

SAAD DAHLEB - BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

Thème

**VALORISATION DE L'ECORCE DE TROIS CULTIVARS DE FRUIT DE
LA GRENADE (*Punica granatum L.*) DE LA PLAINE DE
MITIDJA (ALGERIE) PAR L'OBTENTION D'UN EXTRAIT RICHE
EN POLYPHENOLS A USAGE ALIMENTAIRE ET
PHARMACEUTIQUE**

Par

Zoubida MEZIANE KACI

Devant le jury composé de:

H.BELKAHLA	Professeur	U.BLIDA 1	Présidente
L.BOUTEKRABT- BENHADJA	Professeur	U.BLIDA 1	Directrice de thèse
A.BADIS	Professeur	U.BLIDA 1	Examineur
S.OUAFI-HARCHAOUI	Professeur	U.S.T.H.B ALGER	Examinatrice
A.NOUANI	Professeur	U.BOUMERDES	Examineur
K.BENRACHEDI	Professeur	U.BOUMERDES	Examineur

Blida, 2018

RESUME

Le grenadier "*Punica granatum L.*" est un arbre fruitier qui appartient à la famille des Lythracées. Il est résistant au stress hydrique et peu exigeant aux sols riches. Son fruit, la grenade est très appréciée pour ses nombreuses vertus nutritionnelles et thérapeutiques. Le présent travail porte sur la valorisation des résidus du fruit du grenadier de la plaine de la Mitidja. Il a permis de recueillir, par le biais d'une enquête, des informations concernant les usages thérapeutiques de l'écorce de grenade pratiqués dans cette région. La caractérisation de deux cultivars de grenades "Doux de koléa", "Doux de Messaad" et d'un clone "Bordj Mira n° 11" a été effectuée. L'évaluation des résultats morphologiques, nous a permis de conclure que même si les fruits, plus gros ($241,33 \pm 0,03$ g), les plus lourds ont un poids d'arilles ($29 \pm 0,05$ g) et de pépins ($0,03 \pm 0,01$ g) plus faibles, présentent un rendement en arilles plus élevé ($68,55 \pm 2,60\%$). Le cultivar Bordj Mira n°11 a enregistré la teneur la plus élevée ($p < 0,05$) pour les polyphénols totaux ($956 \pm 0,42$ mg EAG/L de jus), les flavonoïdes ($90,39 \pm 0,29$ mgEQr/L de jus), les tanins ($142,34 \pm 0,34$ mg EAT/L de jus) et les anthocyanines ($95,12 \pm 0,19$ L mg EC-3G /L de jus). De même, l'activité antioxydante avec les méthodes de DPPH ($26,17 - 91,2\%$) et du pouvoir réducteur ($1,22 - 1,51$ mg/ml) ont été déterminés. Le modèle Box – Behnken a été utilisé pour étudier les effets de trois variables indépendantes, concentration de solvant (éthanol/eau 20–80%), température (30–70°C) et temps (60–120 min), sur la réponse. L'analyse de régression a montré qu'environ 76% de la variation était expliquée par le modèle. L'extrait hydro-méthanolique de l'écorce de "Doux de Messaad" a révélé une forte teneur en composés phénoliques obtenu avec la méthode assistée par ultrason avec une différence significative ($p < 0,05$), alors que l'extrait de poudre du résidu (bagasses) testé a inhibé l'œdème de manière dose-dépendante et à toutes les heures atteint son maximum ($71,30 \pm 2,56$ %) à la quatrième heure de l'expérimentation. Ces résultats confirment que le jus et les extrait des dérivés de la grenade possèdent de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires liées à la présence des composés phénoliques et semblent justifier leurs preuves d'application en alimentaire et en phytothérapie traditionnelle.

Mots-clés : *Punica granatum L.*, grenade, cultivar, résidus, valorisation, o, antioxydants.

ABSTRACT

The pomegranate "*Punica granatum* L." is a tree fruit belonging to Lythraceae family. It is resistant to water stress and requires little rich soils. Its fruit, pomegranate is very appreciated for its many nutritional and therapeutic virtues. The present work deals to the valorization of the fruit of the grenadier from the Mitidja plain. It provides through survey sufficient information about therapeutic usage of the bark of pomegranate in this region. The characterization of two pomegranate cultivars "Doux of Kolea", "Doux of Messad" and clone of "Bordj Mira n°11" were carried out. The evaluation of the morphological results, allowed us to conclude that even though the fruits, bigger ($241,33 \pm 0,03$ g), and have a weight of arils heaviest ($29 \pm 0,05$ g) and pips ($0,0 \pm 0,01$ g) less important. For the juice, a quantitative study was carried out by spectrometric method. The cultivar of Bordj Mira N°11 recorded the highest rate of ($p < 0,05$) for total polyphenols ($956 \pm 0,42$ mg EAG/L of juice), flavonoids ($90,39 \pm 0,29$ mg EQR/L of juice), tannins ($142,34 \pm 0,34$ mg EAT/L of juice) and anthocyanins $95,12 \pm 0,19$ L mg EC-3G /L of juice). As well, antioxidant properties with DPPH method (26,17- 91,2%) and of the reducing power ($1,22 \cdot 10^{-1}$, 51mg/ml) were determined. The Box-Behnken design was used to study the effects of three independent variables, solvent concentration (ethanol/water 20-80%), temperature (30-70 ° C) and time (60-120 min) on the response. Regression analysis showed that models explained 76% of variation. The hydro-methanolic extract of the bark of the "Doux de Messaad" cultivar revealed a high content of phenolic compounds, total polyphenols, flavonoids and hydrolysable tannins using the ultrasound-assisted method with a significant difference ($p < 0,05$). The pomegranate juice extract powder "bagasse" after test, inhibited the edema in a dose-dependent way and over all hours reached its maximum ($71.30 \pm 2.56\%$) at the fourth hour of experimentation. The results of the phytochemical composition and antioxidant activity confirm that the juice and extracts of the pomegranate derivatives justify possess strong antioxidant and anti-inflammatory capacities related to the presence of phenolic compounds and their application in food and in traditional herbal medicine.

Key words: *Punica granatum* L., Pomegranate, cultivar, residues, recovery, or on, antioxidant

المخلص

الرمان *granatum L Punica* شجر مثمر ينتمي إلى عائلة Lythracées ثماره محبوبة جدا لخصائصها الغذائية والعلاجية، إنه مقاوم للإجهاد المائي ويتطلب القليل من التربة الغنية. الدراسة الحالية تهدف إلى تثمين ثمر الرمان في سهل متيجة. فقد سمح تحقيق الحصول على معلومات فيما يتعلق بالاستعمالات العلاجية للحاء في هذه المنطقة. إن الاستعمال قشر الرمان من طرف المستهلكين أدى بيعها من قبل تجار الأعشاب في المنطقة بالاستعمالات العلاجية في هذه المنطقة. إعداد وصف دقيق لمستنبتين "Doux de Koléa" و "Doux de Messaad" فضلا عن المستنسخ " Bordj Mira 11". لقد سمح لنا تقييم النتائج المورفولوجية ، المختلفة بشكل كبير ، باستنتاج أنه حتى لو كانت الفاكهة أكبر (0.03 ± 241.33 جم) ، فإن أقطرها يكون لها وزن (29 ± 0.05 جم) وأظهرت النقاط الأصغر (0.01 ± 0.0 جم) زيادة العائد من 68.55 ± 2.60 % حققت " Bordj Mira No. 11" أعلى محتوى (P < 0.05) لمادة البوليفينول الكلية (0.42 ± 956 ملغم / مل من العصير) ، الفلافونويدات (0.29 ± 90.39 ملغم / مل من العصير) ، العفص (0.34 ± 142.34 ملغم / مل) . مل من عصير) و الانتوسيانين (0.19 ± 95.12 ملغم / مل من العصير) ، وتم تحديد النشاط المضاد للأكسدة مع أساليب DPPH والحد من الطاقة. تم استخدام تصميم Box-Behnken لدراسة تأثيرات ثلاثة متغيرات مستقلة ، تركيز المذيبات (الإيثانول / الماء 20-80%) ، درجة الحرارة (30-70 درجة مئوية) والوقت (60-120 دقيقة) على الاستجابة. أظهر تحليل الانحدار أن 76 % من التباين تم شرحه بالنموذج. كشف المستخلص المائي للميثانول من لحاء صنف "Doux de Messaad" عن وجود نسبة عالية من المركبات الفينولية باستخدام طريقة المساعدة فوق الصوتية مع وجود فرق معنوي (p < 0.05) ، وهو مسحوق البقايا. مستخلص عصير الرمان (نقل قصب السكر) تم تثبيط الودمة بطريقة تعتمد على الجرعة وبلغت في كل ساعاتها القصوى (2.56 ± 71.30%) في الساعة الرابعة من التجربة. تؤكد نتائج التركيبة النباتية والنشاط المضاد للأكسدة على أن العصير ومستخلصات مشتقات الرمان تبدو مبررة لإثبات تطبيقها في الغذاء والطب التقليدي العشبي. تقييم النتائج المورفولوجية، المتباينة بصورة واضحة، سمحت لنا حتى مع ثمار أكبر حجما (241,33±0,03 غ)، أكثر وزنا بسبب وزن حبيبات الرمان (29 ± 0,05 غ)، أو بسبب قلة البذور (0,03±0,01 غ) ، فإنها ذات مردود عال من الحبيبات (68,55±2,60%). بالنسبة للعصائر، فإنه اجري تحليلا كيميا باستعمال طريقة التحليل الطيفي من اجل تحليل البولي فينول، الفلافونويد، الحناء، و الانتوسيانين. سجل مستنبت برج ميرة رقم 11 نسبة أعلى في مادة البولي فينول (p<0,05) مقدار 956 ± 0,42 مغ/ مل من العصير، الفلافونويد (90,39±0,29 مغ/ مل العصير)، الحناء (من العصير 142,34± 0,34 مغ/ مل والانتوسيان (95,12±0,19 مغ/ مل العصير)، كذلك فإنه تم تسجيل نشاط مضادات الأكسدة، باستعمال ط DPPH كذلك فإنه تم تسجيل نشاط مضادات الأكسدة كذلك القوة المختزلة .

الكلمات المفتاحية *Punica granatum L* ، لرمان، الصنف المخلفات ، الانتعاش ، التحسين ، مضاد الأكسدة

AVANT – PROPOS

Cette thèse est le fruit d'une longue réflexion faisant allusion aux différents usages de l'arbre dans la vie humaine que le coran a attribue dans plusieurs versets. Le figuier et l'olivier, sont les deux premières plantes par lesquelles d'abord Dieu lui-même

prononce un serment et qui apparaissent dans les premiers versets dans Sourate At-Teen (Le figuier), verset 95 :

« **وَالَّتَيْنِ وَالزَّيْتُونَ وَطُورِ سِينِينَ وَهَذَا أَلْبَدِ الْأَمِينِ** »

Comme évocation du bonheur sur la terre, le Coran associe le dattier à la vigne dans sourate El baqara, verset 266 :

« **أَيُّودٌ أَحَدُكُمْ أَنْ تَكُونَ لَهُ جَنَّةٌ مِّنْ نَّخِيلٍ وَأَعْنَابٍ تَجْرِي مِنْ تَحْتِهَا الْأَنْهَارُ** »

D'un autre côté et dans la description des bienfaits de Dieu sur terre comme dans celle du bonheur des élus au paradis, le palmier est associé aussi au grenadier, en arabe "رمان" dans le verset 68 de la Sourate Ar-Rahman (Le Tout Miséricordieux) :

« **فِيهِمَا فَاكِهَةٌ وَنَخْلٌ وَرْمَانٌ فَبِأَيِّ آلاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ** »

Cité trois fois dans le Coran, le grenadier parmi d'autres est indispensable à la vie dans sourate Al-An'âm (Le Bétail), verset (99) :

« **وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مَّتْرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرَّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ أَنْظِرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَعَايَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ** »

Associé à d'autres fruits Dieu nous ordonne de manger des fruits de la grenade dans sourate Al-An'âm (Le Bétail), verset (141) :

« **وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أَكْلُهُ وَالزَّيْتُونَ ۗ وَالرَّمَّانَ مُتَشَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَعَاشُوا حَقَّهُ ۗ يَوْمَ حَصَادِهِ ۗ وَلَا تُسْرِفُوا ۗ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ** »

Les paroles de Dieu reviennent sur le fruit du grenadier, la grenade qui suscite un intérêt de plus en plus grand pour les chercheurs. Elle est utilisée sous différentes formes en médecine traditionnelle pour traiter des maux telles les coliques et la diarrhée. Encore aujourd'hui, la communauté scientifique démontre un grand intérêt envers ce fruit, particulièrement en raison de son contenu élevé en composés antioxydants. Avec ces bienfaits, et son évoque dans le coran, la grenade mérite –elle très largement son titre de " maître des fruits " en Algérie !

REMERCIEMENTS

En préambule à cette thèse, je remercie ALLAH, tout puissant, de m'avoir donné la force de survivre et l'audace nécessaire pour dépasser toutes les difficultés.

L'aboutissement de ce travail de thèse est évidemment lié à des moments durant lesquels diverses contributions m'ont été apportées.

Au terme de plusieurs années de recherche, je remercie du fond du cœur les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de mon parcours.

En premier lieu, j'aimerais exprimer toute ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse Mme.**BOUTEKRABT L.**, Professeur à l'Université de Blida 1, pour sa patience et ses précieux conseils. Je salue aussi, sa souplesse, son ouverture d'esprit qui a su également me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Je la remercie de m'avoir conseillée, encouragée, soutenue avec une disponibilité de tout instant et toujours avec bonne humeur tout au long de ces années.

J'exprime mon estime et mes remerciements aux honorables membres de jury :

Mme.BELKAHLA H., Professeur au département de biotechnologie de l'Université de Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et pour ses encouragements incessants. Merci pour toutes vos discussions et vos conseils qui m'ont accompagné ces deux dernières années.

Mr. BADIS A., Professeur à l'Université de Blida 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail.

Mme.OUAFI S., Professeur à l'Université de Bab Ezzouar, pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse ainsi que pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.

Mr.NOUANI A., et **Mr.BENRACHEDI K.**, Professeurs à l'Université de Boumerdes, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à ce jury.

Ce travail a été effectué en grande partie au sein de Laboratoire de laboratoire de l'Agroalimentaire de l'Institut technique des Arbres fruitiers et de la vig Tessala El Mardja (ITAFV), je tiens vivement à remercier :

Monsieur le Directeur **Mr. MENDIL M.**, pour m'avoir accepté dans sa structure, **Mr. SARAOUI N** ; Directeur Technique pour tous ses aides et ses encouragements. **Merci à Mme.RADJI.**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Un remerciement spécial à Melle.**LAIDOUDI D.**, et à tous les ingénieurs du laboratoire agroalimentaire et sciences du sol.

J'adresse mes remerciements aussi à Monsieur le directeur de la Station Expérimentale de Boufarik pour m'avoir permis de procurer mes échantillons. **Merci à**

Mme. **AIT OUARAB D** ., et à Hakim qui m'ont accompagné durant toutes ces années dans la récolte de mes échantillons.

Cette thèse a été finalisée au Laboratoire de l'Ecole Supérieur Agronomique d'Anger(France).Je Tiens à remercier particulièrement Mr. **EL OTHMANI I.**, Professeur l'école Supérieur de l'Agriculture d'Anger et tous les membres du laboratoire pédagogique et Grappe en particulier Mme.**LE MEURLAY D.**, pour m'avoir accueillie, offert d'excellentes conditions de travail et pour ses aides précieuses. Merci pour les bons moments passés ensemble au laboratoire.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi au responsable du laboratoire galénique du centre de recherche et développement (Saidal) Mr. **ARESLAN L.**, pour avoir permis à mes étudiantes de suivre leurs travaux de recherche.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à Melle **LABDI A.**, pour la fourniture de réactifs et son soutien moral.

L'acquisition de toutes les données relatives à mes travaux de recherches aurait été impossible sans l'inestimable collaboration de mes étudiantes de Master II du Département Agroalimentaire de l'Université de Blida 1, dont il serait ingrat de taire les noms : **Fatima, Djamila, Hanane, Zola, Yasmine, Amina, Meryam, Asma, Roufaida, Nadjoua**, les deux **Iméne**, et Melle **Boulouza** .

Un merci tout spécial à mes enfants pour leurs soutiens et leur intarissable amour. Sans vous, je n'y serai jamais arrivée. **Abdellah, NOUR Yasmine**, pour vos prières, Merci pour tout, ce diplôme est un peu le vôtre aussi.

J'associe à mes remerciements Mme **Touati S** et **Façal** de m'avoir permis de réaliser les analyses d'HPLC au niveau du CRAPC de Bousmail ainsi qu'à Mr **Boukhari N** pour son aide dans le traitement des données statistiques.

Grand merci à ceux à qui toute ma vie ne suffirait pas pour leur rendre u de leur amour. Merci mes très chers parents.

Un grand à mes deux chères nièces **BESMA** et **NESMA**, source de mon courage et ma volonté. Vous êtes le rayon de soleil de ma vie.

Finalement, je tiens à remercier mon mari Mr **KACI A.**, Maitre de Conférence A à l'ENSA d'El Harrach, qui a contribué efficacement à la réussite de ce travail et consenti d'énormes sacrifices, merci pour tes encouragements et ta compréhension.

Que mes collègues, les enseignants, du département Agroalimentaire de la faculté de Sciences de la Nature et de la vie de Blida 1, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je ne saurai terminer sans avoir une pensée profonde à mes chères amies : **Karima, Soumia, Zineb** et **Asma**. Merci profondément **Karima** pour m'avoir aidé à surmonter les difficultés.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici les sentiments de ma profonde gratitude ainsi que mon infime reconnaissance.

Très chaleureusement

DEDICACE

Je dédie ce travail à toute personne qui m'aime et qui m'a soutenu dans ma vie.

A la mémoire des êtres chers que j'ai perdus : Ma nana **fatma** et mes frères **Abdenour** et **Mohamed**.

A mes chers parents, Merci pour vos prières, que dieu vous protège.

A mon cher Mari, merci pour tout ce que tu fais pour mon bonheur.

A la lumière de ma vie, mon espoir de vie : mes chers enfants **Abdellah** et **Nour El Yasmine**.

A ma belle-famille.

A mes frères et à ma sœur **Roufida**

A mes belles sœurs et à mon beau-frère **Kaci**

A tous mes neveux et mes nièces.

Zoubida

TABLE DES MATIERES

RESUMES	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
INTRODUCTION GENERALE	14
PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	20
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU GRENADIER " <i>PUNICA GRANATUM L</i> » ET DE SON FRUIT	21
CHAPITRE 2 : PROPRIETES NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DE LA GRENADE	34
CHAPITRE 3 : EXTRACTION, METHODES D'ANALYSE ET QUANTIFICATION DE COMPOSES PHENOLIQUES	49
PARTIE I : ETUDE EXPERIMENTALE	62
CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES	63
4.1. Introduction	64
4.2. Monographie de la zone d'étude	65
4.3. Etude ethnopharmacologique et perception sur l'utilisation thérapeutique de l'écorce de <i>Punica granatum L.</i>	70
4.4. Caractérisation morphologique et physico-chimique	74
4.5. Caractéristiques chimiques des dérivés de la grenade	79
4.6. Caractérisation phytochimique et identification des composés phénoliques	82
4.7. Activité biologiques des dérivés de grenades et leur optimisation par plan d'expériences	90
CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION	104
CONCLUSION GENERALE	194
APPENDICES	
LISTE DES SYMBOLES	
REFERENCES	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Variétés de grenades autorisés à commercialiser en Algérie	30
Tableau 1.2	Superficie, production et rendement dans quelques wilayas d'Algérie en 2016	31
Tableau 2.1	Composition nutritionnelle de la partie comestible de la grenade (mg/100g)	36
Tableau 2.2	Composition en acides phénoliques du pur jus de la grenade	40
Tableau 4.1	Liste des descripteurs morphologiques de fruit de la grenade	76
Tableau 4.2	Caractéristiques des souches microbiennes testées	93
Tableau 4.3	Différents niveaux de paramètre variables pour l'optimisation	98
Tableau 4.4	Plan d'expériences factoriel complet à trois niveaux pour les trois facteurs étudiés d'extraction	99
Tableau 4.5	Présentation de la matrice d'expérience avec niveaux codés	100
Tableau 5.1	Répartition des consommateurs interrogés en pourcentage selon le sexe et l'âge	106
Tableau 5.2	Informations sur le gout, le prix et les précautions d'utilisations des écorces de grenade	109
Tableau 5.3	Coordonnées factorielles des variables, basées sur des corrélations	111
Tableau 5.4	Répartition des herboristes interrogés en pourcentage selon le sexe et l'âge	113
Tableau 5.5	Type de grenades vendues par les herboristes	118
Tableau 5.6	Caractéristiques morphologiques de fruits trois cultivars de grenades Algériennes	120
Tableau 5.7	Caractéristiques morphologiques des arilles et pépins de fruits	123
Tableau 5.8	pH, acidité titrable, solides solubles totaux, indice de maturité des jus trois cultivars de grenade algérien	125
Tableau 5.9	Matrice de corrélation entre les paramètres morphologiques de grenade	132
Tableau 5.10	Résultats du screening phytochimique du jus et des extraits de grenade	133
Tableau 5.11	Temps de rétention et pourcentage de réponse chromatographique	142
Tableau 5.12	Corrélation linéaire entre les activités antioxydante et les teneurs en composés phénoliques du jus de grenade	151
Tableau 5.13	Matrice de corrélation de l'extrait hydrométhanolique de grenade	165
Tableau 5.14	Données expérimentales des 15 essais du plan d'expériences	172
Tableau 5.15	Analyse de la variance pour les polyphénols totaux	173
Tableau 5.16	Analyse de la variance pour l'activité antioxydante	178

LISTE DES FIGURES

Figure 1.3	Fruit de grenade avec ses arilles	26
Figure 2.1	Présentation de la grenade entière et de ses dérivées	35
Figure 2.2	Principaux acides phénoliques présents dans la grenade	39
Figure 2.3	Principaux anthocyanes présents dans la grenade	40
Figure 2.4	Principaux tanins hydrolysables présents dans l'écorce de grenade	41
Figure 2.5	Tanins condensés	41
Figure 2.6	Principaux effets fonctionnels et médicinaux de la grenade	44
Figure 3.1	Schéma d'un Soxhlet	51
Figure 3.2	Schéma représentative de différentes méthodes d'extraction modernes	52
Figure 3.3	Domaine de facteur limité par le niveau bas et le niveau haut	55
Figure 3.4	Représentation en trois dimensions d'une surface de réponse	56
Figure 3.5	Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	57
Figure 4.1	Zone de prélèvement des échantillons de grenades	66
Figure 4.2	Diagramme Ombrothermique de la région d'étude	68
Figure 4.3	Situation de la région d'étude au niveau du climagramme	69
Figure 4.4	Région de l'enquête ethnopharmacologique	70
Figure 4.5	Sites de collectes de données au niveau de la wilaya d'Alger et de Blida	73
Figure 4.6	Collection des trois cultivars de grenades	75
Figure 4.7	Arilles du jus des trois cultivars de grenades	77
Figure 4.8	Illustration schématique de la procédure d'extraction assistée par ultrason	84
Figure 4.9	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre le radical DPPH• et un antioxydant (AH) [202]	90
Figure 4.10	Mécanisme d'activité anti radicalaire du DPPH	91
Figure 4.11	Mécanisme réactionnel entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH)	92
Figure 4.12	Injection de la caragénine et mesure du gonflement de la patte de souris	102
Figure 5.1	Présentation des variables sur l'axe de corrélations	112
Figure 5.2	Répartition des individus dans le plan défini par les axes 1 et 2	112
Figure 5.3	Répartition des herboristes selon l'âge	116
Figure 5.4	Mode de préparation de l'écorce de grenade	116
Figure 5.5	Satisfaction du consommateur auprès de l'herboriste	117
Figure 5.6	Présentation des variables sur l'axe de corrélation	118
Figure 5.7	Répartition des individus dans le plan défini par les axes 1 et 2	119
Figure 5.8	Teneur en eau sucres totaux, protéines et acide ascorbique	129
Figure 5.9	Teneurs en polyphénols totaux des jus des trois cultivars de grenades	134
Figure 5.10	Teneur en flavonoïdes des jus des trois cultivars de grenades	137
Figure 5.11	Teneur en tanins hydrolysables des jus des trois cultivars de grenades	139
Figure 5.12	Teneur en anthocyanines des jus des trois cultivars de grenades	140
Figure 5.13	Profil en pourcentage de la réponse chromatographique de jus de grenade	143
Figure 5.14	Profil HPLC des étalons et des trois jus de grenade	145
Figure 5.15	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des jus testés et des standards BHT et Acide ascorbique	146
Figure 5.16	Valeurs des IC50 des jus de grenades et des standards	147
Figure 5.17	Pouvoir réducteur des jus de grenade testés et des standards	149
Figure 5.18	Valeurs des EC50 des jus de grenade testés et des standards	150
Figure 5.19	Rendement d'extraction des écorces des trois cultivars de grenades	152
Figure 5.20	Teneur en polyphénols totaux des extraits d'écorces de grenades	155

Figure 5.21	Teneur en flavonoïdes des extraits d'écorces de grenades	158
Figure 5.22	Teneur en tanins hydrolysables des extraits d'écorces de grenades	160
Figure 5.23	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH du cultivar Doux de Koléa	162
Figure 5.24	Valeurs des IC ₅₀ des extraits de l'écorce de Doux de koléa	164
Figure 5.25	Zones d'inhibition des extraits d'écorces de grenades et d'antibiotiques	167
Figure 5.26	CMI de l'extrait des écorces de trois cultivars de grenades	170
Figure 5.27	Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues	175
Figure 5.28	Diagramme de Pareto	175
Figure 5.29	Tracés de surface de réponse du contenu en polyphénols totaux	176
Figure 5.30	Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues	179
Figure 5.31	Diagramme de Pareto	180
Figure 5.32	Tracés de surface de réponse du contenu en polyphénols totaux	181
Figure 5.33	Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins hydrolysables	183
Figure 5.34	Pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH des résidus d'extraction	185
Figure 5.35	Concentration inhibitrice IC ₅₀ du radical DPPH de l'extrait testé	186
Figure 5.36	Evolution du volume des pattes (%AUG) chez les trois lots souris pendant pendant 4h	189
Figure 5.37	Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH) chez le groupe testé et standard.	191

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Ces dernières années, la consommation des fruits est considérée par de nombreuses instances comme un enjeu de santé publique et fait l'objet de recommandations nutritionnelles au niveau mondial et national.

Préconisée dès l'enfance, cette consommation est reconnue comme un facteur protecteur contre plusieurs pathologies chroniques [1,2].

Les fruits sont largement consommés frais ou en jus. Ils sont utilisés pour préparer des boissons, de la confiture, de la gelée et pour aromatiser et comme colorants. Ils sont une source inépuisable de nutriments dont les plus importants les métabolites secondaires [3].

Ces métabolites comme les polyphénols, les flavonoïdes, les saponines ...etc prennent une importance croissante. Ils représentent une source de principes actifs dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis longtemps [4]. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [5].

Le grenadier, "Punica granatum L." espèce fruitière, cultivée dans les régions arides et semi-arides, présente ses grandes potentialités adaptatives aux conditions environnementales (sols et climats). C'est une espèce pérenne tolérante à la sécheresse et capable de valoriser les sols pauvres et salins [6].

Elle est originaire du sud de l'Asie, plus spécialement de l'Iran et de l'Afghanistan et cultivée depuis très longtemps dans de nombreux pays du bassin méditerranéen [7], cette espèce appartient à la famille des Lythracées.

