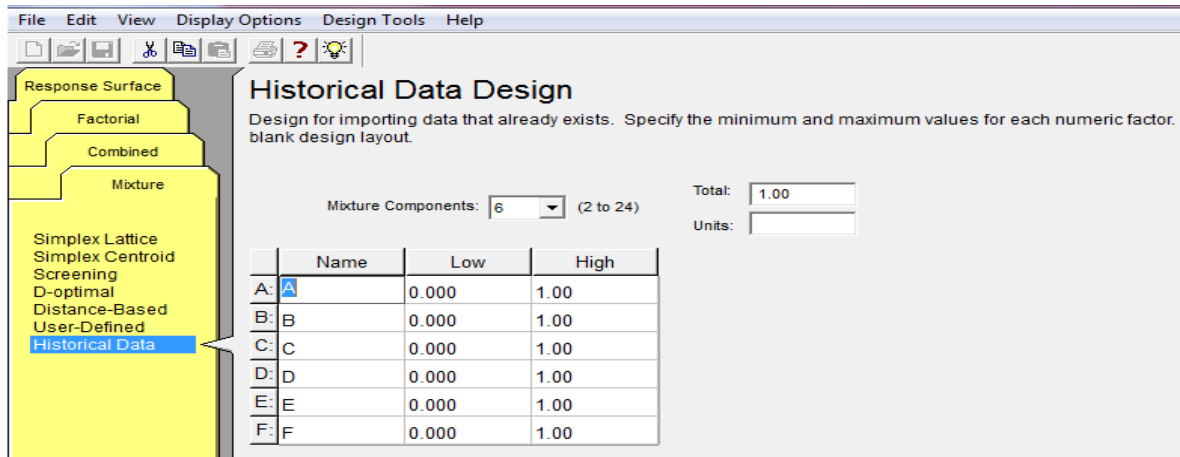


✓ Ouverture de l'option optimisation.



E.2. Utilisation du plan de mélange Historical data pour l'étude de l'effet synergique

- ✓ Ouverture du plan de mélanges historical data, et spécification des constituants des mélanges et du nombre d'essais.



- ✓ Construction de la matrice d'expériences.

	Std	Run	Block	Component 1 A:Extrait de p %	Component 2 B:Extrait de p %	Component 3 C:Extrait de p %	Component 4 D:Taux de jus %	Component 5 E:Taux de jus %	Component 6 F:Taux de jus %	Response 1 Mixture effect Ratio
1	1	1	Block 1	50.0	50.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.992
2	2	2	Block 1	50.0	0.000	50.0	0.000	0.000	0.000	1.00
3	3	3	Block 1	0.000	50.0	50.0	0.000	0.000	0.000	0.979
4	4	4	Block 1	33.3	33.3	33.3	0.000	0.000	0.000	0.999
5	5	5	Block 1	50.0	0.000	0.000	50.0	0.000	0.000	0.858
6	6	6	Block 1	0.000	50.0	0.000	0.000	50.0	0.000	1.02
7	7	7	Block 1	0.000	0.000	50.0	0.000	0.000	50.0	0.985
8	8	8	Block 1	25.0	0.000	0.000	75.0	0.000	0.000	0.941
9	9	9	Block 1	0.000	25.0	0.000	0.000	75.0	0.000	0.996
10	10	10	Block 1	0.000	0.000	25.0	0.000	0.000	75.0	0.949
11	11	11	Block 1	10.0	0.000	0.000	90.0	0.000	0.000	1.08
12	12	12	Block 1	0.000	10.0	0.000	0.000	90.0	0.000	1.04
13	13	13	Block 1	0.000	0.000	10.0	0.000	0.000	90.0	0.983

- ✓ Analyses statistiques du plan de mélanges.

ANOVA for Mixture Reduced Quadratic Model
*** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	0.0322	6	0.00537	14.5	0.00245	significant
Linear Mixture	0.00924	5	0.00185	4.98	0.0380	
AD	0.0230	1	0.0230	61.8	0.000224	
Residual	0.00223	6	0.000371			
Cor Total	0.0344	12				

The Model F-value of 14.45 implies the model is significant. There is only a 0.25% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case Linear Mixture Components, AD are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

model reduction may improve your model.