Utilisés traditionnellement dans l'alimentation courante de nombreux pays son fruit la grenade a suscité de plus en plus d'attention depuis quelques années, notamment en raison de ses bienfaits sur la santé.

En raison de ses avantages nutritionnels et thérapeutiques, la grenade a contribué à l'accroissement de sa production [8], qui a amplifié au développement des industries de transformation dans le monde.

Son excellente saveur, sa valeur nutritive et ses propriétés médicinales témoignent de son bon potentiel pour être transformé en produits à grande valeur ajoutée.

En plus des vitamines et minéraux, la valeur nutritionnelle attribuée à la grenade réside dans sa teneur élevée en antioxydants telles que les tanins hydrolysables polyphénols (acide ellagique), les flavonoïdes (en particulier les anthocyanes) et la vitamine C. Elle a été utilisée en tant que sources de santé en raison de ses nombreuses applications médicales [1, 2,9].

Plusieurs publications scientifiques décrivent les bienfaits des composés polyphénoliques extraits de la grenade [9]. D'après PEDRIALI et *al.* [10], la grenade a une capacité antioxydante élevée grâce à sa teneur élevée en acide ellagique. Elle est classée parmi les meilleurs fruits en termes de capacité d'adsorption des radicaux oxygénés.

La partie comestible du fruit peut être consommée fraîche, bien qu'une grande partie de la production mondiale de fruits soit transformée en jus de grenade.

Tout au long du processus de production de jus, deux principaux sous-produits sont générés après extraction du jus de fruit et séparation des graines du jus : l'écorce et les résidus d'extraction.

Ces sous-produits générés lors de la transformation industrielle suscite un problème environnemental permanent en raison de la grande quantité de produite. Pour résoudre ce problème, ces déchets (écorces et résidus d'extraction) doivent être exploités pour la production, la synthèse, la préparation et l'extraction de molécules bioactives.

La mise au point de nouvelles ressources biologiques pour la valorisation des sous-produits de la grenade permettra de résoudre plusieurs problèmes de gestion des déchets, tout en «donnant naissance» à de nouveaux produits finaux tels que des antioxydants, des ingrédients alimentaires, des prébiotiques et plusieurs ingrédients fonctionnels. Ayant une grande valeur économique et de nombreuses applications dans le secteur alimentaire, la valorisation des pelures et des résidus de grenade par modification chimique ou par l'emploi de microorganismes conduit à des produits favorables à la santé.

La valorisation des sous-produits du jus de grenade riches en composés bioactifs pourrait participer à améliorer la qualité des aliments, la promotion de la santé humaine ainsi que la production d'enzymes industrielles. Elle permet également de donner lieu

au développement de nouveaux produits offrant des débouchés diversifiés, traitant simultanément des problèmes liés à la gestion des déchets.

L'Algérie, pays connu par ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. Des plantations intensives ont vu le jour ces dernières années et une variabilité génétique a été créée au niveau du grenadier algérien. Cette variabilité pourrait être considérée comme une richesse supplémentaire.

Longtemps marginalisée, la production fruitière du grenadier (*Punica granatum*) est en nette progression, vue l'importance socio-économique et environnementale qu'elle renferme (11 510 ha pour une production de 848 67,6 tonnes en 2017) [11]. Cette importante production, d'année en année, est une conséquence positive des différents programmes de développement initiés par le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

Des dénominations différentes ont été données aux cultivars et clones algériens de grenadier selon le goût « Doux de Messaad » et « Doux de Koléa », la couleur de l'écorce « Sefri », « grenade rouge » et « grenade jaune » et la région d'origine « Chelfi » et « Bordj Mira ». En Algérie, il existe de nombreux cultivars de grenades, de qualité très différente qui doivent être conservés.

Mise à part des différences sur le plan pomologique, la qualité gustative et la texture déterminent la qualité des fruits, les autres caractéristiques restent très proches de celles des variétés étrangères que sont la couleur de l'écorce et des graines du fruit de grenade.

Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie. En revanche, ce fruit reste sous exploité en Algérie et est seulement consommé sous forme de graines ou transformé en jus chez soi avec une absence totale de la transformation industrielle.

En outre, et au regard des quantités générées, ce sont des sources de plusieurs nutriments et de diverses molécules bioactives dont leur devenir nécessite une grande attention.

Sa consommation actuelle en Algérie est cantonnée à l'état frais durant la saison de récolte, en raison d'une absence totale de valorisation industrielle qui est essentiellement dû à des problèmes de l'étude d'impact et de l'appréciation des produits du grenadier auprès du consommateur algérien.

Ainsi, la présente étude est une réponse au besoin urgent de la collection du point de vue caractérisation de ses valeurs physico-chimiques et biochimiques, qui

peuvent constituer une contribution importante au développement de l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Soutenue par les résultats des travaux de Viuda-Martos et *al.*[12], GIL et *al.*, [13], LANSKY et NEWMAN [14] et Singh et *al.*[15], sur les constituants chimiques et bioactifs de la grenade (*Punica granatum* L.), y compris les arilles, le jus, et les écorces, notre intérêt s'est porté sur l'étude de deux cultivars de grenades (Doux de Koléa, Doux de Messaad) et d'un clone (Bordj Mira n°11) de la région de la Mitidja (Nord Algérien), récolté au niveau de la collection de la Station expérimentale de l'Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la vigne de Boufarik (ITAFV). Il s'agit des variétés de Doux de Koléa, Doux de Messaad et le clone Bordj Mira n°11.

Dans ce contexte, notre travail présente un double objectif :

- En plus d'une enquête ethnopharmacologique, un objectif nutritionnel et technologique par une étude comparative de la variabilité des fruits de grenades et la caractérisation morphologique et nutritionnelle permettant de définir leurs aptitudes pour la consommation et/ou la transformation industrielle.
- Un deuxième objectif biochimique plutôt pharmaceutique et thérapeutique au sens strict a été mis en évidence par quelques activités biologiques *in vitro* et *in vivo* des différentes parties de la grenade.

Pour mener à bien ce travail de recherche, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Réaliser une enquête ethnobotanique
- Identifier, évaluer et analyser le fruit et ses différentes parties sur le plan morphologique, physico chimique et fonctionnel.
- Obtenir à partir de ces cultivars de grenades choisies un extrait riche en antioxydants ;
- Optimiser les conditions opératoires de cet extrait.

Ces volets nous ont, non seulement permis de nous renseigner sur la capacité antioxydante de ses cultivars de grenadier et d'étudier leurs composition phytochimique, mais aussi d'entrevoir de nouveaux usages par la création de produits dérivés à court ou moyen terme, tels que des compléments alimentaires, des aliments fonctionnels (aliments) ou des produits pharmaceutiques.

Elles nous ont permis non seulement d'améliorer les connaissances quasi inexistantes relatives à diversité morphologique, physico-chimique et à sa composition

phytochimique, mais aussi, d'entrevoir des usages nouveaux par la création de produits dérivés à court ou moyen terme, tels que des compléments Alimentaires, des aliments fonctionnels (aliments) ou des produits pharmaceutiques.

Outre cette introduction et la conclusion générale, cette thèse est subdivisée en deux grandes parties consacrées à :

- Une synthèse bibliographique qui est une revue de la littérature qui donne un rappel général sur l'espèce *Punica granatum* L, son historique, son origine et une étude ethnobotanique. Sa production et son importance économique ont été traités. A partir de cette étude, les principaux composés phénoliques ont été traités, les activités biologiques des différentes familles des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins ainsi que leurs intérêts nutritionnels et thérapeutiques ont été présentés. Les méthodes d'extraction traditionnelles et innovantes et d'identification des molécules bioactifs ont été aussi rappelées aussi.
- La deuxième partie est consacrée à la matière végétale et sa préparation, avec les différentes méthodes expérimentales réalisées pour une meilleure caractérisation physico chimique et biochimiques. Une valorisation des écorces et des résidus d'extraction de fruits a été réalisée.

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
PRESENTATION DU GRENADIER
"Punica granatum L." ET DE SON FRUIT

CHAPITRE 1
PRESENTATION DU GRENADIER "*PUNICA GRANATUM L*"
ET DE SON FRUIT

1.1. Introduction

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est l'une des cultures les plus anciennes. En raison de sa grande adaptabilité aux différentes conditions écologiques et de sa grande rentabilité, cet arbre est largement cultivé dans toutes les zones climatiques (climats tempérés, tropicaux et subtropicaux). La production, la commercialisation et la consommation de son fruit est en plein essor ces dernières années dans le monde entier, principalement en raison d'une plus grande sensibilisation à ses attributs favorables à la santé.

Les producteurs, les opérateurs intervenant dans le stockage et les commerçants ont besoin de plus de connaissances sur la production, les opérations pré-post-récolte et le traitement de ce fruit. Ainsi, le chapitre présenté donne un aperçu de ces aspects, y compris la botanique, la production, la récolte, le stockage, les applications post-récolte et la physiologie de ces fruits de la grenade.

1.2. Le grenadier : *Punica granatum* L.

1.2.1. Taxonomie

Punica granatum L. est une plante du sous règne des Phanérogames, de la division des *Angiospermes*, de la classe des *Monocotylédones*, de la sous classe des *Rosidae*, de l'ordre des *Myrtales* et de la famille des *Punicaceae*.

Les plantes de cette famille sont, pour la plupart des arbustes ou de petits arbres, à environ 5 -10 m de hauteur, tandis que quelques-uns sont nains (1-2 m). La famille est réduite à un seul genre *Punica*, constitué de deux espèces monogénériques distinguées sur la base de la couleur de l'ovaire : *Punica granatum* L. et *Punica protopunica* Balf.

Punica nana, une autre forme de *Punica granatum*, est souvent traitée par certains auteurs comme une espèce ornementale [16].

Le genre *Punica* avec ses caractéristiques distinctives est un peu isolé dans l'ordre des *Myrtales*. Son inclusion n'est pas remise en cause mais la famille sous laquelle il devrait être, a longtemps été une question discutable (Appendices, tableau A1).

Ces deux familles (*Lythraceae* ou *Punicaceae*) ont créé une confusion entre les auteurs qui n'arrivent pas à trouver une résolution claire du statut taxonomique de ce

genre. Ces études sont toujours en cours. Cependant, d'après la Taxonomie d'Angiosperm Phylogeny Group (APG-III), ce genre de *Punica* a été traité et inclus dans la famille des Lythraceae [17].

Selon ce dernier système, la classification classique et phylogénétique de *Punica granatum* L a été établie, elle est considérée comme la plus valable à ce jour :

Règne : *Plantae*

Sous-règne : Phanérogames

Division : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum* L.

1.2.2. Nomenclature

Connue sous le terme de grenadier dans la culture française, cette espèce *Punica granatum* L s'est vu attribuer d'autres noms vernaculaires, moins courants [18]. Le grenadier est synonyme de Balaustier, Miouganier, Arosse, Granatier ...etc.

Dans chaque pays et selon les langues parlées, le nom vernaculaire de *Punica granatum* varie. Ainsi, le nom de cet arbre sera :

- En Français : Arosse, Balaustier, Granatier, Grenadier, Migranier.
- En anglais : Pomegranate ou Pome Granate.
- En allemand : Granatapfelbaum, Granatbaum, Gemeine Granat, Balluster.
- En espagnol : Granado coltivado, Mangrano.
- En italien : Granato.
- En chinois : Ngan Che Lieou, Shi Liu.
- Pays arabe : Rommane.
- Nom berbère : Thar'mant

En Algérie, la grenade est appelée romane (الرمان).

1.2.3. Origine et distribution géographique

Le grenadier est un petit arbre fruitier cultivé depuis la plus haute Antiquité pour ses fruits comestibles (grenades) et pour les qualités ornementales de ses grandes fleurs [19].

Selon LEVIN [20], il existe trois méga-centres (primaires, macro-centres secondaires et tertiaire) du moyen orient, Méditerranéenne, de l'Est asiatique, américaine et sud-africaine qui participent à l'origine de la diversité génétique de la grenade (Figure 1.1).



Figure 1.1 : Centres d'origines et de diversité du grenadier selon Vavilov [20]

La grenade est un fruit antique et sa culture date de 3000 avant JC en Perse (Iran). Il a été ramené en Tunisie et en Egypte vers 2000 ans avant JC par les Phéniciens. Autour de la même période, il était introduit dans l'ouest de la Turquie et de la Grèce [21].

Au cours du 15^{ème} siècle, cette culture a été introduite pour le reste de l'Asie, l'Afrique du Nord et l'Europe et elle a été d'abord cultivé en Indonésie [22]. Dispersée dans le monde entier [23], en Amérique centrale, au Mexique et en Amérique du Sud pour terminer en Californie en passant par la Floride et la Georgie vers les années 1770 [24].

Aujourd'hui, le grenadier il est cultivé comme arbre fruitier, avec de conditions climatiques variables, indiquant une flexibilité, une adaptation et une diversité génétique.

1.2.4. Caractéristiques morphologiques

L'espèce "*Punica granatum L.*" est un petit arbre ou arbuste caducifolié, de 5–10 m mètres de hauteur (Figure 1.2-A), bien que certaine soit naine (1-2 m). Il a un grand intérêt pour de nombreuses régions du monde, spécialement dans les régions arides et semi-arides [25].

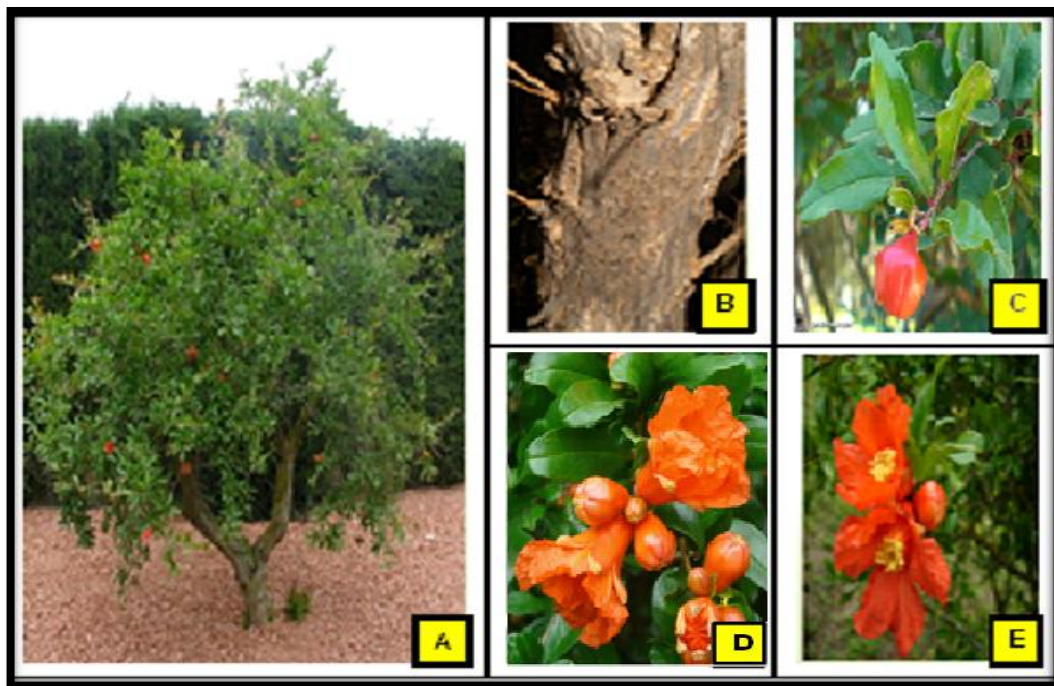


Figure 1.2 : Morphologie du grenadier (A) Arbre de grenadier, (B) Tronc d'arbre, (C) Tige avec feuilles, (D) Bourgeons latéraux et (E) fleurs ouvertes.

Les feuilles du grenadier sont caduques, pour certaines variétés, persistantes sous certains climats (Figure 1.2-C). A un stade précoce de la croissance, ces feuilles mesurent 2 - 9 cm de longueur et 1 - 3 cm de largeur (Figure 1.2- C).

Le grenadier est une espèce monoïque, avec des fleurs écarlates rouges, pourpres ou grenats (Figure 1.2-F) de 4-6 cm de diamètre avec de nombreux pétales et étamines plissés portées en solitaire ou en groupes de 2 ou 3 inclinés vers la fin des rameaux [26] (Figure 1.2- E).

La période de floraison du grenadier dure de 50 à 70 jours, du début du mois de Mars à la fin du mois de Mai allant jusqu'au mois de juillet selon les variétés et les conditions géographiques (Figure 1.2 - G), [26,27].

Son fruit est globuleux (Figure 1.5) ou peu aplatie, de petite à moyenne taille. C'est une baie, de forme hexagonale arrondie de 10 à 15 cm de diamètre. Une moitié seulement du poids (50%) du fruit est comestible, celle-ci est constituée de 80% de jus et 20% de graines [9]. Son poids peut atteindre 600g à 2 kg lorsqu'il est récolté au mois de Septembre.

Le péricarpe ou écorces de grenade est caractérisé par un réseau intérieur de membranes comprenant près de 26-30% du poids total du fruit [28].

Cette écorce recouvre une fine membrane blanchâtre, de saveur âpre qui colle aux graines (environ 600-800 graines) [29] (Figure 1.3). Celles-ci sont disposées dans de nombreuses loges (6 à 12) qui sont séparées par des cloisons ténues [30].

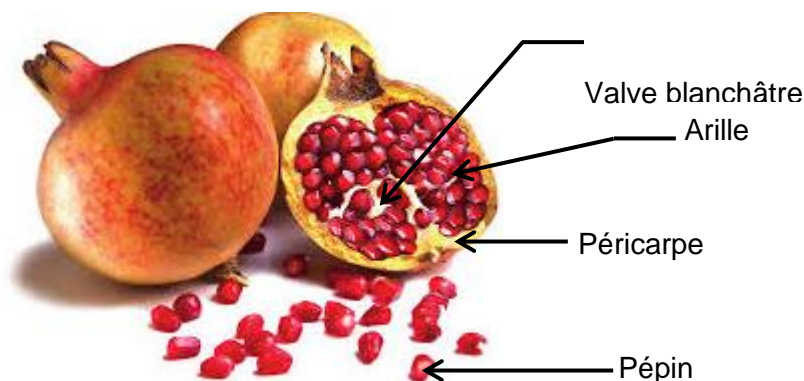


Figure 1.3 : Fruit de grenade avec ses arilles [31].

Le fruit de grenade contient une quantité considérable de pépins (figure 1.6), comprise entre 40 et 100 g / kg de poids de fruit [32].

1.2.5. Aspects agronomiques

L'étude agronomique de la grenade peut être abordée selon plusieurs aspects.

1.2.5.1. Multiplication

La culture du grenadier est relativement facile à conduire, en matière de taille de fertilisation et de traitements phytosanitaires. Sa multiplication peut se faire par semis, par boutures, par marcottage, par drageons ou par greffes. C'est le bouturage qui est pratiquement le seul mode de multiplication.

1.2.5.2. Sélection variétale

Une grande confusion règne dans les noms et les synonymes des variétés et plusieurs n'ont pas encore fait l'objet d'une étude pomologique spéciale et approfondie.

Plus de 1000 variétés de grenades ont été déterminées, elles sont souvent connues d'après le nom de leur pays producteur [14]. Les critères les plus utilisés pour les distinguer sont la couleur de l'écorce et des graines, la dureté des pépins, la teneur en jus, l'acidité, l'astringence et la période de maturation [33]. Aucune différence au niveau de la taille du fruit ou des caractéristiques agronomiques n'a été mise en évidence.

Selon l'acidité de leurs pulpes, les variétés du fruit sont classées en deux grands groupes :

- les grenades présentant des arilles douces, destinées à la consommation en frais et sont mieux appréciées lorsque les pépins sont situés à l'intérieur des arilles et sont de texture tendre ;

- les grenades acides, avec des grains généralement durs, servant généralement à la transformation industrielle [34].

Plus avant, EVREINOFF [35] propose un premier classement basé sur la plus ou moins grande acidité du fruit mûr qui constitue un caractère assez stable pour caractériser les variétés de grenade. Trois groupes sont ainsi définis, basé sur la plus ou moins grande acidité du fruit :

- Variétés sucrées ou douces, dont le jus ne contient pas plus de 1% d'acidité. A ce groupe se rattachent les variétés de table consommées à l'état frais.

- Variétés aigres-douces ou acidulées, l'acidité du jus dans ces variétés varie de 1 % à 2 %. Dans ce groupe sont classées les variétés utilisées dans la fabrication des boissons rafraîchissantes telles que « la grenadine ».

- Variétés acides, dont le jus contient plus de 2 % d'acidité ; c'est le groupe des variétés dites «industrielles» utilisées pour l'extraction de l'acide citrique et autres produits d'usage industriel.

Les variétés de grenades sont classées généralement en fonction de leur acidité titrable moyenne (ATm), en trois grands groupes : "aigre doux", «doux" ou "aigre" avec des valeurs moyennes qui se placent respectivement entre 0,32", "0,78", et 2,72% [36, 37].

MARTINEZ et al [36] ont pu établir une classification pour des variétés de grenades Espagnols en fonction du rapport des solides solubles (degré Brix) et le taux d'Acidité titrable (AT) en période de maturité. Ce rapport a été nommé "indice de maturité". Les variétés de grenades sont classées en trois catégories selon la valeur de ce rapport :

- Variétés aigres : 5 – 7 ;
- Variétés aigres-douces : 17 – 24 ;
- Variétés douces : 31 – 98.

Les variétés de grenade peuvent être aussi classées en trois types sur la base de la dureté de leurs pépins : pépins tendres, pépins semi- tendres et pépins durs [38].

1.2.5.3. Mode de Culture, croissance et stockage

1.2.5.3.1. Mode de culture

Le grenadier est un arbre facile à cultiver, très peu attaqué par les ravageurs, probablement dû à ses propriétés insecticides [39]. Son meilleur développement a lieu dans des sols profonds, riches en humus, frais, argilo-silicieux, avec un sous-sol perméable. Les fruits de qualité sont obtenus pour un sol alluvial, bien drainé [40].

Il est aussi capable de supporter des températures extrêmes allant de -10 °C à 45°C. Il supporte bien un climat chaud et sec [34] et la sécheresse peut nuire à la qualité de ses fruits.

Pour une bonne production de fruits, le grenadier doit être irrigué toutes les 2 à 4 semaines pendant la saison sèche [41].

1.2.5.3.2. Croissance

La période de floraison se produit environ un mois après le bourgeonnement. Elle s'étale sur 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 [42].

Entre le 54 et le 110^{ème} jour après l'épanouissement des fleurs, les arilles subissent un changement de couleur du blanc au rose et du rose à la couleur rouge qui persiste jusqu'à la fin de la période de maturité. [43].

Le modèle de croissance du fruit de grenade a été caractérisé comme une courbe sigmoïde simple à partir de la nouaison à la maturité [44].

Le fruit de *Punica granatum* est un fruit non-climactérique qui ne mûrira pas après la cueillette, c'est-à-dire que la production d'éthylène, tout au long de la période de la maturation, est faible. Il montre un faible taux de respiration, une production à l'état de trace d'éthylène qui réagit négativement sur la couleur du jus et sur sa composition [45].

Pour sa récolte, la maturité correcte de la grenade peut être déterminée en tapant sur le fruit et l'écoute d'un son métallique [46]. Selon les variétés, leur récolte s'effectue entre fin septembre et début octobre lorsque le pigment de chlorophylle de la peau se voit disparaître.

1.2.5.3.3. Stockage

La grenade est un fruit non-climactérique, elle ne subit aucun changement physiologique et nutritionnel après sa récolte. De bonnes conditions d'entreposage doivent être préparées. Elle peut être stockée pendant une période de 3 mois à une

température de 6°C [46]. La qualité des grenades est affectée après une durée de stockage au froid de 1 à 2 mois à des températures inférieures à 5 °C [45].

1.2.6. Production de la grenade

1.2.6.1. Dans le monde

La culture de la grenade (*Punica granatum* L.) est aujourd'hui une activité agricole extrêmement lucrative et rémunératrice. Le rendement monétaire attrayant par unité de surface de cette culture a entraîné une augmentation constante de la superficie, de la production et des exportations de grenade au cours des deux dernières décennies. Elle est largement cultivée en Inde, en Iran, en Chine, aux États-Unis, en Espagne, en Azerbaïdjan, en Arménie, en Afghanistan, en Ouzbékistan, au Moyen-Orient, au Pakistan, en Tunisie, au Maroc, dans les régions sèches de l'Asie du Sud-Est, en Malaisie péninsulaire, aux Indes orientales et en Afrique tropicale[47].

Les statistiques sur la superficie et la production de grenade ne sont pas disponibles auprès de l'Organisation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture au niveau mondial. Toutefois, la superficie cultivée mondiale consacrée à la grenade est d'environ 4 000 000 ha et la production est de 3,0 millions de tonnes [48].

Les principaux producteurs sont l'Inde, l'Iran, la Chine, la Turquie et les États-Unis. L'Inde est le premier pays au monde en matière de production de grenade.

L'Iran se place avec 1 000 000 tonnes de production, après, la Chine avec 300 000 tonnes, la Turquie avec 220 000 tonnes et les États-Unis avec 210 000 tonnes se réservent respectivement la deuxième, troisième, quatrième et cinquième place en termes de production de grenades [49].

1.2.6.2. En Algérie

Le grenadier est une espèce qui reste très peu étudiée à l'échelle nationale bien qu'elle a son potentiel d'être valoriser et de se diversifier dans plusieurs régions. Le comportement de ses différentes variétés a montré que l'espèce est parfaitement adaptée aux conditions environnementales de faible et moyenne altitude. D'autre part, peu de travaux ont été réalisés sur les clones et les variétés introduites pour permettre de sélectionner et de mettre en œuvre un matériel végétal approprié pour la culture.

Communément connue comme étant un fruit ayant des qualités gustatives et diététiques distinguées, la culture du grenadier en Algérie a connu une augmentation ces dernières années avec une superficie passant de 8 386 ha pour une production de 58 610 tonnes en 2006 ha à une superficie de 11 510 ha pour une production de 84 867,6 tonnes en 2017.

Tableau1.1 : Variétés de grenades autorisés à commercialiser en Algérie [50]

Variétés étrangères	Variétés locales
Espagne rouge	Zemd autormne
corda travita	Sulfani
Moller huesso	Sefri
Mellisse	Sélection station
Papers Shell	Chelfi
Gajin	Doux de Messaad
Spanichduoy Sefri	Doux de Koléa

Cette production de grenadier est concentrée à 60% au niveau des régions Sud (Biskra et Djelfa) et de la région Ouest (Mostaganem).

Communément connue comme étant un fruit ayant des qualités gustatives et diététiques distinguées, la culture du grenadier en Algérie a connu une augmentation ces dernières années avec une superficie passant de 8 386 ha pour une production de 58 610 tonnes en 2006 à une superficie de 11 510 ha pour une production de 84 867,6 tonnes en 2017wilaya de Mostaganem. Le rendement moyen est passé de 69,9 t/ha à 87,4t/ha, sachant que les rendements sont variables d'une wilaya à l'autre et dépendent des ressources hydriques mobilisées au profit de cette culture.

D'un point de vue culturel, le grenadier en Algérie est une espèce communément réservée aux zones du Nord et Ouest. Ces dernières années, la production est concentrée à plus de 20 377,4 tonnes dans la zone sud où les vergers de grenades poussent sous l'ombre des palmiers dattiers du Sud algérien.

Cette culture reste moins productrice en Algérie par rapport à d'autres cultures, telles que les agrumes et l'abricotier ayant une superficie respectivement de 48 361 ha et 46 553 ha et qui donnent des productions de 9 552 062 et 2 169 411 Tonnes/an respectivement [11].