Std. Dev.	0.0193	R-Squared	0.935
Mean	0.987	Adj R-Square	0.871
C.V. %	1.95	Pred R-Squar	0.715
PRESS	0.00980	Adeq Precisic	16.0

The "Pred R-Squared" of 0.7155 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.8706.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 15.950 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Final Equation in Terms of Real Components:

$$\text{Mixture effect} = 1.02 * \text{Extrait de pelure BM} + 0.978 * \text{Extrait de pelure DM} + 0.988 * \text{Extrait de pelure DK} + 1.18 * \text{Taux de jus BM} + 1.04 * \text{Taux de jus DM} + 0.966 * \text{Taux de jus DK} - 1.00 * \text{Extrait de pelure BM} * \text{Taux de jus BM}$$

Final Equation in Terms of Actual Components:

$$\text{Mixture effect} = 0.0102 * \text{Extrait de pelure BM} + 0.00978 * \text{Extrait de pelure DM} + 0.00988 * \text{Extrait de pelure DK} + 0.0118 * \text{Taux de jus BM} + 0.0104 * \text{Taux de jus DM} + 0.00966 * \text{Taux de jus DK} - 0.000100 * \text{Extrait de pelure BM} * \text{Taux de jus BM}$$

✓ Ouverture de l'option optimisation.

The screenshot shows the 'Criteria' tab in the software interface. The 'Mixture effect' is selected as the goal to be maximized. The goal is set to 'maximize' with an 'Upper' bound of 1.08 and a weight of 1.00. The importance is set to '+++++'. Below the settings, a graph shows the 'Mixture effect' increasing from 0.858 to 1.08 as the input variable increases.

APPENDICE F

GLOSSAIRE DES TERMES

Actual Component: In a mixture design, the components (factors) are commonly scaled as actual components, real components, or pseudo components. An actual component is the physical amount of a particular ingredient (or factor). Typically this value is represented as a percentage or fraction of the total mixture.

Actual Value: 1. the value of the response from the experiment. 2. The physical levels of the variables in the appropriate units as opposed to their coded levels.

Adjusted R-squared (R^2 ajusté): R-squared adjusted for the number of terms in the model relative to the number of points in the design. An estimate of the fraction of overall variation in the data accounted for by the model.

Adequate Precision: Compares the range of predicted values at the design points, to the average prediction error. Ratios greater than four indicate adequate model discrimination

Design matrix: An array of values presented in rows and columns. The columns usually represent design factors. The values in the rows represent settings for each factor in the individual runs or experiments of the design.

Design space: An imaginary area bounded by the extremes of the tested factors.

Effect: The change in average response, when a factor goes from its low level to its high level.

Full factorial: An experimental design which includes all possible combinations of factors at their designated levels.

Numerical variable: A quantitative factor which can be varied on a continuous scale, such as temperature.

Predicted R-squared (R^2 prédit): Measures the amount of variation in new data explained by the model.

Quadratic Model: A polynomial model containing linear and two-factor terms. Mixture Polynomial (Scheffe): Linear: A, B, C, ...; Quadratic: Linear + AB, AC, BC,

R-squared (R^2): The multiple correlation coefficient. A number between -1 and +1 that indicates the degree of relationship of the response variable to the linear

predictor variables. An estimate of the fraction of overall variation in the data accounted for by the model.

Response: A measurable product or process characteristic thought to be affected by the experimental factors.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Activité antioxydante

ANOVA : Analyses de la variance

AT : Acidité titrable

BM : Bordj-mira n°11

DCIP : Dichlorophénolindophénol

DK : Doux de Koléa

DM : Doux de Messaad

DPPH : 2.2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl

ÉAC : Équivalent Acide citrique

ÉAG : Équivalent Acide gallique

ÉAT : Équivalent Acide Tannique

ÉCG : Équivalent Cyanidine-3-Glucoside

ÉQ : Équivalent Quercétine

F (valeur) : Valeur du rapport de Fisher

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

H : Humidité

HPLC-UV-DAD : High Performance Liquid Chromatography coupled with photo diode array detector (HPLC couplé avec un détecteur UV à barrettes de diode)

IM : Indice de Maturité

ITAFV : Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne

LC-MS : Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

LDL : Low Density Lipoprotein

ME : Mixture Effect

MF : Matière fraîche

MS : Matière sèche

NF : Norme Française

NO : Monoxyde d'azote

p : Valeur de la probabilité

PPT : Polyphénols totaux

PM : Poids moyen

PR : Pouvoir réducteur

P/V : Poids/Volume

r(X,Y) : Coefficient de corrélation

RP : Rendement en pulpe

RJ : Rendement en jus

ROS : Reactive Oxygen Species

R² : Coefficient de détermination

R² ajusté : Coefficient de détermination ajusté

R² prédit : Coefficient de détermination prédit

SAB : Sérum Albumine Bovine

TBARS : ThioBarbituric Acid Reactive Substances

TH : Tannins hydrolysables

X : Facteur ou variable indépendante

Y : Réponse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., et Watzl, B., Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases, *Eur J Nutr*, V. 51, n°6, (2012), 637- 663.
2. Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques, Collection biologie, Presses polytech. Ed universitaires Romandes, (2005), 192p.
3. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Tec et Doc, Paris, (2006), 258p.
4. Derbel, S. et Ghedira, A., Les phytonutriments et leur impact sur la santé, *Phytothérapie*, (2005), n° 1, 28 - 34.
5. Edea, M., Polyphénols et jus de grenade, *Phytothérapie*, V. 8, (2010), 16-20.
6. Gil, M. I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., et Kader, A.A., Antioxidant capacity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem*, V. 48, n°10, (2000), 4581-4589.
7. Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., et Heber, D., Comparison of Antioxidant Potency of Commonly Consumed Polyphenol-Rich Beverages in the United States, *J. Agric. Food Chem*, V. 56, (2008), 1415-1422.
8. Qu, W., Breksa III, A. P., Pan, Z., et Ma, H., Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Analytical Methods, Food Chemistry*, V. 132, (2012), 1585-1591.
9. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie, RADP, Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques, INRAA, (juin 2006), 65p.
10. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, RADP., Statistiques agricoles. Série B, n°09, (2009), 64p.
11. Wald, E., Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat. Faculté De Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy 1, (2009), 147p.

12. Ben Abdennebi, M. A, Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK, Mémoire de maîtrise en pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, (2012), 56p.
13. Jurenka, J., Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review, *Alternative Medicine Review*, V. 13, n°2, (2008), 128 -144.
14. Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., et Du, L., Pomegranate: Constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics, *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, V. 4, n °2, (2010), 77-78.
15. Chaturvedula, V. S. P., et Prakash, I., Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel-A Review, *Int. J. Res. Chem. Environ*, V. 1 n°1, (2011), 1-18.
16. Ismail, T., Sestili, P., et Akhtar, S., Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects, *Journal of Ethnopharmacology*, V. 143, (2012), 397-405.
17. Teixeira da Silva, J. A., Rana, T. S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, T. D., et Ranade, S. A., Pomegranate biology and biotechnology: A review, *Scientia Horticulturae*, V. 160, (2013), 85-107.
18. Oukabli, A., Lahlou, M. M., et Alabou, M., Le grenadier. Des variétés performantes pour la culture, *Bulletin mensuel d'information et de liaison du programme national de transfert de technologie en agriculture*, Institut vétérinaire et agronomique Hassan II, Rabat, Maroc, (2004), 4p.
19. Mir, M. M., Umar, I., Mir, S. A., Rehman, M. U., Rather, G. H., et Banday, S. A., Quality Evaluation of Pomegranate Crop-A review, *International Journal of Agriculture and Biology*, V. 14, (2012), 658-667.
20. Martinez, J.J., Megarejo, P., Hernandez, F., Salazar, D.M., et Martinez, R., Seed characterization of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Sci. Hortic*, V. 110, (2006), 241-246.
21. Cristofori, V., Caruso, D., Latini, G., Dell'Agli, M., Cammilli, C., Rugini, E., Bignami, C., et Muleo, R., Fruit quality of Italian pomegranate (*Punica granatum* L.) autochthonous varieties, *Eur Food Res Technol*, V. 232, (2011), 397-403.
22. Zaouay, F., Mena, P., Garcia-Viguera, C., et Mars, M., Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, *Industrial Crops and Products*, V. 40, (2012), 81-89.
23. Caliskan, O., et Bayazit, S., Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Sci. Hortic*, V. 147, (2012), 81-88.