Cependant, de nouvelles zones de production de la grenade commencent à apparaître ces dernières années constituant ainsi un nouvel élan en bénéficiant de conditions de culture avec un climat semi-aride qui favorise la production d'un produit de haute qualité.

Tableau 1.2 : Superficie, production et rendement dans quelques wilayas d'Algérie en 2016 [11]

Wilaya	Superficie	Production	Rendement
Blida	92	1338,4	144,8
Medea	81	407,9	50,4

Chlef	219	2840,5	129,7
Boumerdes	63	819	130
Tipaza	36	223	61,9
Tlemcen	383	4979	130
Saida	1	12	120
Mostaganem	1045	18626,1	178,3
Relizane	705	9056,6	128,5
Mascara	182	1370	75,5
Guelma	140	1596,7	113,8
El Taref	144	1850	128,5
Biskra	1040	3649,3	35,1
Djelfa	1186	11076	93,4
Ghardaia	238	2712	113,9
Naama	87	665,9	76,5
El Oued	225	1800	80

Le grenadier est cultivé à travers toutes les wilayas excepté la wilaya de Tindouf, nous citons la wilaya de Mostaganem située dans la région Ouest de l'Algérie avec une superficie de 1 050 ha qui produit 22% de la production totale du pays suivi de la wilaya de Djelfa avec 13%. La wilaya de Blida dispose d'une superficie beaucoup plus faible (92 ha), une production de 1 338,4 tonnes et un rendement plus élevé de 144,8 t/ha (tableau 1.2).

1.2.6.3. Identification des contraintes de la culture du grenadier en Algérie

Étant donné que la production de la grenade est en augmentation continue durant ces cinq dernières années, il en est de même pour la consommation. Elle était de 1kg 800/hab/an en 2011 pour atteindre 2kg 500/hab/an en 2016. Le programme de développement du Ministère de l'Agriculture et du développement rural et de la Pêche (MADRP) se fixe comme objectif d'atteindre en 2025, pour une population prévisible de 45 000 000 d'habitants, une consommation de 4 kg/hab /an (frais + transformé).

Cependant, ce fruit reste sous exploité et il est consommé généralement entant que fruit frais, malgré la diversité de ses variétés. Quant à la valorisation par la transformation, elle est quasi-absente et nécessite une grande attention de la part des industriels algériens afin de développer ce secteur très prometteur.

Le caractère déterminant de la qualité des fruits est le plus souvent complexe, il est quantitatif et contrôlé par l'environnement et le gène. La variation de ces conduites avec l'environnement et le génotype a été traditionnellement étudiée [51]. En Algérie, les problèmes qui affectent la qualité des fruits du grenadier et la rentabilité de sa culture sont :

- La grande variabilité du matériel végétal rend le choix variétal assez problématique et pourrait engendrer une grande hétérogénéité au niveau de la production ;

- L'éclatement des fruits qui peut avoir plusieurs origines est un des principaux problèmes de la production de cette espèce.

- Les ravageurs et les maladies contribuent à une forte altération qualitative et quantitative de la production (Une maladie fongique entraîne la pourriture du fruit dont les graines deviennent noires et impropres à la consommation ;

- L'absence de stations de conservation des fruits rend très difficile l'étalement de la période de commercialisation des grenades et occasionne des pertes énormes ;

- L'exploitation des sous-produits du grenadier reste inexistante ;

- L'organisation de la commercialisation et la valorisation des grenades devient nécessaire par la création d'unités agro-industrielle ;

- Les mesures d'accompagnement techniques des différents programmes de développement du grenadier sont très insuffisantes (formation, perfectionnement et appui à la production).

1.7. Conclusion du chapitre 1

Le grenadier est un arbre fruitier comestible depuis la haute antiquité, cultivé dans de nombreux pays, principalement dans la région méditerranéenne. Cette culture a un fort potentiel pour la plupart des pays producteurs. Son fruit ainsi que ses graines, écorces et fleurs sont connus depuis des milliards d'années.

La consommation de la grenade est surtout appréciée à l'état frais pour le goût très sucré de ses graines enrobées d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente.

Cette espèce devient de plus en plus intéressante et sa culture est passée du caractère familial, avec des plantations dans des jardins familiaux et/ou en plantations éparses, pour se développer en vergers publics, assurant une distinction fruitière à l'échelle nationale. Elle constitue une certaine source principale de revenus pour de nombreux agriculteurs. D'autre part, des activités nutritionnelles et thérapeutiques lui sont attribuées.

CHAPITRE 2

**PROPRIETES NUTRITIONNELLES
ET
FONCTIONNELLES DE LA GRENADE**

CHAPITRE 2

PROPRIETES NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DE LA GRENADE

2.1. Introduction

La grenade, *Punica granatum L* est l'un des fruits les plus anciens et les plus comestibles au monde, que ce soit comme aliment de qualité ou véritable produit de santé. Ces vertus sont confirmées aujourd'hui par la science [13, 52,9] ont été attribués aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques, ainsi que d'autres composés phytochimiques [53].

Dans ce chapitre, la grenade est présentée comme un produit alimentaire et thérapeutique. Une présentation de sa composition nutritionnelle et ses propriétés fonctionnelles est une étape nécessaire à la compréhension des méthodes de valorisation qui y sont associées.

2.2. Propriétés nutritionnelles de la grenade

La grenade est composée de différentes parties : écorce, arilles et pépins) [54]. Sa composition chimique dépend de la variété elle-même, de la région, du climat, de son stade de maturité, des pratiques culturelles et des systèmes de production [42, 55]). La figure 2.1 montre une présentation de la grenade entière et ses dérivées :

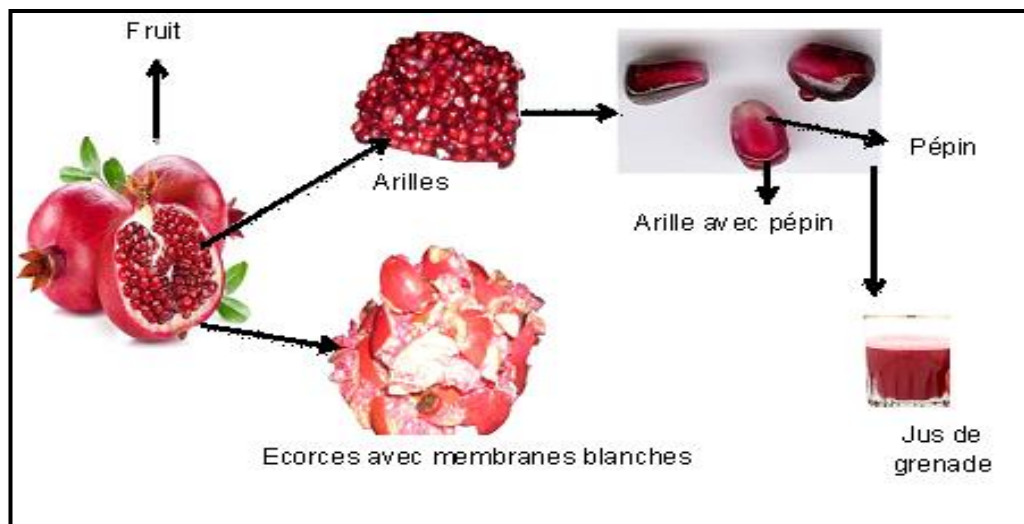


Figure 2.1 : Présentation de la grenade et de ses dérivées [55] modifiée.

2.2.1. L'écorce

L'écorce de la grenade est constituée environ 50% du poids du fruit. A l'état frais, elle est composée de 80% d'eau, de 8% de polysaccharides complexes dont 5% de polysaccharides solubles (5%), représentés par des pectines et d'hémicellulose. Cette écorce contient aussi 7mg de sodium, 210,86 mg de potassium et 9,43 /100g du phosphore, du calcium et du magnésium [55].

2.2.2. Graines ou arilles :

Les graines représentent la partie comestible du fruit de grenade (50%), se compose de 40% de pulpe (partie charnue) et de 10% de pépins (partie ligneuse) [38,56]. Le tableau 2.1 illustre la composition nutritionnelle de la partie comestible de la grenade :

Composés (g)		Minéraux (mg)		Vitamines (mg)	
Eau	80,97	Calcium	3	Vitamine C	4.0 - 14.0
Protéines	0,95	Magnésium	67	Vitamine A	0,032
Lipides totaux	0,3	Potassium	940	Vitamine E	0,60
Sucres totaux	16,57	Sodium	25,8	Vitamine B1	0.01
Fibres	0,61	Manganèse	2,1	Vitamine B2	0.012-0.03

Oligo - éléments	Fer	8,8	Vitamine K	0,0046
	Cuivre	4,7	Vitamine B6	0,105
	Zinc	4,4	Vitamine B3	0.18-0.3

Tableau 2.1 : Composition nutritionnelle de la partie comestible de la grenade (mg/100g de matière fraîche) [57]

La partie comestible de la grenade peut être transformée en plusieurs produits tels que des jus avec une excellente saveur, un parfum attrayant, et un goût délicieux et haute valeur nutritive et médicinale.

Avec une faible valeur calorique comprise entre 62 et 83 Kcal pour 100g de jus, le jus de grenade contient 85,4 % d'eau et 10,67 % de sucres avec 7 g / 100 ml de fructose et environ 8 g / 100 ml de glucose. Les acides organiques sont présents avec 0,09 - 0,32% d'acide citrique [58].

Les protéines sont également présentes à faible teneur de 1,7-7% [84]. La proline, la valine et la méthionine sont considérés comme source d'acides aminés dans le jus de grenade [59].

Le contenu en éléments minéraux est important dans le jus de grenade avec 271,94 mg/100ml de jus de potassium, 93mg/100ml de Phosphore et 7 mg / 100 ml de sodium. Les oligoéléments sont aussi présents sous forme de traces [60].

La grenade fournit environ 16 % de la vitamine C, 14% d'acide folique (vitamine B), près d'un tiers de la vitamine K et 5 % de VNR pour les vitamines du complexe B niacine et de la vitamine B6. C'est une source de vitamine B5 et de vitamine E avec 165, 77 27,29 mg / 100 g de grenade respectivement [61].

Les acides gras sont, quant à eux, présents sous forme d'acide conjugué linoléique, d'acide linoléique, d'acide éléostéarique et d'acide punicique [48].

La composition du jus de grenade dépend du type de cultivar, des facteurs environnementaux, de post-récolte et de stockage et de transformation [12,62].

2.2.3. Pépins :

Les pépins de grenade constituent un résidu obtenu après la transformation en jus [61], avec 40 et 100 g/ kg de fruit selon le type de la variété [63,32]. Ils sont une source riche en lipides totaux (27,2%).

D'autres composés sont présents dans les pépins, les protéines avec 13,2%, les fibres brutes (35,3%) et les cendres (2,0%). On trouve également 6,0% de pectine

et 4,7% de sucres totaux [56]. A l'exception du potassium (49,2 mg / 100 g de pépins), le fer, le cuivre, le sodium, le magnésium et les teneurs en zinc sont inférieures à celles du jus [61].

La quantité d'huile présente dans les pépins est composée de 31,8 – 86,6 % d'acides gras insaturés. Les acides gras saturés constituent 83,6% de la teneur totale en acides gras [32]. Elle varie considérablement en fonction de la variété et du facteur génotypique qui constitue la principale source de variation sur le rendement d'extraction de l'huile obtenu [64]. Une hormone stéroïdienne dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels) du règne végétal a été mise en évidence dans les pépins %) [32,14].

2.3. Composition fonctionnelle

2.3.1. Composés phénoliques

L'un des principaux composés responsables des propriétés fonctionnelles du fruit de la grenade, sont des composés phénoliques sous toutes leurs formes [64].

Les polyphénols naturels peuvent aller de molécules simples (acides phénoliques, phénylpropanoïdes, flavonoïdes) à des composés hautement polymérisés (lignines, mélanines, tanins), les flavonoïdes représentant le sous-groupe le plus commun et le plus répandu [65].

Chimiquement, les acides phénoliques peuvent être définis comme des substances possédant un cycle aromatique lié à un ou plusieurs substituants hydrogénés, y compris leurs dérivés fonctionnels [66].

Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire composés de 15 atomes de carbone, disposés en configuration C6-C3-C6. La structure consiste essentiellement en 2 cycles aromatiques reliés par un pont à 3 carbones, généralement sous la forme d'un cycle hétérocyclique [67].

Les anthocyanines constituent le groupe de flavonoïdes le plus important présent dans les arilles de la grenade. Ces pigments donnent au fruit et au jus sa couleur rouge [68]. Le jus de grenade contient une grande variété d'anthocyanes (Figure 2a), principalement de cyanidine - 3 - O - glucoside, de cyanidine - 3,5 - di - glucoside, de delphinidine - 3 - O - glucoside, de delphinidine - 3,5 - Di - O - glucoside, pélargonidine - 3 - O - glucoside et pélargonidine - 3,5 - di - O - glucoside [14]. La

principale différence réside dans le nombre de groupes hydroxylés, la nature et le nombre de sucres liés à leur structure et la position de ces liaisons [68].

Les acides phénoliques présents dans le jus de grenade sont les acides hydroxybenzoïques [69] et les acides hydroxycinnamiques [70].

Les tanins condensés (proanthocyanidines) et les tannins hydrolysables (ellagitannins et gallotannins) sont les principaux polyphénols de la grenade (Figure 2.4). Les autres composés phytochimiques identifiés à partir de la grenade sont les acides organiques, les stérols et les triterpénoïdes, les acides gras, les triglycérides et les alcaloïdes [71].

Les flavonoïdes comprennent les flavonols tels que la lutéoline, la quercétine et le kaempférol trouvés dans l'extrait d'écorce de grenade [72] et les anthocyanes présents dans les arilles. Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles responsables de la couleur rouge vif du jus de la grenade [63]. Les tanins hydrolysables sont disponibles dans les écorces et les membranes blanches du fruit [51].

Ces composés bioactifs ont un potentiel prophylactique et curatif contre plusieurs maladies comme les accidents vasculaires cérébraux, l'athérosclérose, tous les types de cancers, les inflammations, le diabète, les maladies à agents antiviraux, les vermifuges et les ténicides [73].

2.3.1. Localisation

Les composés phénoliques sont répartis inégalement dans le fruit du grenadier et varient selon la variété, le stade d'évolution physiologique, les conditions climatiques et le stockage post-récolte [74].

2.3.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés non flavonoïdes regroupant les acides benzoïques (acide gallique) et les acides hydroxycinnamiques (acide caféique) ainsi que d'autres dérivés tels que les stilbènes dont le plus connu est le resvératrol.

Ces acides phénoliques (Figure 2.2) peuvent être divisés en 2 groupes :

- les acides hydroxybenzoïques, principalement l'acide gallique et l'acide ellagique [75].
- et les acides hydroxycinnamiques, principalement l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide p-coumarique [76].

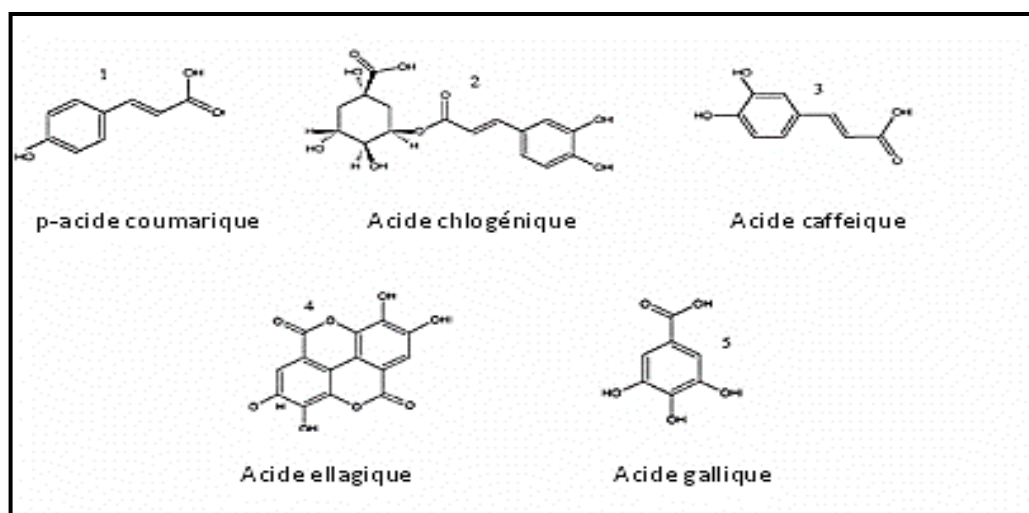


Figure 2.2 : Principaux acides phénoliques présents dans la grenade [76].

Ces acides sont représentés dans les arilles et l'écorce de grenade [61]. La punicalagine a été isolée à partir de la membrane blanche de l'écorce de grenade [77].

Le tableau 2.2. présente les teneurs en acides phénolique du pur jus de grenade :

Tableau 2.2 : Composition en acides phénoliques du pur jus de la grenade [61].

Acides hydroxybenzoïques (mg/100 g MF)	Acide ellagique	Acide gallique	Punicalagine
	2,06	0,45	43,60
Acides hydroxycinnamiques (mg/100 g MF)	acide5caféylquinique	acide caféique	acide o-coumarique
	0,12	0,07	0,01

2.3.1.2. Flavonoïdes

La structure des flavonoïdes consiste principalement en deux cycles aromatiques reliés par une chaîne en C3. Ceux présents dans la grenade sont les flavones, les flavonols, les anthocyanidines et les flavan-3-ols. La luteoline et l'apigénine sont les flavones présent dans l'écorce de grenade. Les flavonoles sont plutôt présentés dans l'écorce et la myricétine et le kaempferol et la quercétine dans le jus et l'écorce [77].

Un autre groupe de composés appartenant aux flavonoïdes est contenu dans la grenade, les anthocyanes. Ce sont des pigments solubles dans l'eau et donnent au fruit et au jus sa couleur rouge [10] (figure 2.3).

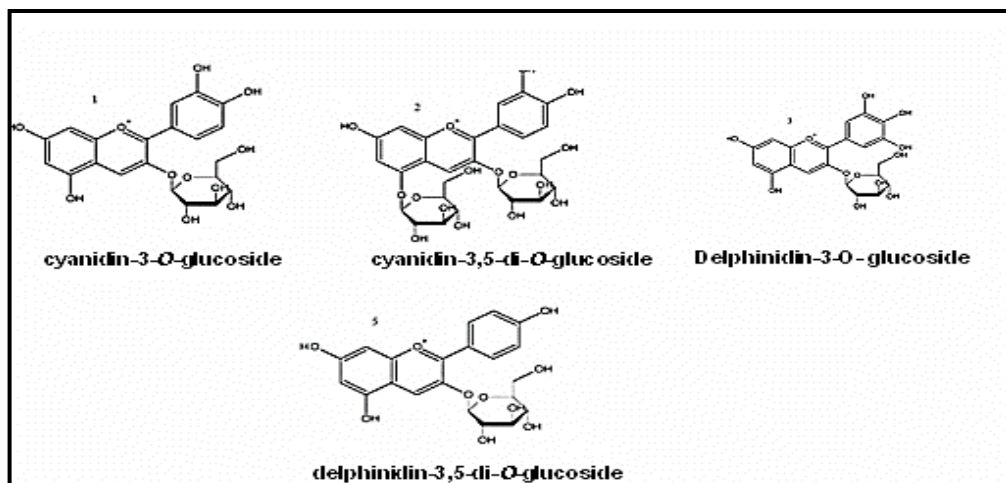


Figure 2.3 : Principaux anthocyanes présents dans la grenade [78].

2.3.1.3. Les tanins

Les tannins constituent un troisième groupe de polyphénols importants. Ils sont présents en forte dose dans la grenade et ce sont des composés de haut poids moléculaire, non azotés présentant des cycles aromatiques greffés d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou non [78]. Ils sont répartis en deux groupes chimiquement et biologiquement distincts : les tanins condensés ou proanthocyanindines et les tanins hydrolysables principalement composés de tannins galliques et ellagique.

L'écorce de grenade est riche en tanins hydrolysables (Figure 2.4), principalement la punicaline et la punicalagine. Ils diffèrent des tanins condensés dans leurs structures chimiques [53].

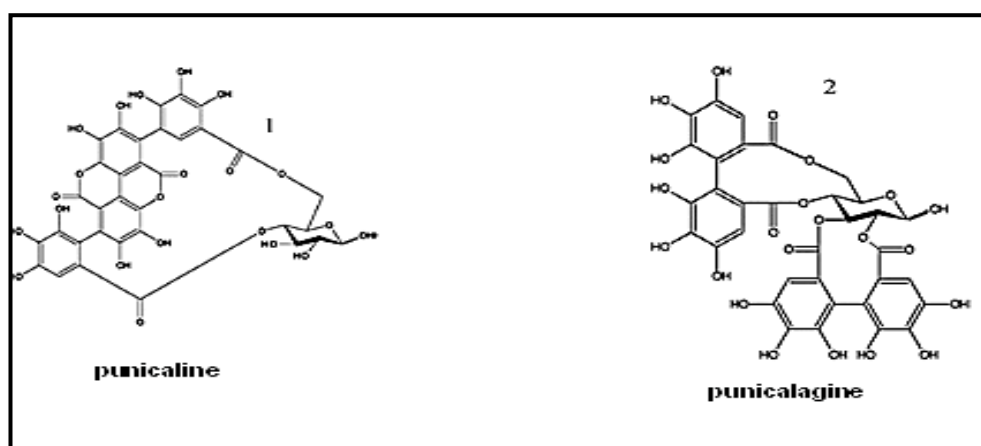


Figure 2.4 : Principaux tanins hydrolysables présents dans l'écorce de la grenade [73].

Les tanins galliques représentent moins de 0,01% dans l'écorce et moins de 2% dans le jus extrait des arilles seulement. Les tanins ellagiques se trouvent principalement dans l'écorce, avec environ 20 composants [7].

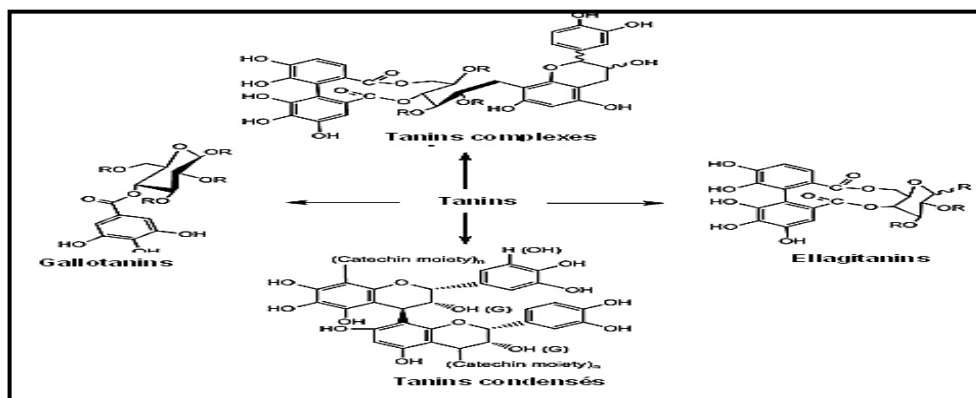


Figure 2.5 : Tanins condensés [67].

2.3.2. Pouvoir antioxydant

En plus de leurs fonctions nutritionnelles, la consommation des composés phénoliques a un effet bénéfique sur la santé humaine. Leur incorporation dans l'alimentation quotidienne permet de réduire le risque de maladies chroniques et d'améliorer les conditions physiologiques globales de l'organisme.

La détermination du pouvoir antioxydant des composants de grenade et de leurs dérivés revêt une importance accrue pour les chercheurs et les professionnels de l'industrie agro-alimentaire, qui les utiliseront comme additifs naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques, dont l'utilisation est de plus en plus restreinte en raison de leurs effets secondaires.

Menée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, l'activité antioxydante de la grenade a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques [76,79].

Comparé à d'autres jus, la grenade a une activité antioxydante trois fois plus élevée que celle du vin rouge ou du thé vert et à des niveaux de 2, 6 et 8 fois supérieurs à ceux trouvés dans le raisin, la canneberge, le pamplemousse et les jus d'orange, respectivement [13].

Ces composés sont connus par leurs propriétés d'inhiber les radicaux libres et l'oxydation des lipides [80,13].

Présentes en quantités importantes lors du métabolisme rédox cellulaire, ces radicaux libres ou Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) induisent un stress oxydatif qui peut être à l'origine de nombreuses maladies. Leur piégeage n'est réalisé que par la présence de substances inhibant leur oxydation, les antioxydants.

La capacité antioxydante des composés phénoliques de la grenade est liée aux isomères de punicalagine, les dérivés de l'acide ellagique et les anthocyanes (delphinidine, cyanidine et 3-glucosides de pélagonidine et 3,5-diglucosides). Elle ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production d'ERO [72].

La punicalagine des écorces de grenades est l'un des principaux éléments phytochimiques contribuant à l'augmentation de la capacité antioxydante totale du jus de grenade, tandis que les anthocyanines ne jouent qu'un rôle mineur dans cette activité [61].

Dans les aliments, cette capacité antioxydante des composants de la grenade et de leurs dérivés peut être utilisée en tant qu'additifs naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques, dont l'utilisation est de plus en plus limitée du fait des effets secondaires qu'ils peuvent produire

Ces propriétés antioxydantes de la grenade dépendent de plusieurs facteurs, tels que la variété, les conditions climatiques lors de la maturation et de la partie du fruit utilisée [72].

2.4. Utilisations

2.4.1. Propriétés pharmacologiques et impact sur la santé

Depuis des millénaires, le grenadier, *Punica granatum L.*, ses fruits, ses graines ainsi que son écorce, sont utilisés pour ses propriétés médicinales dans plusieurs régions dont il est originaire.

Depuis son apparition dans la pharmacopée française en 1818, la grenade avait comme premier usage un effet vermifuge ou agent taénicide [14] pour soigner les affections parasitaires. La deuxième propriété majeure des écorces de grenade exploitées dans la médecine populaire est leur forte astringence, qui en a fait un remède populaire sous la forme d'une décoction (en faisant bouillir les écorces dans l'eau pendant 10 à 40 minutes), pour traiter la dysenterie, la diarrhée, les aphtes, l'hygiène buccale [81]. La décoction peut être utilisée comme bain de bouche.

En médecine traditionnelle, elle a été utilisée pour traiter plusieurs maladies. Les graines et les écorces de fruits pour traiter la diarrhée, pour arrêter les saignements, guérir les ulcères [82], contrôler l'inflammation et traiter les troubles du système digestif et les maladies gastro-intestinales [83]. La décoction d'écorce de

grenade est très efficace par voie orale et intravaginale pour prévenir la fertilité et l'avortement et pour améliorer divers problèmes [65].

Riche en tanins, le fruit de grenade est également utilisé en médecine traditionnelle en raison de son activité antibactérienne.

En plus de ses utilisations traditionnelles historiques, la grenade et ses différentes parties ont été utilisées comme médicament dans le domaine pharmaceutique pour traiter plusieurs pathologies. Celles-ci peuvent agir comme antioxydants [84], comme agents anti-tumoraux [85] ou anti-hépatotoxiques [86] et améliorent la santé cardiovasculaire [87]. Des propriétés antimicrobiennes [88], antivirale [89], anti-inflammatoires [90] et antidiabétiques [92] ont été aussi découvertes ainsi que celles de la protection des affections dentaires, de la prévention de la maladie d'Alzheimer [81], de l'infertilité chez l'homme, de l'arthrite et de l'obésité [65].