24. Fawole, O. A., et Opara, U. L., Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae*, V. 159, (2013), 152–161.
25. Messaoud, M., et Marrakchi, M., Flowering dynamics and reproductive system of the pomegranate (*Punica granatum* L.) in Tunisia, *Fruits*, V. 59, n°01, (2011), 39-48.
26. Romain, J., Croguennec, T., Schuck, P., et Brulé., G., *Sciences des aliments*, Ed Tech et Doc, Lavoisier, V. 2, (2006), 760p.
27. Génard, M., Robin, C., Massot, C., Bénard, C., Larbat, R., Bertin, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., et Bourgaud, F., Elaboration de la qualité du fruit : composition en métabolites primaires et secondaires, *Innovations Agronomiques*, V. 9, (2010), 47-57.
28. Kulkarni, A. P., et Aradhya, S. M., Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development, *Food Chemistry*, V. 93, (2005), 319-324.
29. Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P. R., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., et Urban, L., Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches, *J. Agric. Food Chem*, V. 58, (2010), 12065 –12082.
30. Boizot, N., et Charpentier, J. P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbres forestier, *Le cahier des techniques de l'INRA*, France, numéro spécial, (2006), 79-82.
31. Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., et Pech, J. C., Mechanism of Fruit Ripening, *In: Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, Davey (eds.), V. 1, (2010), 319-339.
32. Fredot, É., *Connaissance des aliments - bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*, 3^e Ed Tech et Doc, Lavoisier, (2012), 614p.
33. Kader, A. A., Fruit maturity, ripening and quality relationships, *Proc. Int. Symp. On effect of pre- and post-harvest factors on storage of fruits*, Ed L. Michalczuk, *Acta. Hort*, V. 485, (1999), 213 - 207.
34. Elyatem, S. M., et Kader, A. A., Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits, *Scientia Horticulturae*, V. 24, n°4, (2003), 287-293.
35. Caleb, O. J., Opara, U. L., et Witthuhn, C. R., Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review, *Food Bioprocess Technol*, V. 5, (2012), 15-30.

36. Fawole, O. A., et Opara, U. L., Effect of maturity statut on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. Bhagwa), *South Africain Journal of Botany*, V. 85, (2013), 23-31.
37. Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F.A., et Artes, F., Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur. Food Res. Technol.* V. 210, (1999), 39-42.
38. Hassan, N. A., El- Halwagi, A. A., et Sayed, H. A., Phytochemicals, Antioxidant and Chemical Properties of 32 Pomegranate Accessions Growing in Egypt, *World Applied Sciences Journal*, V. 16, n°8, (2012), 1065-1073.
39. Zarei, M., Azizi, M., et Bashir-Sadr, Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening, *Fruits*, V. 66, (2011), 121-129.
40. Lim, T. K, *Punica granatum*, In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, *Fruits*, V. 5, (2013), 136-194.
41. Doymaz, I., Prediction of Drying Characteristics of Pomegranate Arils, *Food Anal. Methods*, V. 5, n°4, (2011), 841-848.
42. Bchir, B., Contribution à l'étude de la conservation des graines de grenade (*Punica granatum* L.) par déshydratation osmotique, Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique, Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique, (2011), 198p.
43. Ministère de l'agriculture et de développement rural, statistiques agricoles, Série B, 2012.
44. Martinez, J.J., Hernandez, F., Haddioui A., Legua, P., Martinez R., Ajal, A., et Melgarejo, P., Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes, *Sci. Hortic*, V. 140, (2012), 100-106.
45. Akbarpour, V., Hemmati, K., et Sharifani, M., Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit in maturation stage, *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci*, V. 6, n°4, (2009), 411-416.
46. Six, M. F et Gentil, R., Guide pratique des aliments santé, aliments danger, Ed Sélection du Reader's Digest, (2008), p184.
47. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, S., Sayas-Barberá, E., et Pérez-Álvarez, J. A., Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction, *Food Research International*, V. 44, (2011), 1217-1223.