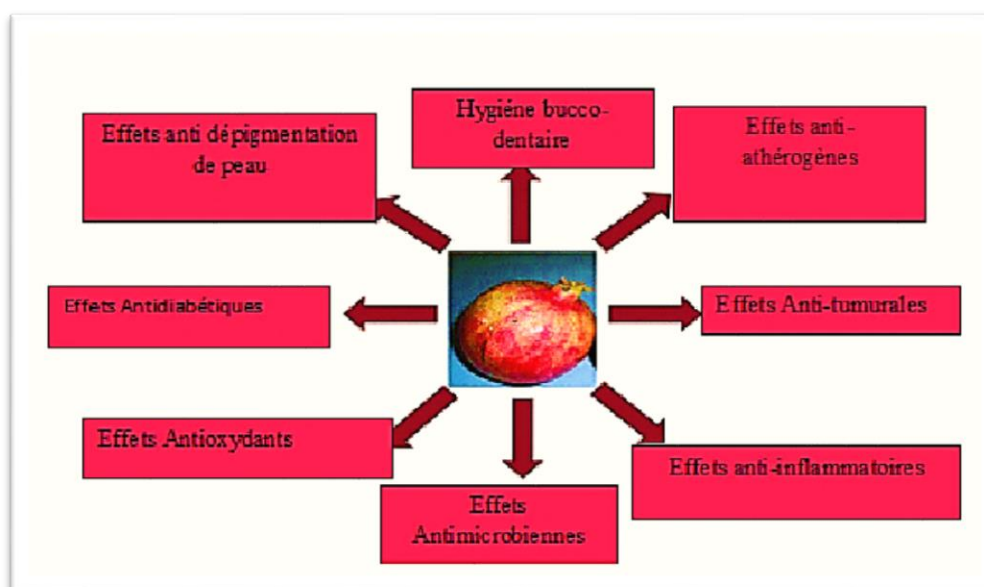


Figure 2.6 : Principaux effets fonctionnels et médicinaux de la grenade [12].

2.4.2. Utilisation alimentaire

Le fruit de grenade est savouré fraîche, et également consommé sous forme de jus qui est la base pour certaines limonades. Etant sucré, le jus de grenade est largement fabriqué en sirop de grenadine et est utilisé dans les boissons mélangées, cocktails. En Arabie saoudite, les sacs de jus peuvent être gelés intacts ou concentrés et congelés pour une utilisation future. Le jus peut être transformé en gelées par addition de pectine et de sucre.

Le jus concentré est utilisé pour les desserts et pour la marinade pour attendrir la viande en raison de la protéolyse de ses enzymes. Les arilles séchés de grenade

sont utilisées dans diverses cuisines telles que garnitures pour glaces, yaourts et salades.

Cependant, la grenade génère de grandes quantités de résidus suite aux procédés de transformation de jus et qui restent des dérivés non comestibles, composés principalement de produits biodégradables. Ce sont des sources précieuses de composés phytochimiques bioactifs qui peuvent avoir un grand potentiel grâce à un processus appropriés et les convertir en produits à forte valeur ajoutée.

Ils pourraient être utilisés comme substrat pour la production de composés à valeur nutritionnelle et biologiquement active qui pourraient trouver plusieurs applications comme aliments fonctionnels, additifs alimentaires et nutraceutiques. L'addition de l'extrait d'écorce de grenade à la viande de poulet a montré une augmentation de la durée de sa conservation de deux à trois semaines pendant un stockage à froid. Ce phénomène est due à l'activité antimicrobienne contre les *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereu effics* et *Pseudomonas* et inhibition de la rancidité oxydative par la capacité antioxydante très efficace [88]. Il peut être employé comme agent conservateur pour l'industrie alimentaire. Il inhibe significativement l'oxydation de lipides dans les pâtés cuits de viande de poulet plus que le BHT (butyl-hydroxy-toluène) pendant le stockage réfrigéré (4°C /15jours) sans affecter le goût. Son activité antioxydante est très efficace en inhibant la rancidité oxydative des produits de poulet [89].

Une autre étude montre que la poudre de pépins de grenade aurait eu le même effet que ceux de l'extrait de l'écorce sur les pâtés de viande de chèvre pendant le stockage réfrigéré (à 4°C pendant 12 jours) [91].

2.4.3.1. Propriétés anti-tumorales

La richesse de la grenade en antioxydants lui confère une forte activité anticancéreuse, en particulier contre le cancer de la prostate, du sein et du colon. [66]. Il s'est avéré une diminution significative (35%) du taux sérique de PSA (Prostate Specific Antigen) durant le traitement avec du jus de grenade portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate en phase II [92].

Le jus, l'extrait aqueux de l'écorce de grenade ainsi que l'huile de pépin extraite à froid ont aussi une action inhibitrice sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein chez l'être humain [85].

Le jus de grenade et ses constituants pourraient constituer un traitement prometteur contre le cancer de la prostate. Etant fermenté, le jus de grenade retarde

l'oxydation et la synthèse des prostaglandines, inhibe la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses du sein et favorise l'apoptose des cellules cancéreuses du sein.

2.4.3.2. Activité anti-ulcèreuse

De nos jours, l'ulcère gastrique est l'une des préoccupations les plus importantes en raison de nombreux facteurs particulièrement répandus dans l'utilisation des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont des agents potentiellement nocifs, capables d'abimer la paroi de l'estomac [80].

MOGHADDAM et al [82] ont évalué l'effet anti-ulcère de l'extrait méthanolique obtenu à partir de l'écorce de *grenade* par voie extra-cutanée dans les ulcères gastriques induits par l'indométhacine chez le rat. Il réduit un ulcère induit par l'aspirine et l'éthanol par diminution des sécrétions acides gastriques et ainsi augmenter le pH. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydro-alcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol.

2.4.3.3. Activité Anti-inflammatoire

Le processus inflammatoire est déclenché par plusieurs aspects chimiques et/ou biologiques comprenant des enzymes et des cytokines pro-inflammatoires, des composés de faible poids moléculaire tels que les eicosanoïdes ou la dégradation enzymatique des tissus [94]. De nombreuses études ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de la grenade [73].

YOGANANDAM ET SUCHARITA et al [93] ont évalué l'efficacité de divers extraits (eau, éthanol, méthanol et acétate d'éthyle) d'écorce de fruit de *Punica granatum*. Les résultats des extraits méthanolique, éthyliques et d'acetate ont montré une meilleure activité que les deux autres extraits dus à une meilleure richesse en composés phénoliques.

Les extraits éthanoliques d'écorce et de pépins de *Punica granatum* ont montré aussi un effet positif sur l'inflammation induite par la carragénine de patte de rats [96].

Punica granatum L. possède une activité analgésique et anti-inflammatoire, les composantes phénoliques de son jus pourraient également supprimer synergiquement l'expression des cytokines inflammatoires.

2.4.3.4. Activité antidiabétique

Une étude de BANIHANI et al [94] a montré que l'extrait de l'écorce de grenade possède une activité importante de réduction du taux de sucre dans le sang par

l'évaluation du nombre de cellules bêta sur des rats diabétiques. Le traitement a révélé que l'extrait aqueux de grenade diminuait de manière significative la glycémie et augmentait les taux d'insuline chez les rats normaux et diabétiques. Le pancréas présentait un nombre accru de cellules bêta chez les rats diabétiques normaux et traités.

D'autres auteurs tels que RADHIKA et al [95] avaient attribué cette action à l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose chez le rat. Par conséquent, l'extrait aqueux de l'écorce de grenade peut réduire le sucre dans le sang par régénération des cellules bêta.

2.4.3.5. Anti-diarrhéique

Selon une étude de QNAIS et al [96], des extraits aqueux d'écorce de grenade chez 3 modèles expérimentaux utilisant des rats albinos ont montré une activité anti diarrhéique significative induite par l'huile de ricin chez le rat par rapport au chlorhydrate de loperamide, un médicament antidiarrhéique standard.

Les résultats ont montré que cet extrait diminuait le nombre de défécations et le poids des matières fécales par rapport au témoin.

2.4.3.3. Activité antimicrobienne et antivirale

Des extraits aqueux, éthanoliques et butanoliques de grenade ont révélé une activité antimicrobienne contre *Echerichia. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) [97]. D'autre part, des extraits méthanoliques étaient actifs contre *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhi*.

AL-ZOREKY et al [98] ont également signalé que les extraits de fruits de *Punica granatum L.* avaient une forte activité antibactérienne in vitro contre de nombreuses souches bactériennes testées, notamment *E.coli*, *S.aureus*, *Enterobacter spp.* *Bacillus spp.* Et *Micrococcus spp.*

Une activité synergique a été détectée entre l'extrait méthanolique de grenade et 5 antibiotiques, testés : chloramphénicol, la gentamicine, l'ampicilline, la tétracycline et l'oxacilline contre 30 isolats cliniques de *S. aureus* résistant à la méthicilline [99].

En revanche, et par la présence de nombreux composés antioxydants, la grenade a montré une action antivirale contre de nombreux virus : virus de la grippe, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de l'herpès simplex (HSV) et adénovirus dans plusieurs études [100]. Parmi ces constituants dans l'extrait de

grenade (acide ellagique, acide caféique, lutéoline et punicalagine), la punicalagine était celle qui affectait le plus le virus de l'influenza A en inhibant la réplication de l'ARN viral et en agglutinant les globules rouges du poulet [88].

2.5. Toxicité et précaution d'emplois

Bien que la grenade soit considérée comme étant sans danger, les extraits d'autres parties ou même la peau peuvent avoir des effets toxiques s'ils sont pris à fortes doses. Cependant, il reste encore beaucoup à explorer dans ce domaine.

ROUHANI et al [101] ont signalé qu'en raison de la présence de tanins et d'alcaloïdes, la décoction de certains péricarpes de fruits peut provoquer une inflammation gastrique ou s'avérer fatale. Au même titre que l'extrait de peau de mangoustan, celui des écorces de grenade présentaient une toxicité modérée pour les cellules Caco-2 et une toxicité élevée pour les cellules mononuclées du sang périphérique, mais dans une moindre mesure.

Les tannins, en particulier l'acide tannique, se trouvent dans la grenade. Ils participent à la saveur et sont intéressants à plusieurs titres. Néanmoins, il a été montré récemment que l'acide tannique formait avec la vitamine B 12 un précipité insoluble, entraîné par la digestion (chez le rat) qui peut induire une anémie [102].

2.7. Conclusion du chapitre 2

La consommation de la grenade constitue une source d'un intérêt de bien-être /santé. Son aspect nutritionnel est lié à sa richesse en vitamines, minéraux et polyphénols. Différents groupes de ces polyphénols sont présents dans les fruits de grenades et de ses sous-produits. Ces derniers constituent une véritable usine chimique, dont il faut tirer le maximum de profit.

Ses résidus, après transformation, sont susceptibles aussi, par leurs composition nutritionnelle et thérapeutique, de servir d'agent protecteurs et inhibiteurs de radicaux libres tout en préservant l'environnement. Ils ont diverses applications dans les domaines de l'alimentaire, de la pharmaceutique et de la nutraceutique

Chercher une voie de valorisation de ces sous-produits pour les utiliser comme source de molécules d'intérêt, nécessite à extraire leurs composés phénoliques et l'essai de choix d'une méthode standardisé.

CHAPITRE 3
EXTRACTION, METHODES D'ANALYSE ET DE
QUANTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES

CHAPITRE 3
EXTRACTION, METHODES D'ANALYSE ET DE
QUANTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES

3.1. Introduction

La détermination des composés phénoliques dans les fruits et légumes a été d'un grand intérêt ces dernières années. Différentes méthodes sont utilisées pour préparer et / ou traiter des échantillons afin de déterminer leurs contenus en ces composés.

L'extraction solide liquide est l'une des approches les plus durables pour leur isolement, leur caractérisation et leur évaluation. Afin de mieux appréhender l'intérêt de la production d'extraits de fruit de grenade à haute valeur ajoutée, nous présenterons à la suite de cette partie d'étude différentes techniques d'extraction par solvants organiques et d'autres innovantes d'une part, d'autre part des méthodes de quantification et d'optimisation de composés phénoliques sont aussi traités. Ils

3.1.1. Extraction conventionnelle

Les techniques d'extraction conventionnelles les plus courantes sont basées sur la puissance d'extraction de différents solvants utilisés et l'application de la chaleur et / ou de mélange [103].

La macération est la plus simple méthode d'extraction solide – liquide. Elle est connue comme l'une des méthodes traditionnelles qui a été couramment employée dans le cas de molécules fragiles [104]. Elle consiste à laisser séjourner, à froid, dans un solvant organique une substance végétale pour en extraire les constituants solubles, sachant que les molécules actives sont sensibles aux changements de température. Cette méthode est peu coûteuse, se déroulant à température ambiante, avec un temps long d'extraction et une quantité plus ou moins grande de solvant.

La décoction est une autre méthode d'extraction qui utilise le même principe que la macération sauf que la dissolution se fait dans l'eau bouillante pendant une plus courte durée. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, aux plantes qui supportent bien les hautes températures [105].

La dernière méthode d'extraction traditionnelle est celle par Soxhlet. C'est une méthode classique employée pour l'obtention de meilleurs rendements d'extraction des polyphénols [106]. C'est la méthode la plus courante pour l'extraction de composés organiques solides.

Dans une pièce spécialisée de verrerie (réfrigérant), la matière végétale est placée dans une cartouche et remplie de solvant frais qui passe dans le lit de solide et retombe ensuite dans le ballon où a lieu la séparation du corps dissous et du solvant par distillation. Elle ne nécessite pas de filtration après extraction [107].

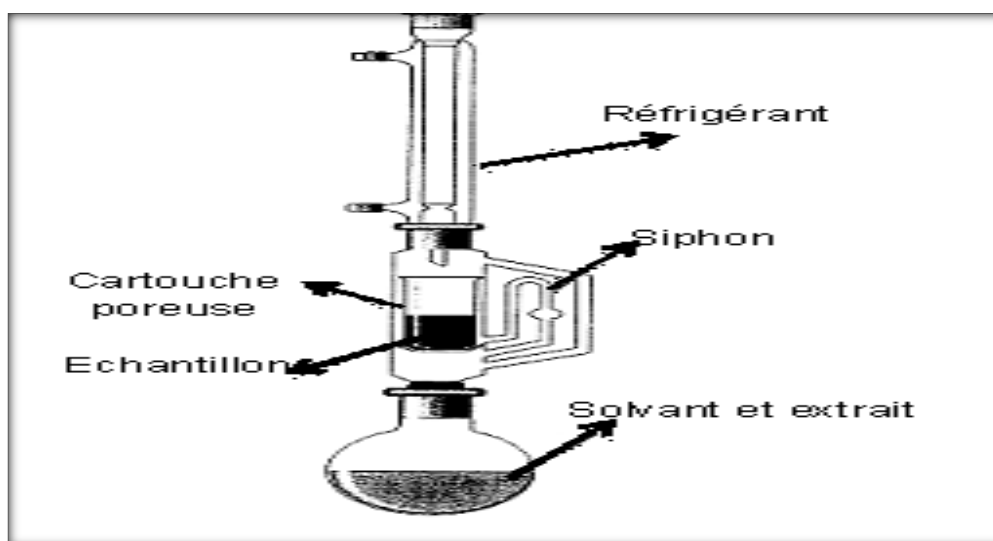


Figure 3.1 : Schéma d'un Soxhlet [107].

Par comparaison aux autres techniques conventionnelles, les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, sont : la longue durée d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais qui pose aussi des problèmes sur le plan environnemental [108].

L'efficacité d'extraction de chacune de ces méthodes conventionnelles dépend principalement du choix des solvants [109]. Des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et leurs combinaisons ont été utilisées pour l'extraction de polyphénols, avec ou sans eau [110].

En effet, des mélanges de solvants organiques avec l'eau ont démontré une plus grande richesse à la diversité phénolique des extraits qu'un seul solvant utilisé à l'état absolu [111].

En raison des problèmes liés aux procédures d'extraction classiques, les spécialistes du domaine de l'extraction se sont assistés par de nouvelles méthodes avec des techniques d'extraction modernes et plus prometteuses [112].

3.1.2. Techniques d'extraction moderne

Afin de disposer d'autres méthodes d'extractions, plusieurs techniques nouvelles ont été développées. Ces techniques nécessitent moins d'énergie et moins de solvant en produisant un rendement plus élevé. La figure 3.2 présente différentes méthodes d'extraction modernes :

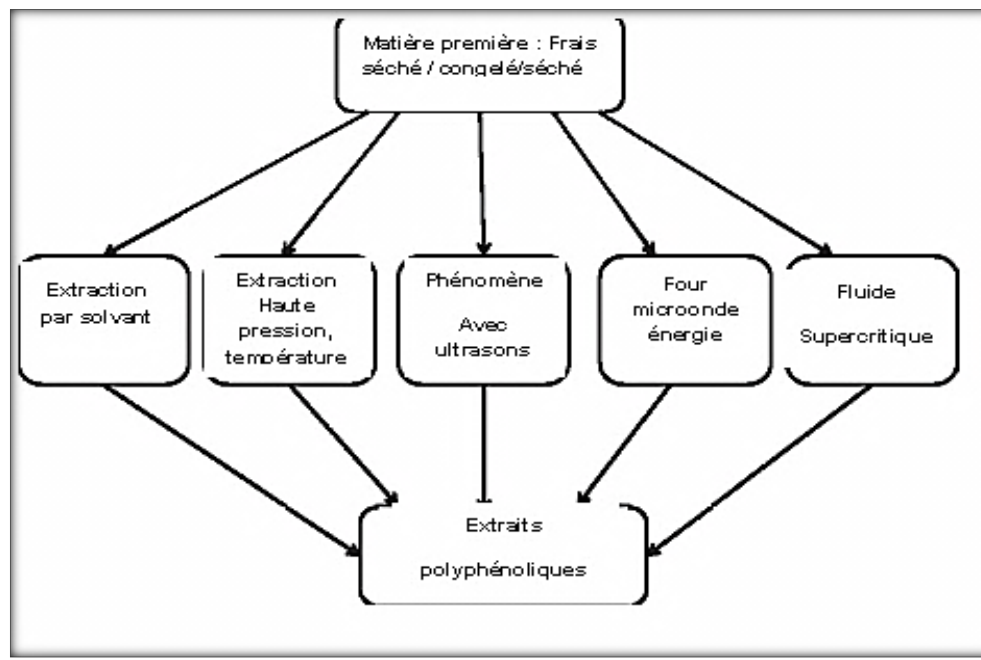


Figure 3.2 : Schéma représentative de différentes méthodes d'extraction modernes [113].

3.1.2.1. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons ou extraction par ultrasons est une méthode qui utilise des vibrations ultrasonores (20 kHz -2000 KHz) [113]. L'effet mécanique de la cavitation acoustique des ultrasons augmente le contact de surface entre les solvants, les échantillons et la perméabilité des parois cellulaires dans un bain à ultrasons. Ils facilitent la libération des composés et améliorent le transport de masse des solvants dans les cellules végétales [114]. Cette méthode est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie [115].

Le bac ou la sonde à ultrasons sont les deux types d'équipements couramment utilisés pour l'extraction phytochimique à petite et à grande échelle (figure3.4.). L'extraction par ultrasons est principalement basée sur une propagation des ondes sonores qui vont générer des cycles successifs de haute pression (compression) et de basse pression (raréfaction) [116].

L'augmentation du rendement d'extraction, l'accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique et la non destruction des composés à partir des températures basses constituent les principaux avantages de cette méthode [117].

Comparés aux méthodes conventionnelles, cette méthode utilise différents solvants sauf qu'ils sont non renouvelés pendant le processus.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, cette méthode est l'une des technologies émergentes qui ont été mises au point pour traiter, maximiser la qualité et assurer la sécurité des produits alimentaires.

3.1.2.2. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée est une nouvelle technique, où l'énergie de micro-ondes est utilisée pour favoriser la solubilisation de l'échantillon et accélérer l'extraction par la rupture de cellules suivie d'une augmentation de température (100-150°C) et de pression interne dans les parois des cellules végétales.

Etant plus rapide utilisant moins un temps d'extraction réduit, cette méthode est peu consommatrice de solvant, et moins coûteuse [118,119]. Cependant, l'élévation de la température pose problème dans l'extraction des antioxydants Ceci pousse à sélectionner les solvants appropriés en fonction de leurs points d'ébullition, de leur dissipation et de leurs propriétés diélectriques [120]. Les solvants polaires ont peuvent absorber plus d'énergie micro-ondes que les solvants non polaires, ce qui peut entraîner une augmentation de rendement en composés phénoliques.

3.2. Optimisation et modélisation de l'extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction solide liquide était la première étape fondamentale pour isoler les composés phénoliques de la grenade et ses co- produits.

Lors de l'extraction des composés phénoliques, beaucoup de paramètres opératoires peuvent influencer l'efficacité de leurs extraction en ayant un impact soit positif ou négatif tel que le temps, la température, le solvant, le ratio liquide solide, l'agitation, la taille des particules ainsi que leurs interaction avec la matrice végétale [121, 122].

Traditionnellement, les essais sont effectuées de manière séquentielle en faisant varier les facteurs l'un après l'autre sans planification préalable de l'ensemble des essais à réaliser. Cependant, et suite à la complexité du phénomène de l'effet de

la réponse du paramétré choisi, l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique accorde une grande importance aux résultats de cette expérience dépendant d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement.

En outre, le choix d'une méthode de conception expérimentale dites plan d'expérience visant une meilleure organisation des essais expérimentaux avec un meilleur temps et moins de coût est nécessaire [123]. C'est pourquoi le recours à un outil sous forme de modélisation mathématique est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche.

3.2.1. Plans d'expériences

La méthode de plans d'expériences est un outil qui permet de sélectionner et d'ordonner les essais afin d'identifier, à moindres coûts, les effets des paramètres sur la réponse du produit. Il s'agit de méthodes statistiques faisant appel à des notions mathématiques simples. L'objectif principal de cette méthode est d'obtenir un maximum d'informations en un minimum d'expérience", et d'identifier les facteurs influençant et de déterminer ceux d'optimisation. La méthode de surface de réponse est l'une des procédés de conception d'expériences utiles pour optimiser les systèmes non linéaires.

Elle s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées. Le domaine est délimité par les niveaux supérieurs et inférieurs de chaque facteur.

Les variables dans les plans d'expériences centrées sur 0 et elles sont réduites à l'intervalle $[-1, +1]$ (figure 3.3). La variation de l'influence d'un facteur est limitée entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut. On désigne le niveau bas par le signe (-1) et le niveau haut par le signe (+1) [124].

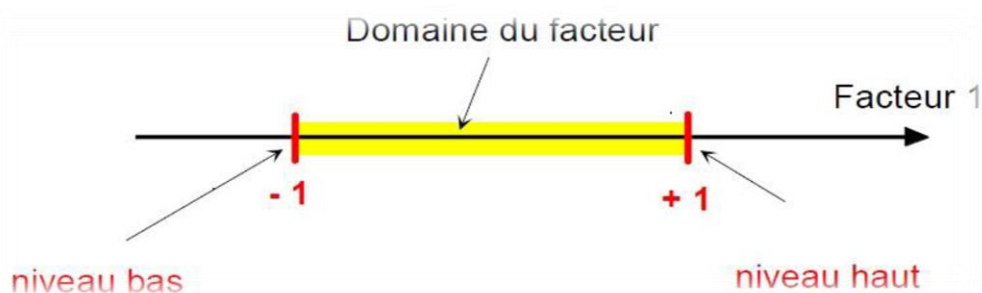


Figure 3.3 : Domaine de facteur limité par le niveau bas et le niveau haut [124].

3.2.2. Choix d'un modèle Mathématique du plan d'expérience

A partir du moment où l'objectif des plans d'expériences est la recherche du lien qui existe entre la réponse "y" et le facteur « x_i », un modèle mathématique est mis en exergue pour comprendre la fonction [125] :

$$Y = f(x_i)$$

Dans cette notion de modèle mathématique, on choisit à priori une fonction mathématique qui relie la réponse (Y) aux facteurs (Xi) et leurs interactions :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{iix} x_i^2 + e$$

Où

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.

x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue.

$a_0, a_i, a_{ij}, a_{iix}$ sont les coefficients du polynôme. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

Une fois les facteurs clairement identifiés et la réponse connue, un plan d'expérience est proposé.

Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égale à deux). Il existe trois grandes familles de plans d'expériences : plans de mélange, plans de criblage et plans de modélisation ou surfaces de réponses.

3.2.3. Méthodologie de surface de réponse

La méthode des surfaces de réponse "RSM" vise à déterminer de façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs significatives [163] et n'utilise que les facteurs précédemment jugés influant.

L'obtention du modèle mathématique peut être une fonction polynomiale du premier degré (plan factoriels complets, plans factoriels incomplets ...) ou du second degré (plans composites centrés, par exemples). A chaque point du domaine expérimental correspond une réponse et à l'ensemble des points, correspondent un ensemble de réponse qui se place sur une surface de réponse qui est représentée par un relief géographique :

- Dans le cas d'absence d'interaction entre les facteurs, une surface plane plus ou moins pointue si le modèle linéaire est représentée.

- Dans le cas de présence d'interaction entre les facteurs, avec un modèle quadratique (du second degré), un « sommet » ou une « crevasse » en « 3 dimensions » permettant de localiser un optimum, maximum ou minimum est présenté.

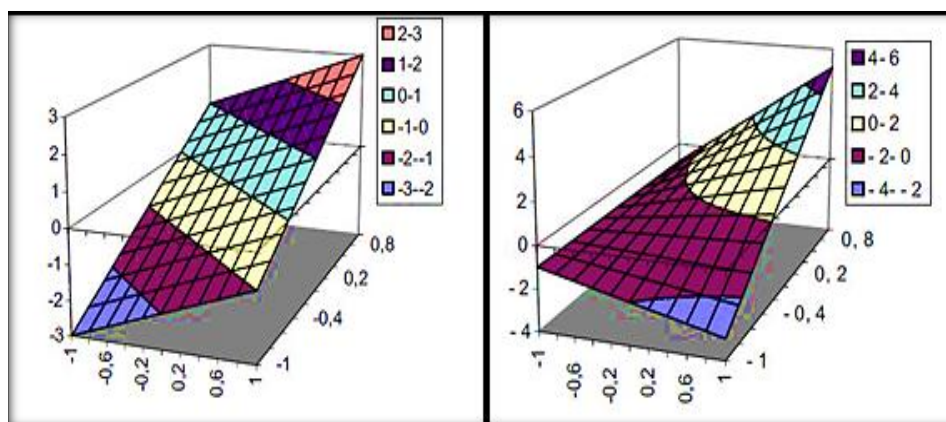


Figure 3.4 : Représentation en trois dimensions d'une surface de réponse avec ou sans interaction entre les facteurs [123].

Le modèle plan d'expérience doit être validé statistiquement avant d'être utilisé. La principale méthode répondant à cet objectif est l'analyse de la variance.

C'est une technique statistique permettant de savoir si une ou plusieurs variables dépendantes (variables à expliquer) sont en relation avec une ou plusieurs variables dites indépendantes (variables explicatives).

L'analyse de la variance permet de calculer aussi une statistique très utile nommé coefficient de détermination : R^2 [126]. Ce coefficient exprime le rapport de la somme des carrés des réponses calculées à la somme des carrés des réponses mesurées.

Tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées, les plans de Box-Behnken sont de mise en œuvre.

Les plans de Box-Behnken pour 3 facteurs contiennent 12 essais plus 3 essais au centre du domaine d'étude (qui serviront au calcul de l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement), ce qui fait 15 essais au total.

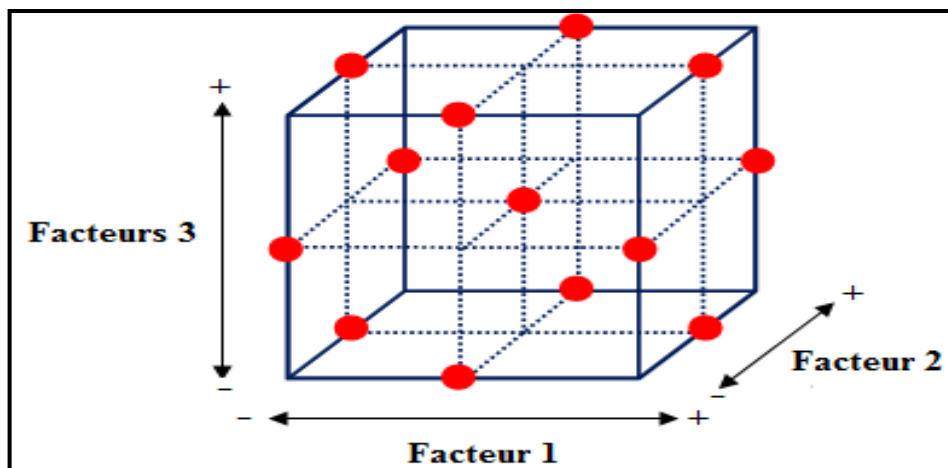


Figure 3.5 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs [127].

Ce modèle comporte 10 coefficients, il faut donc au minimum 10 équations pour les estimer. Le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs comporte 13 équations indépendantes, il existe une solution mathématique à ce problème [125].

3.3. Quantification des composés phénoliques

Ces dernières années, des méthodes se sont développées pour la quantification selon le type de groupe phénolique. Plusieurs d'entre elles sont spectrophotométriques, développées pour la quantification des composés phénoliques. D'autres sont plus précis et plus fiables, les méthodes chromatographiques qui sont utilisées pour la séparation et l'identification des composés chimiques. Cette quantification dépend principalement de différents paramètres, tels que la nature chimique des composés, la méthode d'extraction utilisée, la durée et les conditions de stockage, la taille des particules, la sélection des étalons, les substances interférentes, les impuretés et la méthode d'analyse [128].

3.3.1. Méthode spectrophotométrique

La méthode de Folin-Ciocalteu a été la méthode de dosages spectrophotométrie la plus largement utilisée depuis plusieurs années [129]. Elle est basée sur une réduction chimique impliquant du réactif contenant du tungstène et du molybdène. En présence de composés phénoliques, les produits de cette réduction prennent une couleur bleue avec un large spectre d'absorption de la lumière autour de 760 nm.

Les réactifs de cette méthode ne réagissent pas spécifiquement avec les phénols seulement mais aussi avec d'autres substances comme l'acide ascorbique, les amines aromatiques et les sucres, ce qui constitue un inconvénient pour cette

méthode. Cependant, cette méthode reste simple et reproductible et a été largement utilisée pour la quantification des composés phénoliques dans les extraits de la grenade.

La quantification phénolique totale et les flavonoïdes totaux sont estimés par cette méthode colorimétrique. Les extraits méthanoliques ou éthanoliques des polyphénols des extraits mélangés au trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ permettent la mesure des flavonoïdes totaux à une longueur d'onde de 410-423 nm [130]. La catéchine, la quercétine et la rutine sont généralement utilisées en qualité de standard selon le composé à doser.

Par cette technique, les tanins Hydrolysable sont aussi évalués à l'aide de la méthode de l'iodate de potassium, de la rhodanine et du nitrite de sodium [131]. Entre elles, la méthode à l'iodate de potassium est la méthode la plus populaire pour le criblage des échantillons. Une couleur rouge avec une absorbance maximale de 500-550 nm apparaît en raison de la réaction du gallate de méthyle et de l'iodate de potassium [132].

Le dosage de vanilline est utilisé pour déterminer le niveau des tanins condensés [133]. Cette méthode peut fournir des informations sur le degré de polymérisation et le profil d'hydroxylation et la stéréochimie des sous-unités flavan-3-ol. La catéchine est généralement utilisée comme standard dans la méthode à la vanilline.

Les anthocyanes constituent une autre classe principale de composés phénoliques mesurés par spectrophotométrie. Elle est basée sur la mesure de l'absorption à une longueur d'onde comprise entre 490 nm et 550 nm. Dans cette méthode, l'absorption de l'échantillon est mesurée à un pH 1 (anthocyanes sous forme de sels d'oxonium colorés) ainsi qu'à pH 4,5 (anthocyanes sous forme d'hémicétals incolores) Le calcul de la concentration d'anthocyanine monomère est habituellement basé sur le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de l'anthocyanine principale de l'échantillon ou Cyanidine-3-glucoside, l'anthocyanine le plus commun dans la nature [134].

3.3.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Des techniques telles que la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne a été largement utilisée pour l'identification et la purification de composés phénoliques.

De nos jours, la technique de Chromatographie liquide haute performance "HPLC" est la plus utilisée pour la séparation et la quantification de nombreux composés phénoliques [135]. Elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte. Différents supports et phases mobiles sont disponibles pour l'analyse des différents composés phénoliques, y compris les anthocyanines, les proanthocyanidines, les tanins hydrolysables, les flavonols, les flavan-3-ols, les flavanones, les flavones et les acides phénoliques dans différents extraits de plantes et des échantillons alimentaires [136].

En outre, l'HPLC est une technique utilisée généralement en phase inverse et comporte trois points essentiels : les caractéristiques de la colonne pour le diamètre intérieur de la colonne compris entre 1,5 et 4,5 mm et sa longueur comprise entre 3 et 30 cm. Le débit de la phase mobile peut être compris entre 0,2 et 2,5 ml / min.

L'acétonitrile et le méthanol, ou leurs formes aqueuses, sont les phases mobiles dominantes utilisées pour la quantification des composés phénoliques par HPLC. Les phases mobiles aqueuses acidifiées contiennent principalement de l'acide acétique. Néanmoins, d'autres acides comme l'acide formique et phosphorique à faible pH sont également réutilisés.

La colonne est un autre facteur critique dans l'identification des composés phénoliques. Elle est basée sur la polarité, la plus utilisée est une phase normale C18 ou inversée (RP-C18) de 10-30 cm de longueur, 3,9-4,6 mm ID et une taille de particules de 3 à 10 μm [138].

Les dosages par HPLC des composés phénoliques sont effectués à la température ambiante de la colonne. Le temps d'exécution est un autre facteur qui influence la détection des composés phénoliques et peut varier de 10 à 150 min.

3.3. Détermination de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés capables de retarder ou d'inhiber le processus d'oxydation qui se produit sous l'influence des espèces réactives d'oxygène. Ils sont utilisés pour la stabilisation de produits alimentaires.

Ces dernières années, l'utilisation d'antioxydants extraits alimentaires de sources naturelles plutôt qu'artificielles, a augmenté en raison de plusieurs facteurs, influant la santé. En outre, une attention supplémentaire est accordée à la classification de ces composés naturels ainsi qu'à leur utilisation en tant qu'antioxydants efficaces dans les aliments [9,13].

Plusieurs méthodes reposant sur des principes analytiques sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage des différents espèces réactives de l'oxygène telles que DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et ABTS (2,2'azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) évaluent le pouvoir réducteur antioxydant en fonction du transfert d'électrons et / ou de protons entre espèces électro actives [137,138].

3.4. Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, l'état de connaissance nous a permis de donner le principe général des méthodes d'extraction solide-liquide des composés phénoliques. Un large éventail a été donné à ses méthodes conventionnelles provoquant une dégradation des molécules et un temps d'extraction long ou température élevée.

Pour une amélioration de l'extraction, d'autres moyens innovants, comme ceux par ultrason et micro-onde, ont été décrits. Par la suite et en vue d'optimiser l'extraction de ces molécules bioactives et permettant d'atteindre des rendements élevés, une méthodologie des plans d'expériences basée sur la méthode des surfaces de réponse a été décrite. Cette étude a tenu compte des méthodes spectrophotométries et chromatographiques pour la quantification et l'identification des composés phénoliques.

3.5. Conclusion de la partie bibliographique

Le principal intérêt de *Punica granatum* L dans la littérature porte principalement sur ses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. Cependant, cette revue bibliographique met aussi l'accent sur la variabilité des variétés de l'unique espèce, de la composition et des propriétés fonctionnelles de la grenade. L'extraction de ses composés phénoliques est une voie de valorisation de ces dérivés qui conduit d'une part à développer de nouvelles activités économiques rentables en préservant l'environnement et de développer une filière de grenade tend oubliée.

PARTIE 2

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES

4.1. Introduction

Aujourd'hui, les propriétés médicinales de la grenade ont suscité l'intérêt de chercheurs de nombreux pays. Riche en plusieurs nutriments, la grenade est une source de minéraux, vitamines et de polyphénols. Elle représente un extraordinaire réservoir de principes actifs qui sont toujours présents dans plusieurs prescriptions de la médecine moderne.

Une meilleure connaissance de la phytochimie et de l'ethnopharmacologie de ce fruit et ses résidus constitue une source d'information nécessaire pour notre étude expérimentale.

Au niveau de la plaine de la Mitidja, l'arboriculture fruitière constitue l'activité agricole dominante, elle détient 55 % de la surface agricole [139]. Par ailleurs, les filières fruitières connaissent un regain d'intérêt particulier à l'ombre des politiques de développement de l'agriculture mis en œuvre ces dernières années.

Une pré-enquête de prospection a été réalisée au niveau de la région de la Mitidja pour la récolte d'informations sur l'utilisation du fruit de la grenade en médecine traditionnelle en particulier des wilayas d'Alger et de Blida.

En Algérie, la totalité de la production de la grenade est consommée fraîche, par absence d'une transformation industrielle. Sa consommation et /ou sa transformation nécessite une sélection de meilleurs cultivars avec graines acidulées et juteuses pour la consommation fraîche, fruits à fort calibre et écorce lisse et rougeâtre brillante pour la commercialisation et des graines acides et pépins plus ou moins durs pour la transformation industrielle.

En raison de la demande du marché, il est devenu de plus en plus important de caractériser quelques cultivars algériens et d'identifier ceux qui sont meilleur qualité alimentaire et bon marché.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à dévoiler les caractéristiques morphologiques et physicochimiques de certains cultivars sélectionnés. Une analyse phytochimique des jus et des extraits des sous-produits de grenades locales a été réalisée.

Ce travail a été complété par Une étude comparée de méthodes d'extraction conventionnelle par rapport à la méthode alternative des écorces de grenades ainsi que leur optimisation par méthode de plan d'expériences.

La partie expérimentale de notre présente étude décrit les techniques utilisées pour la préparation des extraits des différents dérivés de fruit de grenade, ainsi que les méthodes de caractérisation morphologiques et physicochimiques des

fruits des écorces, des jus et des résidus de trois cultivars de grenade et de leur capacité antioxydante. Elle a été réalisée au niveau de plusieurs laboratoires :

- La caractérisation morphologique et physicochimique et biochimique a été réalisée au niveau du laboratoire Agroalimentaire et analyse du sol de l'Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne (ITAFV) de Tessala El Mardja (Alger).

- L'extraction assistée par Ultrason a été réalisée au niveau du Laboratoire GRAPPE d'Anger (France).

- L'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du Laboratoire Hygiénique de Blida.

- L'étude in vivo de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée au niveau du Centre de Recherche et développement d'EL Harrach (SAIDAL).

- L'analyse des extraits par HPLC a été effectuée au Centre Recherche et d'Analyses physico-chimiques (CRAPC) de Bousmail.

4.2. Monographie de la zone d'étude

La Mitidja est une vaste plaine qui couvre une superficie de 1450Km², elle mesure environ 100 km de long sur 5 à 20 km de large. Elle est d'orientation Est – Nord, Est -Ouest, Sud-Ouest, située au centre de l'Algérie du Nord Administrativement, cette zone est répartie entre les wilayas d'Alger, Blida, Tipaza et Boumerdes et limitée par l'Atlas Blidéen au sud [139].

Vu l'étendue de la zone de la Mitidja, notre étude s'est limitée à un verger de la station Expérimental de Boufarik de l'Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne (ITAFV) située à 14 kilomètre au sud du chef - lieu de la wilaya de Blida. Son altitude moyenne varie de 50 à 100 mètres son longitude de 3° 03' mn Est et une latitude de : 36° et 34° mn Nord [140].

La pluviométrie moyenne annuelle est de 667 mm. Les températures moyennes présentent un maximum en juillet (37°C) et un minimum en janvier (11,5°C) [141]. La zone de Mitidja est à vocation arboricole par excellence.

4.2.1. Choix de lieu d'étude

Le choix du lieu d'étude a été fondé d'une part sur les critères agronomiques caractérisant l'arboriculture de la région et d'autre part, sur la présence de plusieurs cultivars de grenades avec une bonne qualité gustative.

Ces cultivars n'ont pas donné lieu à des recherches scientifiques auparavant. Le nom de chacune des cultivars a été déjà identifié par les ingénieurs de la station.

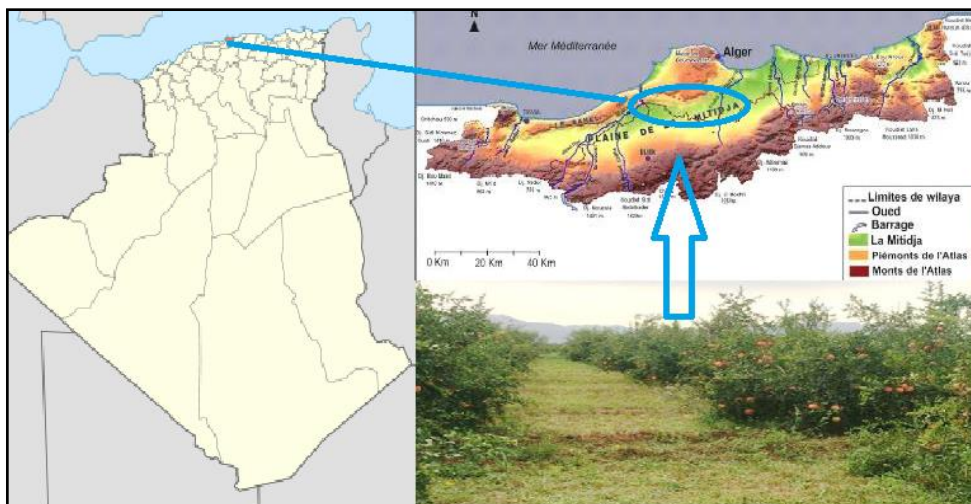


Figure 4.1 : Zone de prélèvement des échantillons de grenades

4.2.2. Localisation géographique

La Station Expérimentale de Boufarik est située dans la plaine de la Mitidja à l'extrémité Nord-Ouest d'un grand cône de déjection que les oueds Chemla (à l'Est) et Kremis (à l'Ouest) ont édifié dans la plaine de la Mitidja entre Soumaa et Boufarik [142].

Au niveau de cette station, des vergers ont été implantés en vue de conserver le patrimoine génétique arboricole à travers plusieurs collections variétales et clones, sans oublier l'aide donnée aux arboriculteurs en effectuant plusieurs essais.

Le verger du grenadier II a été implanté depuis Janvier 1998 sur une parcelle de 1500 m², avec 75 arbres de grenadiers sont plantés composés de 38 cultivars et clones (figure 4.1). Chaque cultivar était représenté par deux à trois plants. Aucune irrigation, herbicide ou fongicide n'a été appliquée sur la parcelle du verger.

4.2.3. Conditions pédoclimatiques

Les données climatiques de la zone d'étude nous ont été procurées au niveau de la Station Expérimentale de Boufarik de l'ITAFV. La pluviométrie, la température, les vents, l'hygrométrie, les gelées et la grêle forment l'ensemble des données climatiques de la zone d'étude.

4.2.3.1. Climat

Notre station d'étude est située dans la commune de Boufarik (Mitidja Ouest) dans la région de la Mitidja, elle est caractérisée par un climat à deux saisons : un été chaud et sec en été et un hiver froid et humide [140] avec :

- Une saison pluvieuse de Novembre - Février.
- Une saison sèche de Juin - Septembre.

- La pluviométrie inter- annuelle moyenne est de 667mm [139].

4.2.4.2. Températures

Sur une période de vingt-cinq ans (1990 à 2015), les relevés moyens mensuels des températures ont été enregistrés par la Station de Boufarik. La température minimale varie entre 11°C et 12°C respectivement pour le mois de Janvier et Août, alors que le maximum enregistré varie de 24 à 27°C au mois de Janvier et Août [142].

4.2.4.3. Précipitations

Cette région est caractérisée par des conditions climatiques favorables dans l'ensemble avec une pluviométrie supérieure à 600 mm par an en moyenne. Les précipitations atteignent leur maximum en mois de Décembre et de Février, qui constituent environ 30 à 40% des précipitations annuelles. Les pluies sont irrégulières d'une année à une autre et pour un même mois. Inversement, une sécheresse approximative la caractérise pendant les mois d'été (juin, août) [143].

En Algérie, le grenadier est un arbre adapté au climat des zones arides et semi arides, il a besoin de beaucoup de chaleur en été et une température assez basse en hiver. Il est très sensible aux gelées printanières qui perturbent très souvent la floraison et la nouaison).

Afin de classer la région de la Boufarik parmi les divers types de climats existants, les variables températures et pluviométrie sont pris en considération. En région méditerranéenne, ce sont le diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausson et le quotient pluviothermique d'Emberger qui sont les plus fréquemment utilisés [144].

La figure 4.2 présente le Diagramme Ombrothermique de la région de Boufarik établi à partir des données pluviométriques et thermiques moyennes mensuelles.

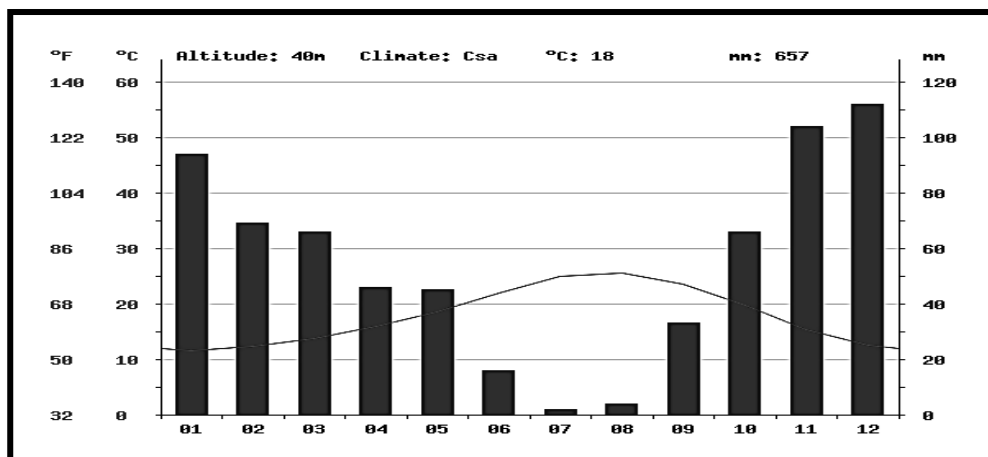


Figure 4.2 : Diagramme Ombrothermique de la région de Boufarik

Pour le climagramme, DAJOZ.[145] résume le bioclimat d'une station donnée par trois paramètres essentiels : la pluviométrie annuelle, la moyenne des températures du mois le plus chaud et la moyenne des températures le plus froid.

Grâce au quotient pluviométrique d'Emberger (Q) spécifique au climat méditerranéen, il permet aussi de situer notre zone d'étude dans un étage bioclimatique. Ce quotient tient compte des précipitations et des températures, il est déterminé selon la formule de STEWART [145] :

$$Q = \frac{3.43P}{M - m}$$

Avec :

- Q : le quotient pluviométrique d'Emberger.
- P : Pluviométrie annuelle moyenne en mm = 657m.
- M : Moyenne maximale du mois le plus chaud = 30.1°C°.
- m : Moyenne minimale du mois le plus froid =7.9°C.

Après application de la formule, nous obtenons la valeur de Q égale à 101,50. Ce dernier classe la région de Boufarik dans l'étage sub - humide à hiver froid (figure 4.3).

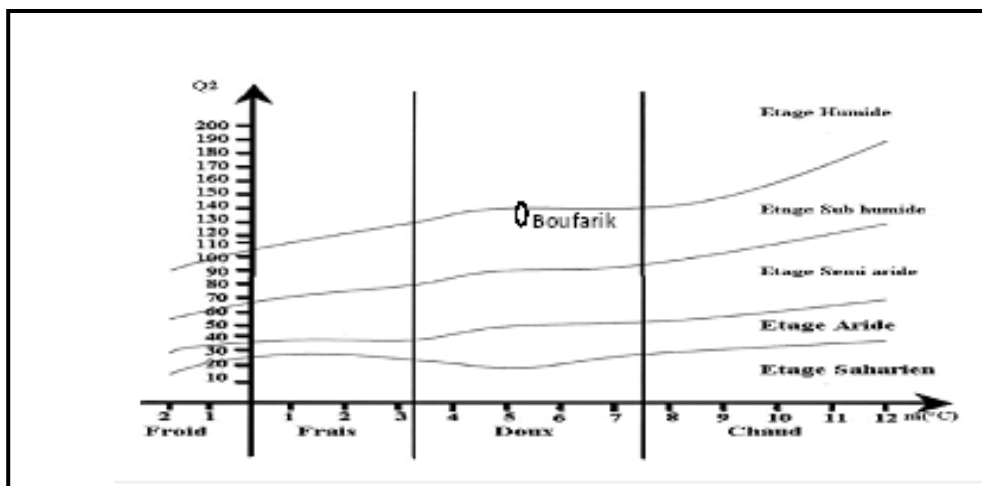


Figure 4.3 : Situation de la région d'étude au niveau du climagramme D'Emberger

4.2.4.4. Vent

En hiver, les vents qui dominent soufflent du secteur Ouest et sont humides. Les vents d'été viennent du Nord Est et de l'Est. Le maximum se situe au cours de la saison de l'hiver alors que leurs minimum est au niveau de la saison été. Leurs vitesses moyennes varie de 2,7 à 3 m/s, le maxima est de l'ordre de 4 m/s.

4.2.4.5. Sol

La Mitidja a permis de recenser cinq classes de sol qui se sont développés sur des superficies importantes, allant du sol peu évolué d'épandage colluvial, sol carbonatés /sol brun calcaires, sol rouge formé sous un climat de type méditerrané, Sol vertisols à drainage externe nul ou réduit et sol Hydromorphe favorisé par un relief relativement plat [144].

Le sol de la Mitidja est caractérisé par sa richesse en matière organique qui provient soit des résidus de culture soit des épandages de déjections animales. L'apport de matière organique dans le sol par exemple sous forme de fumier a des effets importants sur les cycles des nutriments et sur les pertes d'azote ;Une augmentation des stocks de carbone organique des sols cultivés peut jouer un rôle dans la limitation des émissions nettes de gaz à effet de serre vers l'atmosphère en stockant du CO₂ atmosphérique dans la MO des sols.

4.2.4.6. Couvert végétal

La région de la Mitidja se caractérise par une terre riche favorable pour un couvert végétal méditerranéen. De nombreuses formations forestières à peuplier blanc, frênes et autres essences représentent la forêt naturelle. Cette région est

également favorable aux vergers d'arbres fruitiers orangers et vignes. La flore à usage thérapeutique est relativement importante comme les oléacées, les moracées ...etc.

4.3. Etude ethnopharmacologique et Perception sur l'utilisation thérapeutique de l'écorce de *Punica granatum L.*

4.3.1. Description et Choix des localités de l'enquête

Vu l'étendu de la région de la Mitidja, notre enquête s'est limitée à deux wilayas Alger et Blida, elles-mêmes composées par plusieurs communes. Le choix de la région est basé d'une part sur la disponibilité du fruit du grenadier, et d'autre part sur le degré d'estimation de la connaissance de sa valorisation auprès de la population locale.

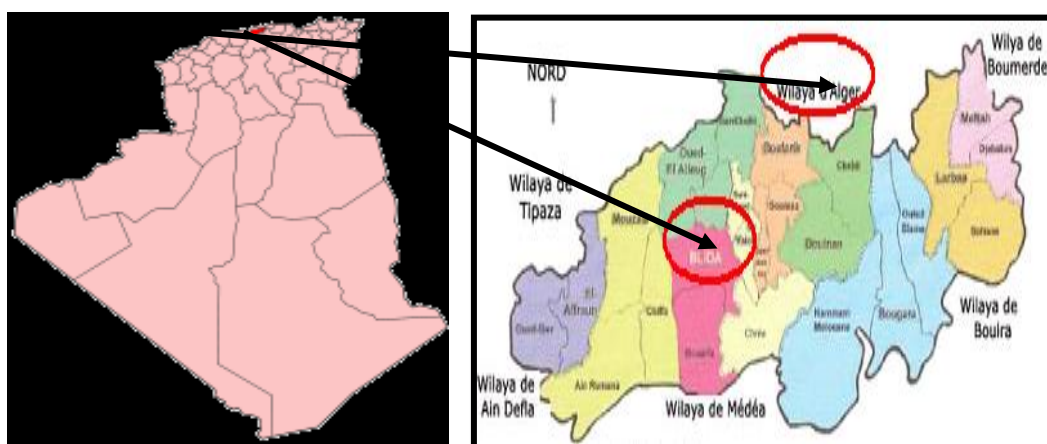


Figure 4.4 : Région de l'enquête ethnopharmacologique

○ Wilaya d'Alger

La wilaya d'Alger est située au bord de la mer méditerranéenne, avec une façade maritime de 80 km, sur le littoral Nord-centre du pays et est constituée de 13 daïras et de 57 communes.

D'une superficie de 820,22 Km² (plus petite wilaya du pays) pour une population générale de 3 246,191 habitants, Alger est bâtie sur les contreforts des collines du Sahel algérois. L'étalement urbain de la ville se poursuivra au-delà de l'Oued El Harrach à l'est, sur les terres fertiles de la plaine de la Mitidja tout au long de la baie, avant de se poursuivre ces dernières années au Sud et au Sud-Ouest, sur les collines vallonnées du Sahel, englobant d'anciens villages agricoles. Alger bénéficie d'un climat méditerranéen. Elle est connue par ses longs étés chauds et secs. Les hivers sont doux et humides [141].

○ Wilaya de Blida

La wilaya est située dans la partie centrale Nord du pays, à l'est de la capitale. Le Chef-lieu de la wilaya est située à 50 km au Sud-Ouest de la capitale, Alger. La wilaya s'étend sur une superficie de 1 478,62 Km². Sa population totale est estimée à 1 058 702 habitants. Elle se compose principalement d'une importante plaine et d'une chaîne de montagnes au Sud avec la plaine de la Mitidja, qui s'étend d'Ouest en Est avec une zone agricole riche [147].

4.3.2. Matériel et méthodes de l'enquête

4.3.2.1. Prospection et pré-enquête

Avant d'entamer cette enquête, une première prospection a été réalisée durant l'année 2012 en vue d'une bonne connaissance de l'état actuel de l'utilisation de ce fruit par la population locale.

Dans le but de se doter d'outils de travail facilitant notre tâche lors de cette étude, notre méthodologie se distingue par une enquête par questionnaire dans la mesure où notre objectif est de permettre de recueillir le maximum d'informations et d'élaborer des hypothèses pour comprendre un mode de pratique.

Pour une connaissance fondamentale des plantes et celles des sociétés humaines, chaque enquête fait appel aux outils de la systématique et à ceux des ethnologues pour connaître le mode d'utilisation des plantes dans les sociétés traditionnelles (enquêtes auprès des populations locales) [148].