48. Nuanda, F. N., Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante, et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse de doctorat en chimie organique, Université Paul Verlaine-Metz, France, (2010), 239p.
49. Sentandreu, E., Cerdan-Calero, M., et Sendra, J. M., Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyser, *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 30, (2013), 32-40.
50. Gasmi, J., et Sanderson, J. T., Growth Inhibitory, Antiandrogenic, and Pro-apoptotic Effects of Punicic Acid in LNCaP Human Prostate Cancer Cells, *J. Agric. Food Chem*, V. 58, n°23, (2010), 12149-12156.
51. Curtay, J. P., Bettina, J., et Joyeux, H., Jus de grenade fermenté. La grenade, « aliment-plus », 2e édition revue et corrigée de Marco pietteur, (2010), 55p.
52. Berset, C., Antioxydants phénoliques-Structure, propriétés, sources végétales, *In : Les polyphénols en agro-alimentaire*, Ed Tech et Doc, Lavoisier, (2006), 265-270.
53. Fontaine, E., Radicaux libres. *In «Traité de nutrition artificielle de l'adulte »*. 3e Edition : Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M-P., Hasselmann M., Leverve X, (2007), 1189 p.
54. Orak, H. H., Yagar, H., et Isbilir, S. S., Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents, *Food Sci. Biotechnology*. V. 21, n°2, (2012), 373-387.
55. Kotamballi, N., Chidambarra, M., Jayaprakasha, G. K., et Singh, R. P., Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in Vivo Models, *J. Agric. Food Chem*, V. 50, n°17, (2002), 4791-4795.
56. Heber, D., Seeram, N. P., Wyatt, H., Henning, S. M., Zhang, Y., Ogden, L. G., Dreher, M., et Hill, J. O., Safety and Antioxidant Activity of a Pomegranate Ellagitannin-Enriched Polyphenol Dietary Supplement in Overweight Individuals with Increased Waist Size, *J. Agric. Food Chem*, V. 55, n°24, (2007), 10050-10054.
57. Lynn, A., Hamadeh, H., Leung, W. C., Russell, J. M., et Barker, M. E., Effects of Pomegranate Juice Supplementation on Pulse Wave Velocity and Blood Pressure in Healthy Young and Middle-aged Men and Women, *Plant Foods Hum Nutr*, V. 67, (2012), 309-314.

58. Talvas, J., Gitenay, D., et Rock, E., Fruits et cancer : de la cancérogenèse à l'épidémiologie, *Phytothérapie*, V. 6, (2008), 96-101.
59. Kourta, *Journal EL WATAN*, octobre 2013.
60. Khan, S. A., The role of pomegranate (*Punica granatum* L.) in colon cancer, Short communication, *Pak. J. Pharm. Sci*, V. 22, n°3, (2009), 346-348.
61. Adhami, V. M., Khan, N., et Mukhtar, H., Prevention of Cancer with Pomegranate and Pomegranate Anthocyanins, *In: Berries and Cancer Prevention*, G.D. Stoner, N.P. Seeram (eds.), (2011), 209-226.
62. Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C. G., Gobbetti, M., et Di Cagno, R., Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, V. 163, (2013), 184-192.
63. Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., et Kiani, H., Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria, *World J Microbiol Biotechnol*, V. 27, (2011), 123-128.
64. Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Kruegera, C. G., Dreher, M., et Reed, J. D., Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition, *Opinions and Perspectives, Journal of Functional Foods*, V. 1, (2009), 324-329.
65. Salghi, R., Analyses physico-chimiques: analyses des denrées alimentaires, Cours d'enseignement, école nationale des sciences appliquées d'Agadir, Maroc, (2007), 33p.
66. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., et Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem*, V. 28, (1956), 350-356.
67. BeMiller, J. N., Carbohydrate analysis, *In: Food Analysis. Part 2: Compositional Analysis of Foods*, S.S. Nielsen, (eds), (2010), 147-177.
68. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R.J., Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V.193, (1951), 265-275.
69. Chang, S. K. C., Protein analysis, *In: Food Analysis. Part 2: Compositional Analysis of Foods*, S.S. Nielsen, (eds), (2010), 135-146.
70. Pegg, R. B., Landen, W. O., et Eitenmiller, R. R., Vitamin Analysis, *In: Food Analysis. Part 2: Compositional Analysis of Foods*, S.S. Nielsen, (eds), (2010), 181-199.