La prospection utilisée dans cette enquête nous a permis :

- ✓ D'examiner les connaissances des populations autochtones, concernant l'usage de la grenade et de ses résidus pour se soigner et pour lutter contre les maladies.
- ✓ De faire une connaissance fondamentale de la plante «Chaque enquête fait appel aux outils de la systématique et à ceux des ethnologues pour connaître le mode d'utilisation des plantes dans les sociétés traditionnelles" (enquêtes auprès des populations locales).
- ✓ De faire revenir dans l'esprit des utilisateurs l'intérêt de ce fruit et y aussi indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de cibler certains tests biologiques.

Dans ce contexte, et en collaboration avec les herboristes, les praticiens traditionnels et les consommateurs, cette enquête a été réalisée afin de recenser l'utilisation de fruit du grenadier par la population de différentes régions de la zone de

la Mitidja. Elle consiste à identifier les différentes utilisations médicinales traditionnelles de cette plante pour s'enquérir des méthodes de traitement des maladies.

Elle a été menée entre le mois d'Avril et le mois de Juin 2017. L'outil de travail est d'élaborer deux types de questionnaire, l'un a été destiné aux herboristes et l'autre aux consommateurs (**APPENDICE C, C1, C2**). Tous les herboristes et les consommateurs interrogés ont été informés sur l'objectif de cette étude.

4.3.2.2. Elaboration d'un questionnaire

Le questionnaire élaboré doit être facile à comprendre et simple à remplir. Il vise à réunir des informations appropriées permettant une interprétation claire des réponses. Les concepts utilisés doivent satisfaire les objectifs de l'enquête et permettre d'obtenir des réponses précises et cohérentes. Il faut accorder une place importante à des questions fermées, c'est-à-dire une liste de réponses possibles proposées à l'interview. Les questions doivent être générales ainsi que spécifiques, certaines questions plus facile d'autres plus difficiles, et ce pour faire face aux réticentes naturelles des individus et aussi à leur manque d'informations et à leurs incapacités à analyser et à expliquer leurs propres actes.

4.3.2.3. Contenu du questionnaire

Chacun des deux types de questionnaires élaborés se divise en trois parties permettant de récolter des informations portant sur la partie de fruit de la grenade utilisée qui est l'écorce ou pelure, et sur le mode d'utilisation de ce fruit et le type de maladies traitées.

- La première partie de notre questionnaire est consacré à l'informant : âge, sexe.
- Des questions de type qualitatif ont été posées dans une deuxième partie : état de l'utilisation du fruit (fraiche ou sèche), mode de préparation (décoction, infusion..), disponibilité du produit, etc.
- Un troisième aspect quantitatif : dose utilisée, durée de traitement, le prix, etc.,...

4.3.3.4. Echantillonnage

A partir d'un échantillonnage aléatoire réalisé selon la méthode convenance, l'enquête a été réalisée auprès de 47 consommateurs et de 26 herboristes à travers deux Wilayas du nord algérien : Alger et Blida. Le nombre de ces consommateurs et herboristes est tiré au hasard.

4.3.3.5. Collecte des données

Les informations recueillies à travers cette enquête appartiennent à Six régions localisées dans deux wilayas Alger et Blida. Cette enquête a touché quatre régions de la wilaya d'Alger (Rouiba, reghaia, Bab Ezzouar et Bordj el Kiffan) et deux régions de la wilaya de Blida (Blida centre et Boufarik), les lieux où se localisent le plus les herboristes.



Figure 4.5 : Site de collectes de données au niveau de la wilaya d'Alger et de Blida

4.4. Caractérisation morphologique et physicochimique

4.4.1. Matériel végétal

4.4.1.1 Choix du matériel végétal

Le choix de l'espèce de grenadier s'est basé sur les résultats de l'enquête d'appréciation auprès de la population locale de la région de la Mitidja ayant une connaissance du patrimoine fruitier de cette région.

Suite à l'existence de plusieurs cultivars de grenades sur notre site de choix, trois ont été sélectionnée. Les deux premières retenues dans cette étude "Doux de koléa" et "Doux de Messaad" sont très appréciées au niveau de la région pour la qualité sucrée de leurs graines. Le troisième cultivar est un clone "Bordj Mira n°11" caractérisé par des graines très douces. Ce choix est basé d'un côté sur leur

appréciation par le consommateur de la région de la Mitidja et du territoire national. D'un autre côté, les cultivars de "Doux de koléa" et "Bordj Mira n°11" sont caractérisés par une épaisse écorce, très rentable pour utilisation en médecine thérapeutique.

4.4.1.2. Période de récolte des échantillons

Nos échantillons proviennent des mêmes conditions géographiques et pratiques de conduite. Jusqu'à l'état actuel, ils n'ont fait l'objet d'aucune étude de caractérisation ou d'identification.

En général, les noms donnés aux cultivars de ces espèces sont souvent pour exprimer une des caractéristiques, telles que : l'origine de l'espèce, la forme, la couleur et le goût des fruits.

Pour les cultivars de "Doux de Koléa" et "Doux de Messaad", le mot «doux» signifie sucré, pour le mot "Koléa" et "Messad" ce sont les nom de deux régions dont ils sont originaires, la première située dans la wilaya de Tipaza, la deuxième dans la wilaya de Djelfa. Pour Bordj Mira n°11, ce nom revient à la région dont il est originaire, située dans la wilaya de Bejaia, (Figure 4.5).

Les cultivars étudiés sont issues d'arbres âgés de seize années au début de notre expérimentation en 2012.

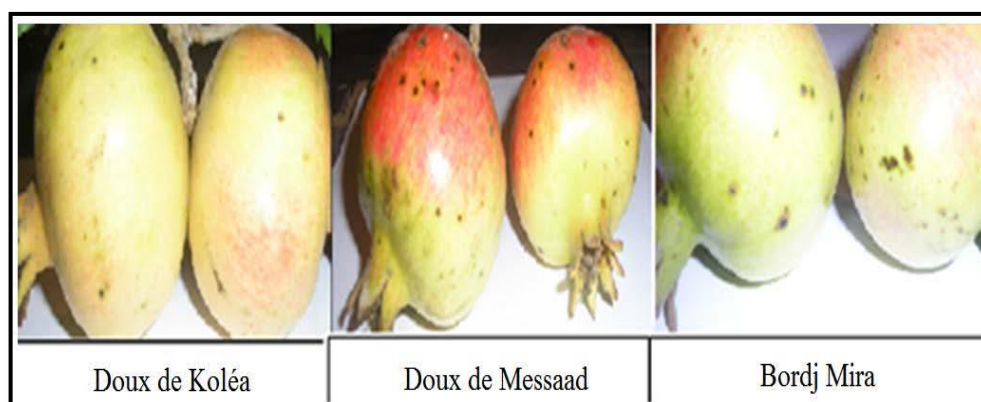


Figure 4.6 : Collection des trois cultivars de grenades

4.4.1.3. Echantillonnage

Le matériel végétal constitué des trois cultivars de grenade ont été tous collectés avec le même degré de maturité de façon aléatoire sur trois saisons consécutives, 2014-2015, 2015-2016 et 2016-2017 à la quatrième semaine de mois de septembre. Les données des caractères morphologiques et physico-chimiques représentent une moyenne de trois saisons consécutives. Les échantillons de grenade

est cultivé dans des conditions homogènes (il n'y avait pas de différence significative d'aspect, de taille ou de couleur entre les deux années de récolte).

La méthode d'échantillonnage suivie est celle préconisée par ALAVOINE et *al.*, [149] peu modifiée. Cette méthode consiste à se fixer une hauteur standard, (soit le niveau des yeux). Deux à trois arbres de chaque cultivar ont été sélectionnés et 20 fruits par cultivar au stade mature sont répartis dans quatre orientations géographiques, tout en évitant les fruits les plus exposés au soleil, ceux qui existent carrément en bas de l'arbre ainsi que ceux blessés afin d'éviter toute distorsion des résultats. La période de maturité est appréciée par la couleur du fruit. Après la cueillette, les fruits sont transportés au niveau de l'Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne (ITAFV) de Tessala el Mardja. Toutes les mesures ont été réalisées sur vingt fruits par cultivars [150].

4.4.2. Réactifs, solvants et appareillages

Une série de produits chimique et d'appareillage ont été utilisés pour la réalisation des analyses de cette étude. Tous réactifs sont de grade analytique. Les appareils et les produits sont résumés dans l'appendice D, (**Tableau D1 et Tableau D2**).

4.4.3. Caractérisation morphologique

Une caractérisation morphologique des fruits, des graines et des pépins de chacune des cultivars de grenades a été réalisé. L'évaluation de leurs variabilités morphologiques a été effectuée en créant un système de quinze descripteurs qui s'est inspiré de la liste proposée par l'Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales (UPOV) [150] et de ceux évoqués par MARS et MARRAKCHI [151] et MARTINEZ et *al.* [36].

La caractérisation a porté sur le poids du fruit, son diamètre et sa longueur totale, le diamètre et longueur du calice, le poids et l'épaisseur de l'écorce, le poids, la longueur et le diamètre de l'arille et du pépin ainsi le rendement en arilles (Appendice E, figure E1). A partir des mesures ainsi effectuées, une abbréviation est donné à chaque caractère afin de faciliter la description (tableau 4.2).

Descripteurs	Abbréviation	Unité
1. Poids moyen du fruit	Pf _m	g
2. Longueur moyenne totale du	LT _f _m	mm
3. Diamètre moyen du fruit	Df _m	mm
4. Diamètre moyen de Calice	DC _m	mm

5. Longueur moyenne de Calice	LC_m	mm
6. Poids moyen de l'écorce	Pe_m	mm
6. Poids moyen des membranes	PME_m	g
7. Epaisseur moyenne de	EE_{Cm}	mm
8. Rendement moyen en écorce	$RdtE_m$	%
9. Poids moyen d'un arille	PA_m	mg
10. Diamètre moyen arille	DA_m	mm
11. Longueur moyenne arille	LA_m	mm
12. Rendement moyen arilles	$RdtA_m$	%
13. Poids moyen du pèpin	PP_m	g
14. Longueur moyen du pèpin	LP_m	mm
15. Diamètre moyen du pèpin	DP_m	mm

Tableau 4.1 : Liste des descripteurs morphologiques de fruit de la grenade

Une fois arrivés au laboratoire, les vingt fruits de chaque cultivar sont pesés ainsi que leurs écorces, après avoir été épluchés à la main pour chacun des cultivars étudiés. Un nombre de 25 arilles a été pris au hasard parmi des échantillons homogénéisés et ont subi les mêmes étapes de pesée et de mesure que les fruits entiers.

Pour les pèpins, l'évaluation des descripteurs a nécessité l'extraction de la chaire des arilles à la main à partir de 25 graines de chacun des cultivars étudiés.

L'ensemble des mesures a été effectué à l'aide d'une balance de précision pour le poids avec une précision avec 0.1g pour le fruit et 0,0001 pour les arilles et les pèpins. La longueur et le diamètre moyen sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse digital avec une précision de 0,01 mm.

4.4.4. Caractéristiques physico-chimiques

Cette caractérisation a été réalisée sur les différentes parties de fruit de grenade : jus, écorces et résidus d'extraction dit bagasse.

4.4.4.1. Extraction et caractéristiques du jus

Une fois les fruits sont arrivés au laboratoire, sont lavés, essuyés, coupés dans la zone équatoriale avec un couteau aiguisé. Les écorces ont été séparées des arilles.

Selon la méthode d'OZGEN et *al.* [78], les arilles ont été broyées dans un appareil de laboratoire jusqu'à obtention d'une purée. Cette purée est pressée à l'aide d'un tissu en mousseline en vue de l'obtention d'un jus pur. Les jus obtenus sont troubles. Ainsi, ces jus ont été filtrés à l'aide d'une compresse et conservé à -18°C jusqu'à utilisation sans subir aucun traitement. Toutes ces analyses ont été réalisées en triples.



Doux de koléa

Doux de Messaad

Bordj Mira n°11

Figure 4.7 : Arilles et jus des trois cultivars de grenades

- Détermination du pH

Le principe de détermination du pH est basé sur la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse de du jus et a été déterminé selon la méthode AFNOR NF V03-40[152].

- Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable est déterminée par une solution aqueuse titrée d'hydroxyde de sodium NaOH à 0.1N en présence de la phénolphtaléine comme indicateur à un pH 8,1 [152]. Elle consiste à mesurer 25 ml de l'échantillon de jus de grenade.

Après l'addition de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine, titrer avec de la solution d'hydroxyde de sodium 0.1 N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose qui persiste pendant 30 secondes. L'acidité titrable est exprimée en gramme équivalent acide citrique pour 100 ml de jus :

$$AT(\text{meq}/100\text{ml}) = \frac{V_1}{V_0} \times 100$$

Avec :

AT : Acidité titrable (meq/100ml).

V_0 : est le volume en ml de la prise d'essai.

V_1 : est le volume, en ml de la solution d'hydroxyde de sodium (0,1N) utilisé.

Pour exprimer l'acidité titrable en gramme d'équivalent acide citrique par 100 ml de jus frais, il faut multiplier le résultat précédant par le facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique (0,75).

- Détermination du taux des solides solubles (TSS)

Le TSS représente conventionnellement le taux de matière sèche soluble de jus. Sa détermination est faite par lecture réfractométrique directe d'une aliquote de jus. La mesure de l'indice de réfraction s'effectue par application d'une prise d'essai sur le prisme inférieur du réfractomètre numérique, toute en veillant à ce que les prismes étant pressé l'un contre l'autre dont l'échelle graduée de 0 à 32°Brix correspond au pourcentage de Solides solubles[153].

La lecture du degré Brix s'obtient directement sur le réfractomètre, avec nécessité de correction, si la température affichée sur le thermomètre de l'appareil est inférieure ou supérieure à 20°C et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de Brix.

- Calcul du rendement en jus

Une quantité de 100 g d'arilles de chacune des cultivars de grenades étudiées sont mises dans des compressees stérilisée et séparées et sont pressées afin de récupérer la totalité du jus, ensuite chaque jus est filtré sur papier filtre pour le clarifier. Le rendement en jus de grenade est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rd jus(\%)} = \frac{\text{Pds jus pressé}}{\text{Pds des arilles}} \times 100[36]$$

Avec :

Pds du jus pressé : poids en (g) du jus extrait à partir des arilles.

Poids des arilles : poids en (g) des arilles soumis à l'extraction.

- Détermination de l'indice de maturité

L'indice de maturité est un indice de qualité qui s'exprime par le rapport entre le degré Brix et l'acidité titrable du jus (TSS/AT) [36]. Il est calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{IM} = \frac{\text{TSS}}{\text{AT}}$$

Avec :

TSS : total des solides solubles.

AT : acidité titrable de jus.

4.5. Caractéristiques chimiques des dérivés de la grenade

4.5.1. Détermination de la teneur en humidité

La teneur en humidité a été déterminée par la méthode gravimétrique de la proportion d'eau contenue dans chaque partie du fruit en mesurant la perte de masse à la dessiccation des échantillons. Pour ce faire, environ 5 g de d'écorces

fraîche, de jus et des résidus d'extraction frais sont pris séparément, pesées dans une capsule séchée au préalable, puis placées dans une étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à un poids constant et la masse est notée.

La teneur en humidité est déterminée selon la méthode de référence d'AUDIGIE et al.[153] et exprimée en pourcentage. Elle est donnée par la relation suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_0}{M_2} \times 100$$

Avec :

M_0 est la masse de la capsule vide (g).

M_1 est la masse de la capsule et de la prise d'essai après dessiccation (g).

M_2 est la masse de la prise d'essai (g).

○ Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol/ acide sulfurique [154]. Cette dernière nécessite une hydrolyse acide qui permet la rupture de toutes les liaisons glucidiques dans le polyside. Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec un chromogène qui est le phénol. A ce moment-là, il se forme des chromophores de couleur jaune-orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490 nm.

Une prise d'essai d'10ml de jus et/ou 5g de poudre chaque dérivé de grenade est additionné à 1 ml de phénol à 5 % p/v. Le mélange est bien agité. Un volume de 5 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté au mélange, laissé incuber dans 30mn à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 490 nm contre un blanc. La teneur des sucres est exprimée en $\mu\text{g}/\text{ml}$ (convertie en mg/litre) de glucose à partir d'une courbe d'étalonnage (**Appendice H, figure H1**).

○ Dosage des protéines

La teneur en protéines totaux du jus et des sous-produits de grenades est déterminée par la méthode de KJELDAHL [153].

Elle consiste à effectuer une minéralisation complète des molécules organiques, transformant l'azote organique à chaud sous l'action d'acide sulfurique et d'un catalyseur en azote minéral.

La deuxième étape, consiste en une distillation. L'ammoniac (NH_3) est distillé par entraînement à la vapeur d'eau et recueilli dans une quantité connue d'acide chlorhydrique en excès. La quantité d'acide chlorhydrique n'ayant pas réagi est dosée en retour par de la soude qui constitue l'étape de titrage.

Une prise d'essai d'10ml de jus et /ou 5g de poudre de chacun des dérivés de grenade écorce et résidus, est mélangée avec 1g de sulfate de cuivre(CuSO_4) et sulfate de potassium anhydre (K_2SO_4). Le tout est mélangé avec 15ml d'acide sulfurique pure et un matras du minéralisateur de KJEDAHL. Laisser mijoter pendant 3 heures jusqu'à ce que la solution devienne limpide.

Une fois refroidie, elle est complétée avec 30 à 50ml d'eau distillée tout en rinçant les matras. Le contenu est alcalinisé avec 55 à 65 ml de soude concentrée (NaOH) et adapter aussitôt à l'appareil de distillation. L'allonge du réfrigérant est ajustée de façon à ce qu'elle plonge au fond d'un bûcher dans lequel sont introduits 10 ml de solution d'acide borique(H_3BO_3) avec 1ml d'un indicateur coloré, le rouge de méthyl. L'entraînement de l'ammoniac commence presque aussitôt et se fait très rapidement et l'indicateur contenu dans le bûcher vire à sa teinte alcaline. Titrer avec de l'acide sulfurique 0,1 N jusqu'à virage de l'indicateur à sa teinte acide.

Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule ci-dessous :

$$N\% = \frac{0,014 \times V}{P_e} \times 100$$

Avec :

V : volume de l'acide sulfurique qui a réagi avec l'ammoniac.

P_e : prise d'essai(g)

Un facteur de conversion moyen de 6,25 multiplié par le pourcentage d'azote.

○ Dosage de la vitamine C

La teneur en vitamine C des écorces, des jus et des résidus d'extraction de trois cultivars est déterminée par la méthode de 2,6-DiChloroIndoPhénol (DCIP). Cette vitamine ou acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique par le DCIP en milieu acide et donne une coloration rose [155].

Une prise d'essai de 5 ml de jus et /ou 5g de poudre d'écorce et de résidus de grande est mélangée avec 15ml d'acide oxalique à 1%. Le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Mélanger 5 ml de surnageant avec 9 ml de DCIP

à 0,2mM. L'ensemble est agité pendant 5 secondes et la lecture de l'absorbance est faite à 515 nm contre un blanc.

La teneur en vitamine C est exprimée en mg/100ml de jus frais (mg/100ml MF) et est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant comme standard l'acide ascorbique avec une gamme de concentration allant de 0 à 500 µg /ml pratiqué dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

4.6. Caractérisation phytochimique et identification des composés phénoliques

4.6.1. Extraction et criblage phytochimique

Plusieurs études ont confirmé la composition phénolique de plusieurs variétés de grenade du monde entier [12, 32, 37, 60,156,] et leurs activités antioxydantes [53,157]. Cependant, aucune information n'est disponible sur l'identification et la quantification des cultivars Algériens prélevés de la région de la Mitidja.

En vue de tirer profit de ces propriétés pour un usage alimentaire et pharmaceutique et aider les agriculteurs et les spécialistes en transformation industrielle à mieux connaître la composition phytochimique de ces trois cultivars, nous nous sommes basées dans cette partie d'étude, à caractériser les différentes classes de composés phénoliques existant dans les jus, poudre d'écorce et de bagasses de grenade et la détermination de leurs activités antioxydantes.

4.6.1.1. Traitement des écorces et des bagasses de grenade

Les écorces sont séparées manuellement des arilles, coupés en petits morceaux, séchées à une température ambiante et à l'abri de la lumière dans un endroit aéré pendant une semaine, puis dans une étuve ventilée réglée à 35°C pendant 24 h Les écorces et les résidus d'extraction ou bagasses ont été traités selon la méthode de VIUDA-MARTOS et al/[155] modifiée. Les écorces sont laissés à sécher pendant une semaine à l'abri de la lumière.

Une fois séchées et pour éliminer toute trace d'eau, les écorce ont subi un séchage à 35 °C pendant 24 h dans un four à air chaud avant d'être broyer et tamisé en une poudre fine.

Les échantillons de résidus ou bagasses de grenade utilisés dans cette partie de travail sont ceux qui se sont régénérés à partir des fruits pressés pour récupérer du jus.

Ces derniers ont été pris dans un morceau de tissu de mousseline, trempé dans de l'eau à une température constante de 75°C pendant 10 minutes dans un bécher pour le lavage. Le co-produit entier a été pressé pour éliminer les déchets liquides après le processus de lavage. Le résidu filtré a ensuite été séché à 75 °C pendant 8 h dans un four à air chaud avant de broyer les échantillons séchés avec un broyeur et tamisé en une poudre fine pour augmenter la surface d'extraction des solvants [155].

Les écorces et les bagasses séchées, ont été broyées, réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique de laboratoire et tamisées par un tamis de diamètres 1mm.

4.6.1.2. Extraction des composés phénoliques

- Extraction conventionnelle

Les conditions d'extraction conventionnelle par solvant ont été choisies selon les données de la littérature [155,15].

Pour le choix du solvant, celui – ci doit présenter une bonne sélectivité pour l'extraction des composés phénoliques et il doit être compatible avec la méthode utilisée pour l'analyse des extraits.

SINGH *et al* [72] HASNAOUI *et al* [158] et IQBAL *et al* [159] ont révélé que le méthanol est le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances bioactives des écorces de grenades. L'eau est généralement ajoutée au solvant d'extraction tel que le méthanol afin d'améliorer l'extraction des composés phénoliques polaires à partir des écorces de grenades [159]. Ainsi, la combinaison eau/solvant organique permet d'avoir un milieu à polarité modérée qui accrut l'extraction des polyphénols [57,130].

Deux méthodes d'extraction conventionnelles ont été réalisées avec un mélange de solvant choisi selon la littérature avec quelques modifications (v/v) (80-20%) [151,155].

Les écorces ont été extraites par le mélange solvant méthanol /eau, alors que pour la bagasse, le solvant éthanol /eau ont été utilisés selon la méthode décrite ci-dessous.

- Méthode de macération

Une quantité de 20 g de la poudre d'écorces de chaque échantillon (écorce et bagasse) est mélangée avec 200 ml de solvant (mélange méthanol/eau 80/20), [155]. La macération a été réalisée à froid pendant 24h et sous agitation magnétique. Les solutions obtenues sont filtrées. Les solutions ont été récupérées et ont été concentrés à 40°C d'évaporateur rotatif ou d'appareil de lyophilisation Genivac à 60°C, pour les extraits obtenus par la méthode d'ultrason.

- Méthode de soxhlet

L'impact de la concentration du solvant sur le rendement d'extraction a été aussi étudié par la méthode de soxhlet.

Une quantité de 20 g de poudre de chacune des poudres des trois échantillons étudiés a été pondérée et extraite pendant 4 heures par l'appareil soxhlet avec le mélange méthanol/eau (80/20%) [160]. Les solutions ainsi récupérés ont subi les mêmes opérations de séchage que pour les écorces de grenade.

- Méthode d'intensification par Ultrasons

En vue de l'intensification de l'extraction des composés phénoliques et en comparaison des deux autres méthodes conventionnelles, l'extraction assistée par ultrason été choisie par sa simplicité d'exécution et son gain de temps, sa température ambiante ainsi que des quantités plus faibles de solvant utilisé et une grande reproductibilité.

Une quantité de 1,5 g de poudre d'écorces et de résidus de chaque échantillon est mélangé avec 50 ml du solvant hydrométhanolique. Les flacons ont été immergé dans un bain ultrasons avec un niveau de liquide maintenu inférieur dans le récipient que celui du réservoir de nettoyage. L'extraction optimale des paramètres étaient comme suit : température d'extraction 60°C, extraction temps 40 min, la fréquence 50 kHz [161] (figure 4.8). Le extraits sont évaporés dans un appareil de lyophilisation "Genivac".

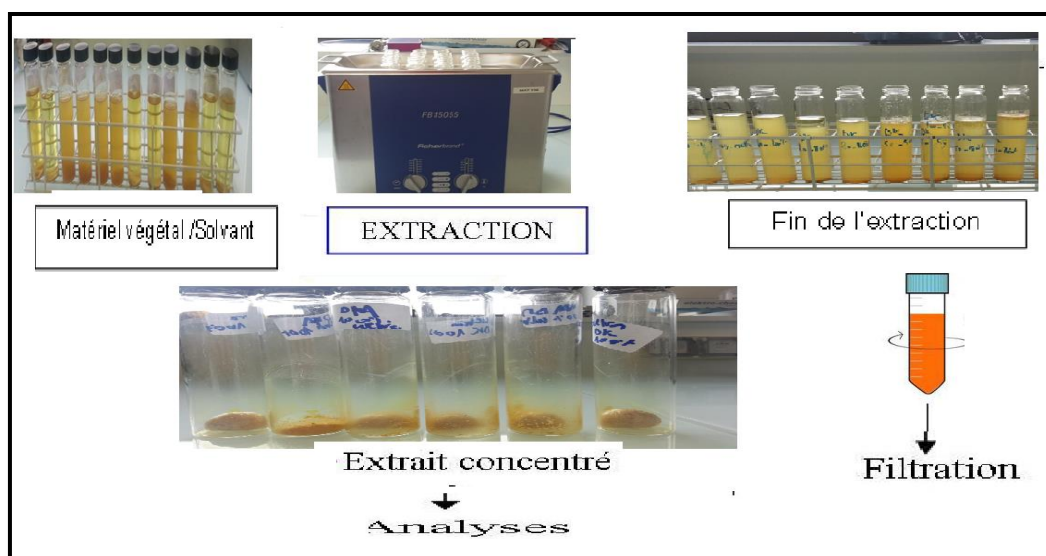


Figure 4.8 : Illustration schématique de la procédure d'extraction assistée par ultrason

Tous les extraits bruts obtenus, de couleur brun foncé, ont été pesés pour déterminer leurs rendements et conservés au frais pour réaliser les différents dosages.

De couleur variable du jaune ou brune, tous les extraits brutes sont rendus à un volume de 10ml avec du méthanol, puis centrifugés à 4500 rpm pendant 10 min.

La lyophilisation des extraits des écorces a été réalisée dans le laboratoire de Saidal d'El Harrach. Elle consiste après une Précongélation des extraits à une déshydratation à +20°C pendant 24h puis un séchage à +40°C pendant 2heures. [162].

4.6.1.3. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction, exprimés en pourcentage, est calculé pour chacune des méthodes d'extraction et pour les extraits bruts des écorces et de la bagasse par la formule décrite par FALLEH et al/[163] :

$$\text{Rd Ext \%} = \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{ech}}} \times 100$$

Avec :

R : Rendement exprimé en pourcentage (%).

M_{ext} : Masse en gramme de l'extrait sec.

M_{ech} : Masse en gramme de l'échantillon végétal.

4.6.1.4. Analyse qualitative : Screening chimique

Les extraits bruts obtenus par la méthode de macération de ainsi que le jus de grenade ont été soumis à des tests phytochimiques. Le but de ce cette procédure et

de détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels qui peuvent se trouver dans chaque dérivé de grenade.

Nous avons caractérisé les différents groupes chimiques en nous référant aux techniques décrites dans les travaux de BHANDARY *et al* [164] et BEKRO *et al* [165]. Ces tests sont basés sur la formation d'un complexe coloré en utilisant des réactions de coloration.

- Recherche des flavonoïdes

Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes ont été mis en évidence en additionnant à 5ml de chaque extrait quelques copeaux de magnésium et en présence de 0,5 ml d'acide chlorhydrique (95°C). L'apparition de la coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoides.

- Recherche des tanins

La caractérisation des tanins a été réalisée par le test de chlorure ferrique. Elle consiste à l'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3 à 1%) à 1 ml de chaque. La réaction donne une couleur qui vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

- Recherche des anthocyanines

La caractérisation des anthocyanes est mise en évidence en mélangeant à 1 ml de l'extrait 1 ml d'alcool sulfurique à 10 %. Une couleur rose –rougeâtre qui vire vers le bleu violacé apparaît lorsqu'on ajoute 1ml d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) diluée à 50%. Ce virement de couleur indique la présence des anthocyanes.

- Recherche des alcaloïdes

Elle a été faite à l'aide du test de Mayer. A un 1 ml de chaque extrait, on additionne 5 gouttes de réactif de Mayer. La réaction donne la formation d'un précipité jaune indique la présence des alcaloïdes.

- Recherche des anthocyanes

Ce test est basé sur la réaction d'1 ml d'extrait avec 1 ml d'acide sulfurique à 10%, qui donne une coloration rose - rougeâtre en milieu acide et qui vire au bleu violacé lorsqu'on ajoute 1 ml d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) diluée à 50%.

- Recherche des saponosides

La recherche des saponosides a été réalisée en ajoutant quelques gouttes d'eau à 2 ml de chacun des extraits. Agiter et laisser reposer 20 min, faire agiter la

présence de saponides par la persistance de la mousse avec 0,4 ml de chloroforme (CHCl_3) et 0.6 ml de H_2SO_4 concentré à 1ml d'extrait aqueux. Leur présence est mise en évidence par l'apparition d'un anneau marron à l'interphase.

- Recherche des Terpènes et des Stérols

1ml d'extrait est additionné à un mélange de 0.5 ml d'acide acétique (CH_3COOH) et 1 ml d'Acide Sulfurique (H_2SO_4) concentré. Un cercle violé ou marron apparaît à la zone de contact des deux liquides, devenant grise quelques secondes après, indiquant la présence des terpènes et stérols.

4.6.1.5. Analyse quantitative : Dosage des composés phénoliques

- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé à l'aide du réactif de « Folin-Ciocalteu en présence de carbonate de sodum (Na_2CO_3), méthode adapté par SINGLETON et ROSSI [166].

Le réactif de Folin-ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) qui est réduit. Lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MoO_4). Le dosage des polyphénols totaux se fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique.

Pour réaliser ce test il faut introduire dans un tube à essai, un volume de 0,5 ml de solution étalon ou de chaque échantillon centrifugé et dilué et 1 mL du réactif de Folin (dilué dix fois dans l'eau distillée. Après agitation au vortex, 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 7,5 % (75 mg/L) sont introduit dans le tube. Ces tubes son ensuite agités puis placés pendant 30mn à température ambiante à l'obscurité.

Une mesure de l'absorbance de la solution à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS permet de déterminer ensuite les concentrations en polyphénols totaux dans chaque échantillon et cela à partir d'une gamme étalon d'acide gallique. La mesure d'absorbance est réalisée contre une solution de référence ne contenant pas les extraits de polyphénols mais ayant subis toutes les étapes du dosage. La droite d'étalonnage est effectuée à partir de solutions d'acide gallique (0-250 µg/ml dans le méthanol (**Appendice E, figure E2**).

- Les résultats sont exprimés en g équivalent acide gallique par rapport à 1 litre de jus (g EAG/L de jus).

- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) de BLASA et al.[167], modifiée par VIUDA – MARTOS et al.[155]. Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe d'aluminium-flavonoïde.

Ainsi, un volume de 1 ml de chaque extrait et de jus est dilué séparément, ensuite a été mélangé avec d'une solution méthanolique contenant 1ml de chlorure d'aluminium à 2%(p/v). Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc contenant du méthanol à la place du jus.

Les flavonoïdes sont quantifiées à l'aide d'une droite d'étalonnage obtenue par mesure des absorbances des concentrations connues de solutions étalons de la quercétine (0-60 µg/ml) (**Appendice E, Figure E3**). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de rutine par milligramme d'extrait sec (mg ER/ml de jus).

- Dosage des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont déterminés par la méthode de WILLIS et ALLEN [168] avec des modifications minimales.

Une mixture d'un millilitre de jus dilué (1/10) et de 5 ml de 2,5 % d'iodate de potassium(KIO₃) est mélangée à l'aide d'un vortex pendant dix secondes.

Une absorbance maximale est obtenue après 2 minutes et l'optimum de la réaction et 4 min pour la solution standard de l'acide tannique [60]. L'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Les résultats sont exprimés en mg d'acide tannique par ml de jus et pour l'élaboration d'une droite d'étalonnage, avec 6 différentes concentrations de l'acide tannique (0-800 mg/ml) (**Appendice E, figure E4**).

- Dosage des anthocyanes

La composition en anthocyanine totaux (CAT) est estimée par la méthode du pH différentielle en utilisant deux tampons : tampon chlorure de potassium à pH 1,0 (25 mmol) et le tampon acétate de sodium a pH 4,5 (0.4 Mmol) [170]. Ensuite, 0,4 ml de jus est mélange séparément avec 3,6 ml de chacun des deux tampons et mesurer l'absorbance à 510 nm et 700 nm, ensuite l'absorbance Abs est calculée par la formule ci-dessous :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{510\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - ((\text{Abs}_{510\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5})$$

La teneur en anthocyanines est exprimée en mg d'équivalent cyanidine 3-glucoside(EGC) par litre de jus ou de g de matière sèche et sont calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Anthocyanine(cyanidine – 3rutinoside équivalent)} = \frac{\text{Abs} \times \text{PM} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Avec :

Abs : absorbance ;

PM : Poids moléculaire (449,2) ;

FD : Facteur de dilution (20) ;

ϵ : Coefficient d'absorption molaire de Cyanidine-3-glucoside(CAM) (26.900).

4.6.2. Identification et quantification des composés phénoliques des jus de grenades par chromatographie haute performance (HPLC)

En plus des analyses spectrophotométriques qui nous ont permis de quantifier les composés phénoliques les plus fréquemment présents dans les jus des trois cultivars de grenades étudiées. Une analyse chromatographique a été effectuée, visant à séparer un ou plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification.

Ces analyses ont été réalisées en utilisant un appareil d'HPLC de marque Agilent (HP 1100 H, Helwett-Packard, Wald-bronn, Allemagne)). Tous les solvants ont été filtrés avec un filtre de 0,45mm filtre.

Chaque échantillon de jus a été dilué (1/10) dans du méthanol (5 :5 v/v méthanol /eau), puis centrifugé à 15 00 tr/min pendant 20 min. Le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,45 μm pour les analyses.

L'élution utilisé est composé de :

- la phase mobile A, eau bi-distillée / acétonitrile/ acide acétique (85/ 15 / 0,2 ; v / v / v).
- la phase mobile B, de l'acide d'acétonitrile / acide citrique (85/ 0,2 ; v / v).

Le débit était de 0,5 ml / min. La quantification des polyphénols a été effectuée à 365 nm et 254 nm pour les flavonoïdes. Chaque échantillon de 10 μl a été injecté sur une colonne ZORBAX SB de type phase inverse C18, de dimensions égales à (150 x 0,5 mm).

Ces composés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention (Rt) à ceux d'étalons purs injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. Les

résultats ont été exprimés en % de réponse chromatographique de chaque composé identifié par rapport à la surface totale obtenue en analysant les jus de grenades.

4.7. Activité biologiques des dérivés de grenades et leur optimisation par plan d'expériences

4.7.1. Piégeage des radicaux libres par le test DPPH

Le réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un composé chimique qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il est réduit par un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à une absorbance de 517 nm [170].

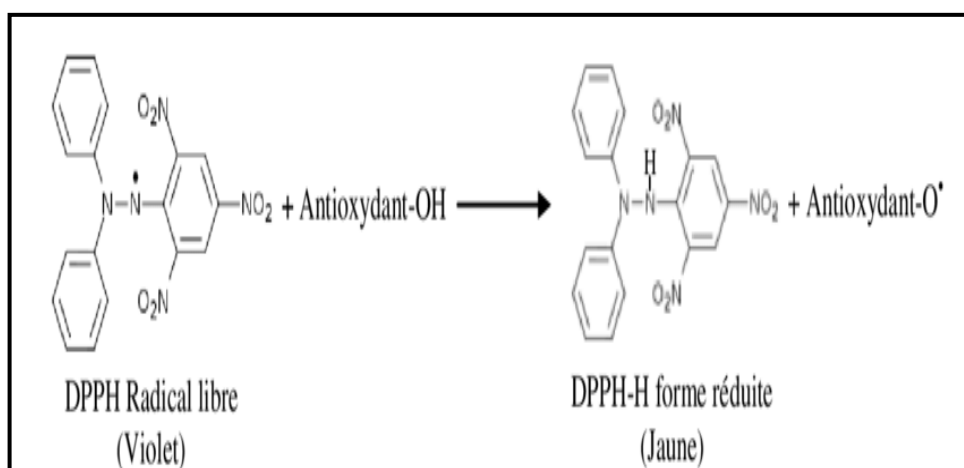


Figure 4.9 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre le radical DPPH• et un antioxydant (AH) [171].

Un volume 0.975 ml de la solution méthanolique de DPPH fraîche (0.0024 g/100 ml méthanol) est ajoutée à 0,25 ml de la solution de chaque jus (dilué 1/10) à différentes concentrations (2 - 100 µg/ml). Le mélange est fortement agité, incubé pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc méthanol avec un spectrophotomètre UV-visible. Le contrôle négatif est composé de 0,25 ml d'éthanol et de 0,975 ml de la solution de DPPH•. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard.

Le pourcentage d'activité anti radicalaire (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$AA\% = \frac{A0 - AS}{A0} \times 100$$

Avec :

AA : activité antioxydante (%).

A0 : densité optique du contrôle (nm).

AS : densité optique de l'échantillon (nm).

Les antioxydants synthétiques, le BHT (hydroxytoluène butylé) et la vitamine C (acide ascorbique) sont utilisées comme standards à différentes concentrations. Le résultat est exprimé en mg de vitamine C équivalent (mg E VC) par ml de jus.

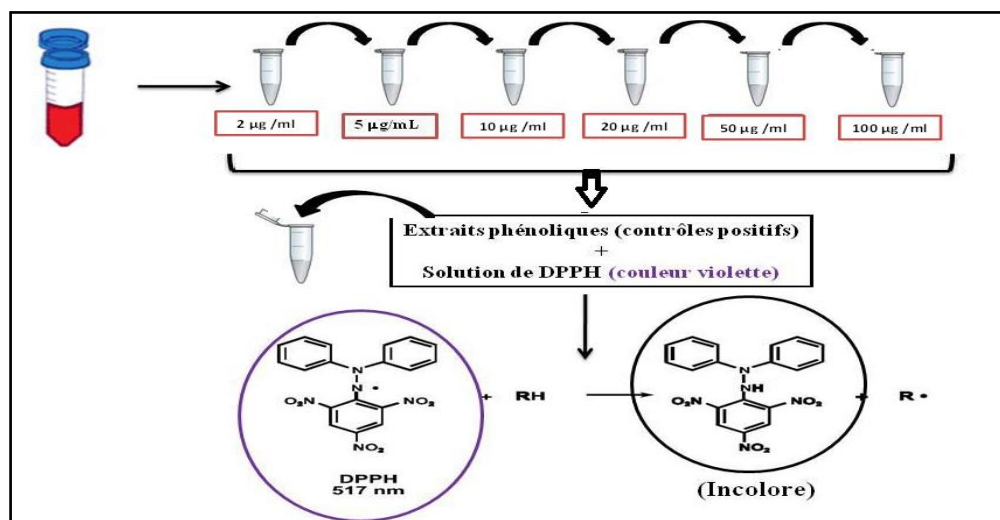


Figure 4.10 : Mécanisme d'activité anti radicalaire du DPPH (élaboré par Eldarra, [172] avec modification).

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice de DPPH à 50% de radicaux libres) des jus sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = *f* (concentrations)].

4.7.2. Activité antioxydante par le test FRAP

Le pouvoir antioxydant par réduction du fer, communément connu par FRAP pour Ferric Reducing Antioxidant Power de nos jus, est déterminé par la méthode décrite par Kaur et al [173]. et modifié par Hmid [174].

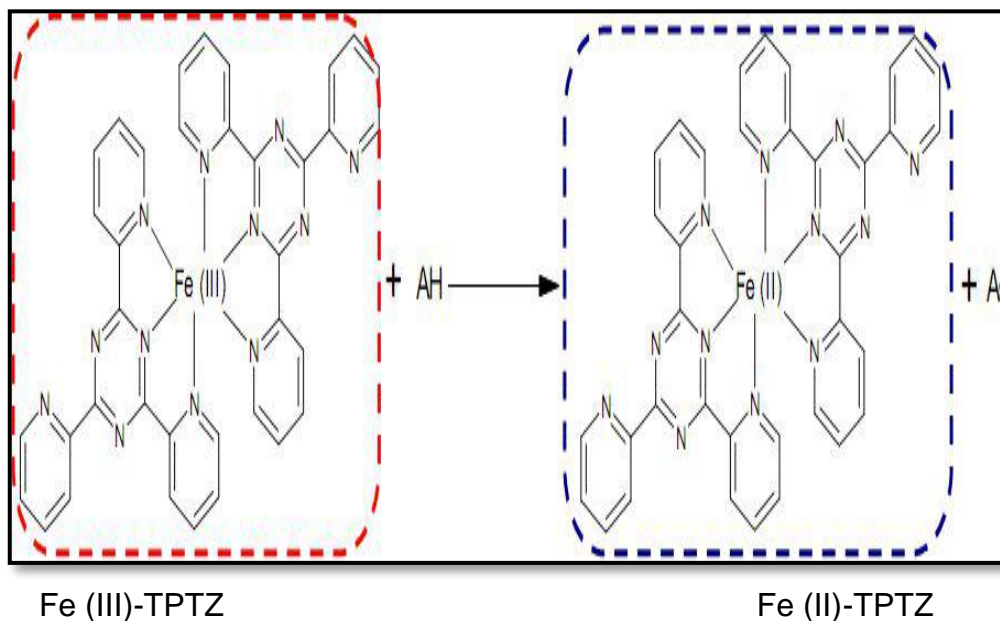


Figure 4.11 : Mécanisme réactionnel entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) [175].

Un volume de 1ml de jus à différentes concentration (2-100 $\mu\text{g/ml}$) est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1 %, m/v), le tout est bien mélangé. Le mélange est incubé à 50 °C, pendant 20 min. Après 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %, m/v) sont ajoutés au mélange, centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. Ensuite 2,5 ml du mélange sont additionnés avec 2,5 ml d'eau distillées et de 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%, m/v).

L'absorbance est mesurée à 700 nm par un spectrophotomètre contre un blanc contenant du méthanol à la place du jus.

Le BHT et La vitamine C (acide ascorbique) sont utilisées comme composés standards à différentes concentrations.

L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur. La concentration en jus fournissant 0,5 d'absorbance (IC_{50}) a été calculée à partir du la méthode de régression linéaire [l'absorbance= f (concentrations)]. Elle est définie comme étant la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique.Elle sert à comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

4.7.3. Les extraits des écorces de grenade comme antimicrobiens

Dans cette partie, le potentiel antimicrobien de l'extrait de l'écorce de trois cultivars de grenades locales cultivées de la région de la Mitidja a été déterminé par rapport à la croissance de 6 souches microbiennes pouvant être agents de plusieurs

infections chez l'être humain. L'extrait sélectionné est celui obtenu par la méthode de référence.

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé [176]. Les solutions des extraits sont préparées dans le Diméthyl sulfoxyde pour une meilleure diffusion et pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 5mg/ml.

Le choix s'est porté sur des souches de références, de bactéries appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif) pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance et des champignons. Ces souches sont de type « American Type Culture Collection ATCC » fournies par l'institut Pasteur puis conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée. La Gentamicine (10 µg/disque) et la Streptomycine (10 µg/disque) ont été utilisées comme témoin positifs [177].

Les souches microbiennes utilisées comme souches de référence pour réaliser les tests sont présentés par le tableau 4.2 :

Tableau 4.2 : Caractéristiques des souches microbiennes testées

Souches	Famille	Gram	ATTC
<i>Staphylococcus</i>	Staphylococcaceae	+	1816
<i>Echerichia Coli</i>	Entérobactériaceae	-	25922
<i>Salmonella</i>	Entérobactériaceae	-	13311
<i>Klebsiella</i>	Entérobactériaceae	-	4352
<i>Candida albicans</i>	Cryptococcaceae	/	24433
<i>Aspergillus niger</i>	Trihocomaceae	/	16404

Deux étapes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne. Une première par une méthode de diffusion sur un milieu solide, pour sélectionner le meilleur extrait à haute activité antimicrobienne et une deuxième par l'utilisation de la méthode de dilution en milieu liquide pour déterminer concentrations minimales inhibitrices (CMI).

4.7.3.1. Préparation de l'inoculum

Pour optimiser leurs cultures, les souches bactériennes et fongiques sont mises dans le bouillant nutritif Muller Hinton et incubées à 37°C pendant 24h pour les

bactéries et dans le milieu Sabouraud pendant 48h pour les levures. Ensuite, chaque souche est ensemencée sur une gélose nutritive puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 h pour les bactéries et 30°C pendant 48 heures pour les champignons [177].

On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester.

La suspension bactérienne est diluée dans l'eau physiologique stérile (1/10) puis ajustée à une concentration de 10^8 UFC/ ml [233] et à 106 UFC / ml pour *les champignons*. Leur opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland [179].

4.7.3.2. Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage, à partir d'un inoculum dilué au 1/10 (environ 10 UFC/ml) en trempant un écouvillon stérile dans la suspension, l'essorer et le frotter sur la totalité de la surface gélosée Muller - Hinton de haut en bas en stries serrées. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Jusqu'à finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

4.7.3.3. Dépôt des disques

A l'aide d'une micropipette, on imbibe des disques stériles, de 6 mm de diamètre avec 100µl de chacun des extraits hydrométhanoliques, puis on le dépose délicatement sur la surface de la gélose. On laisse diffuser pendant 30 minutes à 4°C. Puis on incube à 37°C pendant 24H.

Les résultats de l'antibiogramme et l'anti-fongigramme sont exprimés par la mesure après incubation des diamètres des halos d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. Une activité inhibitrice est présentée par une zone claire autour du disque, alors que son absence se présente par l'absence de la zone claire autour du disque.

4.7.3.4. Détermination de la CMI

L'évaluation de la concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur un milieu liquide consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien nécessaire pour inhiber complètement la croissance bactérienne visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures [180]. Dans notre cas, sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité à $\lambda = 620$ nm induite par la croissance des germes étudiés et elle correspondra à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité.

4.8. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade

Notre travail expérimental dans cette partie d'étude a été divisé en deux parties. Des essais préliminaires sont effectués selon le modèle classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres. Ils ont été réalisés sur la poudre des écorces de la variété clone Bordj Mira caractérisée par une écorce à épaisseur plus élevée et une richesse en composés phénoliques.

De nombreuses méthodes ont été retenues pour extraire les composés phénoliques de l'écorce de grenade. Parmi les plus classiques comme il a été déjà traité précédemment, on compte l'extraction par des solvants organiques, le méthanol, l'éthanol et l'extraction à l'eau. Ce sont les solvants qui semblent posséder la plus grande capacité d'extraction des polyphénols chez la grenade [13].

Pour déterminer les conditions optimales d'extraction phénolique des écorces de *Punica granatum*, les conditions d'extraction ont été définies conformément au plan expérimental décrit ci-dessous :

- Type de solvants organiques :

Trois types de solvants organiques (méthanol, éthanol et acétone) ont été sélectionnés.

- Concentrations des solvants :

Cinq concentrations du solvant ont été choisies (20%, 50%, 80%; 100 v / v) ont été préparées en mélange ou non avec l'eau distillée.

- Températures d'extraction :

Cinq températures (20 °C, 25 °C, 30 °C, 50 °C, 70°C) ont été utilisées.

- Temps d'extraction :

Cinq temps différents (30, 60, 90, 120, 180 mn) ont été choisis.

Le choix du solvant a été déterminé selon la quantité de composés phénoliques extraites et sa qualité.

Une fois le solvant choisi, on a joué sur les concentrations en gardant les mêmes conditions d'extraction.

Après avoir identifié le solvant ainsi que sa concentration adéquate, le temps et la température optimale pour l'extraction ont été déterminés.

Pour une meilleure sécurité environnementale, l'utilisation des co-solvants sans toxicité humaine et à un meilleur coût doit être prise en compte dans la sélection des solvants d'extraction des composés bioactifs.

L'étude qualitative et quantitative dépend principalement de la sélection de la méthode d'extraction [181]. Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération avec un mélange hydro-alcoolique [182]. La combinaison éthanol – eau est une combinaison de solvants de qualité alimentaire non toxiques et approuvée par l'Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (US Food and Drug Administration). Elle a été utilisée pour accroître l'efficacité de l'agent d'extraction pour extraire les polyphénols)[179].

L'objectif de cette partie d'étude est l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, à partir de la poudre d'écorces de grenade de Bordj Mira. Selon la méthode de surface de réponse (MSR), un modèle mathématique polynomial a été développé. Le type du modèle choisi est le plan de Box-Behnken [124].

L'extraction des polyphénols à partir des écorces grenade a été réalisée en utilisant la méthode assistée par ultrason dans le but d'intensifier le rendement en composés phénoliques à partir des écorces du cultivar Bordj Mira.

L'effet de la concentration du solvant, du temps et de la température d'extraction) ont été fait varier.

Afin d'identifier les paramètres ayant une plus grande influence sur le taux de composés phénolique et l'activité antioxydante, une étude de facteur par facteur a été réalisée. Une combinaison de ces paramètres après leur sélection nous a permis d'optimiser l'extraction de ces composés phénoliques pour l'élaboration d'un plan d'expérience.

Après extraction, tous les extraits ont été évaporés à l'aide d'un rotavapor et l'extrait brut obtenu après extraction est ensuite dissout dans un solvant composé d'eau et d'éthanol à 80/20 % en volume.

La qualité des extraits a été contrôlée en fonction de la teneur totale en polyphénols totaux, flavonoïdes et leur potentiel de balayage du (DPPH) [173,174].

4.8.4.1. Choix des paramètres d'optimisation

Dans notre cas de modélisation par méthode de macération, considérée comme de référence dans notre étude, l'analyse de la littérature nous a permis de retenir ces principaux paramètres opératoires pouvant agir sur l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques :

- Concentration du solvant,
- temps d'extraction

- température d'extraction.

- Concentration du solvant(C%) :

La teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante sont dépendantes de concentration du solvant. En vue de confirmer cette affirmation, nous avons choisi un mélange de solvant éthanol/ eau à trois différentes concentrations : 20, 50 et 80%.

- Temps de la réaction (mn) :

La durée d'extraction correspond au temps nécessaire de pénétration du solvant dans la matière végétale afin d'extraire la totalité des substances bioactives. IL dépend du solvant, de la nature de la matrice végétale et de sa structure (fraiche ou poudre).C'est un autre paramètre principal pour la méthode d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes et qui varie de 3h jusqu'à 24heures.Les temps longs sont généralement favorables à l'extraction des composés phénolique, mais le problème coïncide avec le risque de leurs dégradation. Dans notre modèle il a été limité à trois temps 60, 90 et 120mn selon les travaux de MASHKOR [181].

- Température d'extraction (°C) :

En plus du temps d'extraction, la température est un autre paramètre qui influe l'extraction des composés phénoliques. La solubilité de la poudre des écorces de grenade dépend fortement de la température du milieu réactionnel. Elle a été limitée à trois niveaux 30,50 et 70°C selon QU et *al.* [182].

Comme facteur fixe, le ratio solide/ liquide a été pris en considération ainsi que la fréquence. Selon la littérature, le ration le plus rencontré varie entre 1/10 et 1/50 mg/ml. Pour être compatible avec le volume de solvant choisi, la masse de poudre de poudres d'écorces de grenades à extraire a été fixée à 1,5 g, pour une meilleur homogénéité de l'échantillon et permettre à ce volume de réaliser les autres tests de quantification de composés phénolique et détermination de l'activité antioxydante.

En se basant sur la méthodologie des plans d'expériences, nous avons a réalisé des extractions avec un mélange de solvant éthanol /eau, dont le ration est de 1,5g / 20ml.Les mêmes conditions que pour la partie extraction des composés phénoliques.

Ainsi, les paramètres sélectionnés ont été combinés en vue d'optimiser l'extraction des polyphénols via l'élaboration d'un plan d'expériences. Il s'agit de la concentration du solvant (%), Température (°C) et le temps d'extraction (mn).

4.8.2.4. Choix des niveaux

Les trois facteurs choisis ont été étudiés entre un niveau inférieur (-1) et un niveau supérieur (+1) : la concentration du solvant ($20 < C < 80$ %), Température ($30 < T < 70$ °C) et le temps d'extraction ($60 < t < 120$ mn). La matrice d'expériences correspondant à un plan à trois facteurs comporte quinze expériences (tableau 3). Le ratio solvant/matière végétale a été retenu un paramètre fixe (1g/20ml). Les trois facteurs variables étudiés et leur niveau d'étude sont regroupés dans le tableau 4.3 :

Tableau 4.3 : Différents niveaux de paramètre variables pour l'optimisation

Paramètres	Unité	Niveau (-1)	Niveau(0)	Niveau (+1)
X1 : Concentration solvant	(%)	20	50	80
X2 : Température	(°C)	30	50	70
X3 : Temps	(mn)	60	90	120

4.8.4.3. Choix du plan d'expériences

Comme première étape, un plan de criblage a été utilisé afin de trier les facteurs les plus influents. Le modèle de second degré dit "plan Box-Behnken" a été choisi. C'est un modèle dont sa mise en œuvre est aisée car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées. Il est caractérisé par points expérimentaux placés au milieu des arêtes de Chacun du cube, avec douze essais à lequel sont rajoutés un ou plusieurs points centraux (dans notre cas trois points sont rajoutés).

4.8.4.4. Les entrées

Trois facteurs (X1, X2, X3) à trois niveaux (-1, 0 et +1) sont appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de la poudre d'écorce de grenade. Les résultats de ces trois facteurs sont résumés dans le tableau 4.4 :

Tableau 4.4 : Plan d'expériences factoriel complet à trois niveaux

Numéro	Concentration du solvant	Temps	Température
1	20	60	50
2	50	120	70
3	80	90	70
4	80	120	50
5	50	120	30

6	20	120	50
7	50	90	50
8	50	60	30
9	50	90	50
10	20	90	30
11	80	60	50
12	20	90	30
13	50	60	70
14	50	90	50
15	80	90	70

Dans ce type de plan d'expérience, chaque facteur nécessite 3 niveaux qui sont -1, 0 et 1 (tableau 4.4), et le domaine expérimental est de forme cubique. Le plan Box-Benhken choisi est à 3 niveaux et 3 variables indépendantes. Chacun de ces trois facteurs, possède trois niveaux donc réalise $3^3=27$ expériences.