71. Allane, T., Étude des pouvoirs antioxydant et antibactérien de quelques espèces végétales locales alimentaires et non alimentaires, Mémoire de magister en génie alimentaire, Université de M'hamed Bougara Boumerdes, Algérie, (2009), 83p.
72. Arendse, E., Fawole, O. A., et Opara, U. L., Effects of postharvest storage conditions on phytochemical and radical-scavenging activity of pomegranate fruit (cv. Wonderful), Short communication, Scientia Horticulturae, V. 169, (2014), 125-129.
73. Prior, R. L., Wu, X., et Schaich, K., Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, J. Agric. Food Chem, V. 53, n°10, (2005), 4290-4302.
74. Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., et Mehinagic, A., Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco, Arabian Journal of Chemistry, Accepted Manuscript, (2013).
75. Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., et Hagerman, A. E., Determination of hydrolysable tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after reaction with potassium iodate, J. Agric. Food Chem, V. 50, n°7, (2002), 1785-1790.
76. Willis, R. B., et Allen, P. R., Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate, The Analyst, V. 123, (1998), 435-439.
77. Pękal, A., et Pyrzynska, K., Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay, Food Anal. Methods, V. 7, n°9, (2014), 1776-1782.
78. Rezaire, A., Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenoca rpusbataua* (patawa), Thèse de doctorat en phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane, France, (2012), 193p.
79. Pyrzynska, K., et Pękal, A., Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. Minireview, Anal. Methods, V. 5, (2013), 4288-4295.
80. Grigoraş, C. G., Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs, Thèse en cotutelle internationale pour l'obtention du grade de docteur de l'université d'Orléans et de l'université « Vasile Alecsandri » de Bacău, en chimie et génie de l'environnement, (2012), 246p.
81. Frémaux, P., et Leybros, J., Extraction solide-liquide : techniques et appareillage, Techniques de l'ingénieur, document (j2782), (1990), 13p.

82. Abert Vian, M., Chemat, F., Prat, L., et Gourdon, C., Éco-extraction : contexte et innovation, *In : Éco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs*, Chemat, F (eds) DUNOD, (2011), 1-25.
83. Sabre, R., Planification expérimentale en agroalimentaire, Techniques de l'ingénieur, document (F 1005), (2005), 16p.
84. Goupy, J., Plans d'expériences, Techniques de l'ingénieur, document (PE 230), (2005), 28p.
85. Goupy, J., Les plans d'expériences, revue MODULAD, n°34, (2006), 74-116.
86. Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., et Gonzalez-Paramas, A. M., Extraction and isolation of phenolic compounds, *In : Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, Satyajit D. Sarker et Lutfun Nahar (eds.), V. 864, (2012), 427-464.
87. Peyrat-Maillard, M. N., Cuvelier, M. E., et Berset, C., Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects, *JAOCS*, V.80, n°10, (2003), 1007-1012.
88. Prieto, M.A., Murado, M. A., Vázquez, J. A., Quantification, characterization and description of synergy and antagonism in the antioxidant response, *Food Research International*, V. 60, (2014), 218-229.
89. Hmid, I., Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum* L.) : caractérisation physico-chimique, biochimique et stabilité de leur jus frais, Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc), en agro-alimentaire, (2013), 177p.
90. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemat, Z., Esfandiyari, B., et Vazifeshenas, M.R., Investigation of physico-chemical properties and antioxidant capacity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* V. 126, n°2, (2010), 180-185.
91. Martinez, J.J., Hernandez, F., Haddioui A., Legua, P., Martinez R., Ajal, A., et Melgarejo, P., Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. *Sci. Hortic.* V. 140, (2012), 100-106.
92. Lozano, L., Chemical Composition of Fruits and its Technical Importance, *In: Fruit Manufacturing*, (eds.), (2006), 133-161.

93. Poyrazoglu, E., Gokmen, V., et Artik, N., Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey, *J. Food Comp. Anal.* V. 15, (2002), 567-575.
94. Codex Stan, Normes générales codex pour les jus et les nectars de fruits, Codex Stan, 247, (2005), 1-19.
95. Tazairt, B., Alimentation pour diabétiques et pour toute personne soucieuse de rester en bonne santé, Ed El Maarifa, (2006), 132p.
96. Melgarejo, P., Salazar, D.M., et Artés, F., Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* V. 211, (2000), 185-190.
97. Limbach, S., et Guillard, J. C., Vitamines, *In : Traité de nutrition artificielle de l'adulte*, 3e Edition : Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M-P., Hasselmann M., Leverve X, (2007), 128-143.
98. Fawole, O. A., Opara, U. L et Theron, K. I, Chemical and Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Three Pomegranate Cultivars Grown in South Africa, *Food Bioprocess Technol.* (2011), DOI 10.1007/s11947-011-0533-7.
99. Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., et Ferchichi, A., Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower, *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 6, (2012), 4724-4730.
100. Tabaraki, R., Heidarizadi, E., et Benvidi, A., Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, V. 98, (2012), 16–23.
101. Sudheesh, S., et Vijayalakshmi, N. R., Flavonoids from *Punica granatum*-potential antiperoxidative agents, V. 76, n°2, (2005), 181-186.
102. Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., et Ahmadkhaniha, R., Effect of frozen storage on the anthocyanins and phenolic components of pomegranate juice, *J Food Sci Technol*, V. 51, n°2, (2014), 382-386.
103. Carochi, M., et Ferreira, I. C. F. R., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, V. 51, (2013), 15–25.
104. Nkhili, E., Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant, Thèse de doctorat en cotutelle, en sciences des aliments, (2009), 328p.

105. Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., et Chowwanapoonpohn, S., Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels, *Food Chemistry*, V. 103, (2007), 839–846.
106. Karam, S., Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt, Thèse de doctorat de l'université de Limoges, en Electronique des hautes fréquences et optoélectroniques, (2004), 206p.
107. Orak, H. H., Yagar, H., et Isbilir, S. S., Comparison of Antioxidant Activities of Juice, Peel, and Seed of Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Interrelationships with Total Phenolic, Tannin, Anthocyanin, and Flavonoid Contents, *Food Sci. Biotechnol.* V. 21 n°2, (2012), 373-387.
108. Çam, M., et Cihat İçyer, N., Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials, *J Food Sci Technol*, (2013), DOI 10.1007/s13197-013-1148-y.
109. Mukherjee, S., Mandal, N., Dey, A., et Mondal, B., An approach towards optimization of the extraction of polyphenolic antioxidants from ginger (*Zingiber officinale*), (2012), DOI 10.1007/s13197-012-0848-z.
110. Kurin, E., Mučaji, P., et Nagy, M., In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study, *Molecules* 2012, 17, 14336-14348; doi: 10.3390/molecules171214336.
111. Zhang, H., Theoretical elucidation of structure-activity relationship of flavonoid antioxidants, *SCIENCE IN CHINA (Series B)*, V. 42, n°1, (1999), 109-121p.
112. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., et Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships-REVIEWS: CURRENT TOPICS, *Journal of Nutritional Biochemistry*, V. 13, (2002), 572–584.
113. Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., et González-Aguilar, G. A., Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids-Communication, *Molecules* 2012, 17, 12657-12664; doi:10.3390/molecules171112657.
114. Aoun, M., et Makris, D. P., Binary mixtures of natural polyphenolic antioxidants with ascorbic acid: impact of interactions on the antiradical activity, *International Food Research Journal*, V. 19 n°2, (2012), 603-606.

115. Benzzerouk, F. Z., Étude de la qualité physico-chimique de l'écorce de grenade, Mémoire de master 2 en sciences alimentaires, Université de Saad Dahlab-Blida, (2013), 76p.

116. Dridi, B., et Zemmouri, S., Fonctions de pédotransfert pour les vertisols de la plaine de la Mitidja (Algérie) : recherche de paramètres les plus pertinents pour la rétention en eau, Biotechnol. Agron. Soc. Environ, V. 16 n °2, (2012), 193 – 201.

AUTRES RÉFÉRENCES CONSULTÉES

[http/ www.Statease.com](http://www.Statease.com)

[http/ www.Statsoft.fr](http://www.Statsoft.fr)

[http/ www.Phenol-explorer.eu](http://www.Phenol-explorer.eu)