Pour notre cas, nous avons utilisé un plan Box-Benhken à 3 niveaux et 3 variables indépendantes : la concentration du solvant (X1 de 20 à 80 %), Température (X2 de 30 à 70°C) et le temps d'extraction (X3 de 60 à 120 mn), ce qui donne 15 combinaisons. Les caractéristiques de la matrice d'expérience sont représentées par le tableau 4.4.

4.8.4.5. Les sorties

Les réponses considérées sont le rendement en polyphénols totaux (PTT,) et l'activité antioxydante des extraits (AA).Le choix du modèle mathématique pour une optimisation des réponses est modèle est un modèle du second degré, et la matrice d'expérience du plan Box-Behnken obtenu est représenté dans le tableau 4.5 :

Tableau 4.5 : Présentation de la matrice d'expérience avec niveaux codés

Numéro	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	0	1	1
3	1	0	1
4	1	1	0
5	0	1	-1
6	-1	1	0
7	0	0	0
8	0	-1	-1
9	0	0	0
10	-1	0	-1
11	1	-1	0

12	1	0	-1
13	0	-1	1
14	0	0	0
15	-1	0	1

Pour ce modèle, ils sont définies par la réponse Y (variable de sortie) correspond à un paramètre de sortie. Trois réponses ont été choisies concernant l'extraction de la poudre de l'écorce de grenade : (Y1) le taux de polyphénols totaux, et (Y2) le pourcentage d'activité antioxydante qu'on devra maximiser.

4.9. Activité biologique des extraits de la bagasse de grenades

Le Test d'inhibition de l'œdème de la patte du rat à la carragénine a été réalisé sur l'extrait éthanolique de résidu d'extraction du cultivar Bordj Mira n°11 pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire.

4.9.1. Animaux

Les rongeurs sont les animaux idéals qui présentent une organisation physiologique comparable à celle des humains [183]. Leur critère de disponibilité et de coût les rendent les plus utilisées dans les études in vitro au niveau des laboratoires expérimentaux. Dans notre étude, nous avons choisi des souris, souche « Swiss albinos », de sexe mâle et femelle, pesant 20 ± 5 g fournies par l'Institut Pasteur d'Alger.

Ces animaux provenant d'un élevage de l'animalerie de CRD. Elles sont maintenues dans un local d'expérimentation à $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ et 70 % d'humidité ambiante dans un éclairage naturel du jour (6h à 18h) et obscurité le soir (18h à 6h).

Avant l'expérimentation, les souris ont été mises à jeun pendant 16 heures avec accès libre à l'eau. Ils ont été répartis en trois lots de 5 souris.

4.9.2. Prétraitement

Une heure avant l'injection de la carragénine, un effectif de 15 souris est divisé en 3 lots. Deux lots et un lot témoin sont traités. Les souris ont été mises à jeun pendant 18h avant l'expérimentation.

Chaque groupe reçoit par voie orale 10 ml/Kg de poids corporel par gavage à l'aide d'une sonde gastrique :

- Lot témoin (I) : reçoit un 1ml une solution de NaCl (0,9%) par voie orale.
- Lot standard (II): reçoit 1 ml d'un produit anti-inflammatoire de référence. (diclofénac) à la dose de 10mg/Kg dissous dans du NaCl 0,9%).

- Lot testé (III) : reçoit 10 ml d'extrait éthanolique de *Punica granatum* à une dose de 100mg / kg dissous dans du NaCl 0,9%).

4.9.3. Induction de l'inflammation

L'inflammation induite par l'injection d'une solution de carragénine à 1 % chez les souris a été évaluée selon la méthode d'ADEYEMI et *al.* [184]. L'administration de cette solution entraîne une augmentation significative du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris témoins à partir de la première heure de l'expérimentation.

4.9.4. Injection de la carragénine

Une heure après l'administration de l'extrait et du diclofenac sodique, chaque animal reçoit une injection dans la patte postérieure droite de 0,1 ml de carragénine à 1% (dissous dans du NaCl 0,9%).

4.9.5. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire :

• Mesure de l'œdème

L'œdème causé par la carragénine sera traduit par la mesure du volume de la patte à des intervalles d'une heure pendant quatre heures. L'évolution de l'œdème de la patte droite a été déterminée à 1 h, 2h, 3h et 4h.

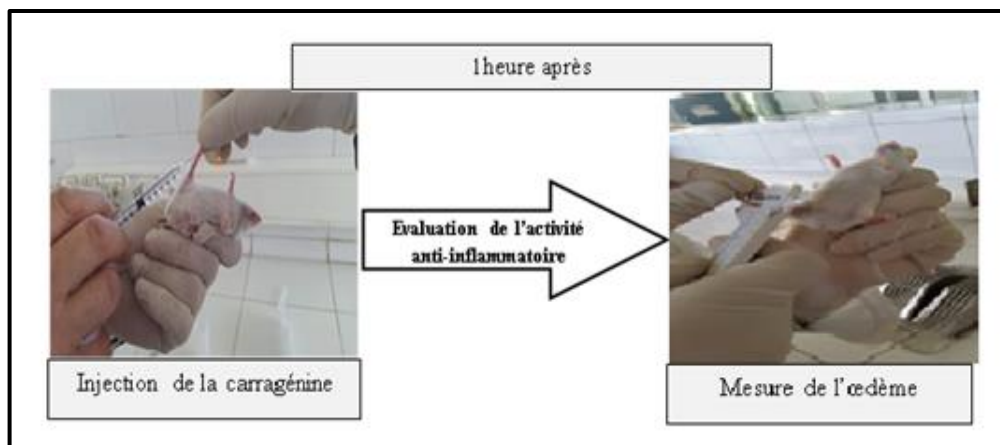


Figure 4.12. : Injection de la carragénine et mesure du gonflement de la patte

- Calcul du pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG)

Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris [185]. Il est donné par la formule suivante :

$$AUG(\%) = \frac{D_n - D_0}{D_0} \times 100$$

Avec

AUG : pourcentage de l'augmentation de l'œdème.

Dn : diamètre de l'œdème de la patte 1heure après l'injection de la carragénine.

D0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

- Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH) :

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin [185]. Il est obtenu par la formule suivante :

$$\% \text{ INH} = \frac{\% \text{ AUG T} - \text{AUG Tes}}{\text{AUG T}} \times 100$$

Avec :

AUGT : Pourcentage d'augmentation de l'œdème du lot témoin.

AUGTes : Pourcentage d'augmentation du lot testé.

4.10. Analyse statistique

Les résultats des différents dosages sont représentés comme la moyenne \pm l'écart type d'au moins trois essais. Les valeurs sont analysées au moyen du test de l'analyse de variance (ANOVA) à 1 facteur suivi par le test T(Turkey) avec le logiciel STATISTICA 10. Les résultats sont considérés comme significativement différents à $p < 0,05$.

Les données recueillies par l'enquête ont été traitées avec le logiciel STATISTICA 10 en utilisant l'Analyse en Composantes Principales(ACP). L'identification des individus, l'analyse des variables qualitatifs et quantitatifs ainsi que les graphiques ont été traités par Excel 2007.

D'une autre part, les résultats expérimentaux obtenus par le plan d'expérience Box- Benhken sont analysés par le même logiciel.

La comparaison des pourcentages moyens d'augmentation et d'inhibition a été faite avec le *test T de Turkey*. Une différence significative est représentée par un $p < 0,05$; $n = 5$, représente le nombre d'expériences par groupe.

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce travail, notre objectif a été basé sur l'extraction des composés phénoliques en vue de donner plus d'information sur leur teneur dans les différents dérivés du fruit du grenadier de la région de la Mitidja, des résultats d'une enquête de perception sur ce fruit seront présentés dans ce chapitre.

5.1. Perception sur l'utilisation thérapeutique de l'écorce de *Punica granatum L.*

Il s'agit de la première étude ethnopharmacologique en Algérie qui s'est intéressée au fruit de *Punica granatum L.* encore dit "roumane" particulièrement, très utilisée notamment en consommation fraîche et dans les préparations culinaires et thérapeutiques.

Les résultats obtenus lors de notre enquête auprès des consommateurs et des herboristes de la région Nord d'Algérie, sont regroupés comme suit :

- Données ethnologiques (âge et sexe) et sociologiques (région) pour les deux types d'enquêtes.

- Données qualitatives relative au mode d'utilisation, efficacité du traitement pour le consommateur, et satisfaction du consommateur et disponibilité de la partie de la plante pour les herboristes ;

- Données quantitatives relatives à la dose, nombre de prise et durée du traitement pour le consommateur et prix /Kg pour l'herboriste.

5.1.1. Données ethnologique du consommateur

L'enquête a révélé une multitude de résultats sur l'utilisation de cette plante médicinale.

5.1.1.1. Age et sexe

Les résultats des données ethnologiques sont présentés en pourcentage par rapport au nombre total des consommateurs interrogés. Le tableau 5.1 présente la répartition de l'ensemble de l'âge et du sexe des consommateurs interrogés :

Tableau 5.1 : Répartition des consommateurs interrogés en pourcentage selon le sexe et l'âge

Questions	Répartition	Pourcentage (%)
Sexe	Masculin	47
	Féminin	53
Age	21 - 35 ans	4
	36 - 45 ans	44
	49 - 60 ans	52

○ Répartition selon le sexe

La répartition des consommateurs interrogés selon le sexe a montré une légère prédominance avec 24 femmes, soit un pourcentage de 53% par rapport à 22 hommes, soit 47% de l'ensemble. Notre échantillon paraît plus ou moins équilibré, les femmes ont été concernées par ce mode de traitement beaucoup plus que les hommes, du fait que les femmes sont plus utilisatrices de ce fruit en médecine traditionnelle vu leurs responsabilités en donnant les premiers soins aux membres de leurs familles.

Dans cette région d'étude, les deux sexes s'intéressent à l'utilisation de l'écorce du fruit de grenade en médecine traditionnelle. La connaissance des propriétés et usages des plantes médicinales sont généralement acquises suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. L'étude est cohérente avec celle de BAKIRI et al [186] ou dans la région de M'sila, les femmes utilisent les plantes médicinales au même titre que les hommes 52,38% contre 47,62 % respectivement.

Cela pourrait s'expliquer par la fréquence relative à l'analphabétisme des femmes dans notre société, leur engagement aux savoirs traditionnels. En tant qu'incitation supplémentaire, la guérison avec des plantes s'ajoute au statut des femmes comme connaisseuses et qui sont principalement impliquées dans leurs tâches ménagères pour donner les premiers soins en particulier pour leurs enfants.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par ARIBI et al [187] et par EL HAFIAN et al [188].

○ Répartition selon l'âge

D'après les résultats du tableau 5.1, l'âge moyen de l'utilisation de cette plante est de 21 ans. Elle est utilisée par des tranches d'âge différentes, et y répandue chez la tranche d'âge de 21- 53 ans qu'ils ont tendance à croire plus en cette médecine traditionnelle.

L'utilisation de l'écorce de grenade note aussi une richesse d'informations sur cette plante, par eux, ce qui s'explique qu'ils ont tendance à croire plus en cette médecine traditionnelle.

La connaissance des usages des plantes médicinales et leurs propriétés, est généralement acquise suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. La transmission de cette connaissance est actuellement en danger parce qu'elle n'est pas toujours assurée. Nos résultats sont conformes avec ceux de BAKIRI et al [186] et en contradiction avec ceux d'ALAOUI et LAARIBYA [189] qui disent que le faible intérêt pour les effets thérapeutiques des plantes est marqué chez les personnes de tranche d'âge de 21 à 30 ans, s'explique par leur incrédulité qui a tendance à ne pas trop croire en médecine traditionnelle. Par ailleurs, les personnes âgées de 40 à 60 ans ont la plus grande fréquence d'utilisation des plantes aromatiques et médicinales avec un pourcentage qui s'évalue à 52 %.

5.1.1.2. Données qualitatives

L'étude ethnopharmacologique réalisée au niveau de la région de la Mitidja, montre l'importance de l'utilisation de la partie du fruit de la grenade dans le traitement thérapeutique. Son utilisation, son mode et l'efficacité de son emploi le goût, le prix et les précautions d'emplois sont pris en considération.

- Usage de la plante

Les plantes médicinales sont utilisées de par le monde, certains sont prises seuls, d'autre en association avec d'autres plantes.

En ce qui concerne l'usage de la plante, les résultats montrent que sur les 47 consommateurs interrogés, 32 utilisent l'écorce de grenade pour des fins thérapeutiques soit 66% et 15 consommateurs pour des fins thérapeutiques et cosmétiques soit 32%, et une personne pour l'usage cosmétique soit 2 %.

Ces données sont justifiées par le fait qu'au niveau de cette région le consommateur est intéressé par des traitements traditionnels pour soulager ses douleurs quotidiens (ulcères, Diarrhées) et ces remèdes sont la plupart héritées par leurs ancêtres.

- Etat de l'utilisation de la plante

L'enquête sur l'usage de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. par la population de la région de la Mitidja nous a permis sur les 47 consommateurs interrogés, l'utilisation de la partie de la plante est à 82% sous forme desséchée, 2% l'utilisent fraîche et 11% l'utilisent sous les deux formes. Cette utilisation des écorces de grenades à l'état desséché s'explique par leurs aptitudes de conservation durant la périodes de récolte ainsi que leurs disponibilités chez les herboristes durant toute l'année sachant que la grenade est un fruit saisonnier qui ne dure pas toute l'année.

- Mode d'utilisation

Le mode de préparation d'un produit thérapeutique peut avoir un effet sur la quantité du principe actif présent. La décoction, l'infusion, le cataplasme sont des modes de préparation qui facilitent l'administration de ces pelures en médecine traditionnelle.

Parmi les consommateurs interrogés, 72% utilisent l'écorce de grenade en infusion, 45% en décoction et 13% le consomment cru. En cherchant toujours la méthode la plus simple pour préparer les phyto-médicaments, l'infusion est le mode le plus utilisé dans la région. C'est la meilleure utilisation qui préserverait toutes les propriétés tout en permettant l'extraction et l'assimilation des principes actifs.

Les utilisateurs cherchent toujours la méthode la plus simple pour les préparer, ce qui confirme la dominance du mode infusion dans notre cas.

○ Degré d'efficacité du traitement

Comme le recommande l'OMS [190], la validation de l'usage des drogues végétales comme remède traditionnel dans le traitement de certaines maladies devrait passer par l'évaluation de leur efficacité, de leur innocuité et la standardisation de leur emploi. Le fruit du grenadier comme toute autre plante médicinale peut offrir une large réponse aux problèmes de santé, et des perspectives thérapeutiques pour une meilleure prise en charge. Elle peut mener à une amélioration ou tout simplement à une complète guérison. Dans cette étude, le consommateur par son utilisation des écorces de grenades souhaite arriver à un taux de guérison plus efficace sans effets secondaires.

D'après les résultats obtenus l'utilisation de l'écorce de grenade mène à une amélioration de l'état du malade chez 89% des consommateurs, et chez 11 %, il peut mener à une guérison.

Le tableau 5.2 présente des informations sur le goût, le prix et les précautions d'utilisations des écorces de grenades.

Tableau 5.2 : Informations sur le goût, le prix et les précautions d'utilisation des écorces de grenades

Questions	Répartition	Pourcentages (%)
Précaution d'emploi	Oui	28
	Non	72
Gout de la plante	Amer	85
	Acide	15
Prix	Pas cher	79
	Pas de réponses	21

○ Précaution d'emploi

Les plantes médicinales ont des effets indésirables quand elles sont pratiquées de façon incorrecte par les patients. De ce fait, la médecine douce doit être pratiquée avec précaution et à l'intérieur des paramètres et des mesures bien précises [191]. Les usagers de la médecine traditionnelle ignorent tout sur la toxicité de ces plantes.

Des études menées par BENKHNIGUE *et al* [192] confirment que 8% des personnes pensent que le traitement par plantes médicinales provoque des effets

secondaires et des états de toxicité. Les résultats du tableau 5.3 montrent que 72% des personnes interrogées ne prennent pas de précautions pour l'utilisation de l'écorce de grenade, les 28% restants disent qu'il suffit de ne pas en abuser dans l'utilisation de ces écorces. A partir de là, il est recommandé de consulter des spécialistes en thérapie en cas de doute sur les indications thérapeutiques (dosage, durée ...).

○ Gout de la plante

L'écorce de grenade se caractérise par un gout légèrement amer et astringent, qui est attribué essentiellement aux principaux antioxydants retrouvés dans la grenade, les tannins et l'acide ellagique. Les tannins confèrent un goût amer des dérivés de la grenade et aux membranes blanches qui entourent les graines.

Les résultats de notre enquête montrent que 85% des consommateurs interrogés répondent par la présence d'un goût amer chez l'écorce de grenade, les 15% restants disent qu'il a un goût acide.

Pour les décoctions et les extraits aqueux de l'écorce de grenade, cette action fortement astringente (amère et acide), peut réduire les inflammations de l'estomac irrité par une production excessive de suc gastrique par leurs tanins qui freinent cette production.

○ Appréciation du prix

En Algérie, les herboristes restent les acteurs les plus proches des consommateurs et des clients dans l'achat de leurs plantes médicinales, ayant pour rôles en plus de leur fonction de commerçant, détaillant, intermédiaire, conseillé en médecine traditionnelle et populaire.

Les plantes vendues n'ont pas de prix fixe, l'informel existe toujours dans ce marché. Les résultats du tableau 5.2. montrent que 79% des consommateurs trouvent que le prix des écorces de grenade est abordable et pas cher, les 21% restants n'ont pas manifestés.

5.1.1.3. Données quantitatives

La dose utilisée, le nombre de prise par jour, et la durée de traitement sont des paramètres considérés comme quantitatives. Une similarité entre ces trois variables est établie en fixant des groupes de consommateurs concernant l'utilisation de ces écorces de grenades.

Pour cela, et afin de déterminer les facteurs qui devraient être conservés dans la structure finale, un tableau de la variance totale est utilisé pour le dépouillement de ces données qualitatives et une analyse en composantes

principales (ACP) (**Appendice F, tableau F 1**), par le logiciel STATISTICA 10 a été utilisée (**Appendice G, tableau G 1**).

Cette méthode consiste à transformer des variables liées entre elles (dites « corrélées » en statistique) en nouvelles variables décorrélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées « composantes principales », ou axes principaux. Elles permettent de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante.

Pour mieux visualiser les corrélations entre les différentes variables (47 variables) et afin d'éventuellement limiter le nombre de variables à mesurer par la suite, l'Analyse en Composante Principales (ACP) est réalisée. Le tableau de coordonnées factorielles des cas étudiés, basées sur des corrélations (consommateurs) est présenté (**Appendice F, tableau F1**).

Les axes principaux sont définis par la matrice des vecteurs propres de la matrice des corrélations des variables initiales. Cette matrice permet de représenter les variables initiales sur un, deux, trois axes ou même plus. Le tableau 5.3 présente les Coordonnées factorielles des variables, basées sur des corrélations :

Tableau 5.3 : Coordonnées factorielles des variables, basées sur des corrélations

Variable	Facteur1	Facteur 2	Facteur3
Dose utilisée	0,609243	0,750289	-0,256690
Nombre de prise	-0,638283	0,567190	0,520471
Durée de traitement	-0,672846	0,141311	-0,726161

L'examen du tableau 5.3 montre que la variance des variables quantitatives est de 0,75 sur le premier axe (c'est la variance maximale), et de 0,57 sur le deuxième axe. La part de toute l'information initiale visible (qualité de représentation) sur le plan principal est de l'ordre de 71,19 %. Chaque axe a été caractérisé par des descripteurs ayant une corrélation supérieure à 0,30 (en valeur absolue). Selon la littérature SANTOS [193], un axe donné est caractérisé par des variables qui ont les plus forts coefficients de corrélation (en valeur absolue).

La figure 5.1 montre la projection des trois variables étudiées "dose utilisée, nombre de prise par jour, et durée de traitement.

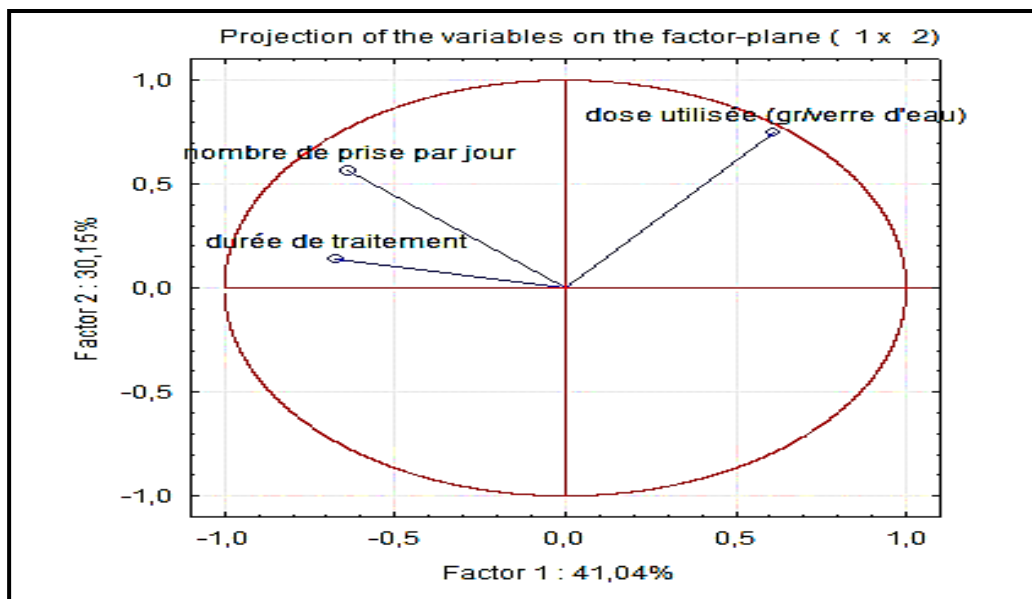


Figure 5.1 : Présentation des variables sur l'axe de corrélations

Pour les variables du plan principal, ils sont présentés par la matrice des vecteurs propres. Le cercle des corrélations sur le plan principal montre que ces trois variables sont situées sur la même direction et le même sens.

L'axe 1, horizontal décrit un pourcentage de 41,04 % de la variation totale, le deuxième axe vertical décrit un pourcentage de 30,15 % de la variation totale.

La répartition dans le plan défini par les axes 1 et 2 est présentée par la figure 5.2.

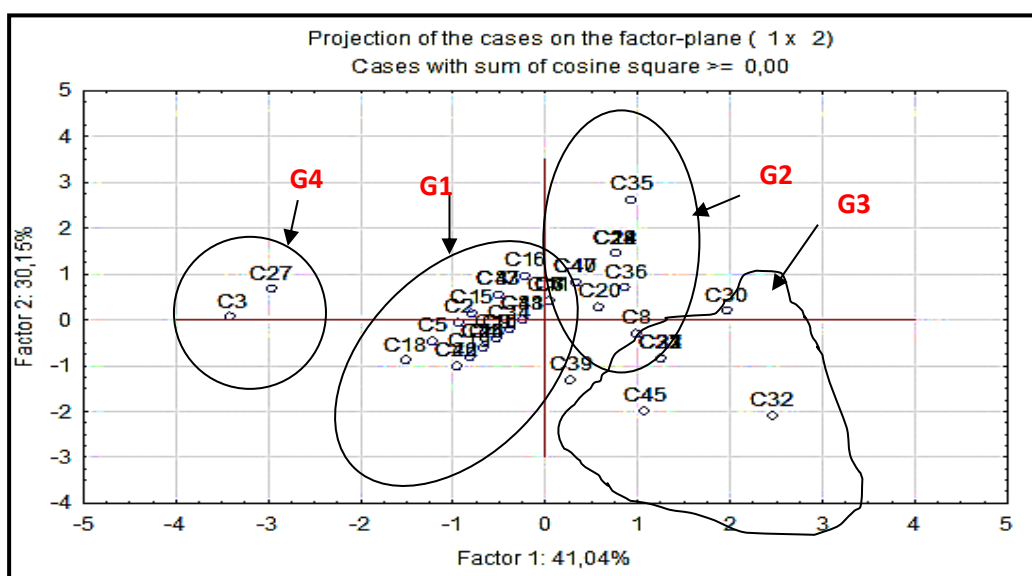


Figure 5.2 : Répartition des individus dans le plan défini par les axes 1 et 2

(C : consommateur)

La projection des individus présentée par la figure 5.2, montre que les individus sont répartis en 4 groupes :

- Le premier groupe (G1) contient 33 consommateurs ce qui correspond à 70% environ de la population enquêtée, ces individus consomment modérément, utilisent une dose moyenne (9 gr/verre d'eau environ) et un nombre de prise moyen (2 prises/jour).
- Le deuxième groupe (G2) contient 4 consommateurs (8% environ) qui utilisent une dose élevée et un nombre de prise faible.
- Le troisième groupe (G3) contient 7 consommateurs qui utilisent une faible dose et un nombre de prise bas, cela est dû peut être à l'ignorance de certains consommateurs.
- Le quatrième groupe (G4) contient deux consommateurs (C3 et C27) qui utilisent faible dose et un nombre de prise élevé.

Les résultats montrent que l'ensemble des groupes constitués, utilisent l'écorce de grenade comme traitement thérapeutique et préventif mais à des doses différentes.

5.1.2. Enquête herboriste

Nous avons inclus un nombre de 26 herboristes exerçants d'une façon légale dans les régions des deux wilayas enquêtées Alger et Blida. Des questionnaires leurs ont été distribués.

5.1.2.1. Données ethnologiques (âge et sexe)

Les résultats des données ethnologiques sont présentés en pourcentage par rapport au nombre total des herboristes. Selon EL YAHYAOUÏ *et al* [194] dans une étude au niveau de la province de Laayoune (capitale du Sahara Marocain), trouvent que la plus grande partie des informations recueillies concernant l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales sont originaires des herboristes, avec un pourcentage de 54%. Pour notre étude, le tableau 5.4 présente la répartition de l'ensemble âge et sexe des herboristes interrogés.

Tableau 5.4 : Répartition des herboristes interrogés en pourcentage selon le sexe et l'âge

Type de Caractère	Répartition	Pourcentage
Sexe	Masculin	88
	Féminin	12
Age	30 -39 ans	65
	40-47 ans	35

- Répartition selon le sexe

D'après les résultats du tableau 5.4, on remarque que la répartition est différente entre les hommes et les femmes. En effet très peu de femme exerce la fonction d'herboriste dans notre région étudiée. Notre échantillon est plus favorisé par les hommes avec 88% qui sont des herboristes. Le sexe féminin pour cette fonction est peu marginalisé. Les femmes utilisent souvent des plantes médicinales en se basant par le bouche-à-oreille ou par l'auto-prescription.

Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par JANDI [195] pour une enquête réalisée dans la région de Beni Mellal(Maroc) et qui montre que la majorité des herboristes était de sexe masculin (89%), soit 24 herboristes de sexe masculin et 3 herboristes de sexe féminin.

Par ailleurs, une autre enquête réalisée auprès des herboristes au niveau de la province de Laayoune a montré que les deux sexes femmes et hommes exercent la médecine traditionnelle. Cependant, le sexe féminin prédomine avec un pourcentage de 67,67%. Par ailleurs, ce pourcentage est seulement de 32,33% chez le sexe masculin [1976].

- Répartition selon l'âge

Les résultats du tableau 5.4 montrent que la grande majorité des herboristes (65%) ont un âge qui varie de 30 – 39 ans. Un pourcentage plus faible (35 %) est considéré par la tranche d'âge de 40 - 47ans. A partir de ces résultats, on peut dire que les nouvelles générations ont redécouvrent les vertus des plantes médicinales.

Nos résultats sont en accord avec de JANDI [195] dont les extrêmes d'âges des herboristes variaient entre 27 et 65 avec une moyenne d'âge de 47 ans, la majorité d'entre eux (19 herboristes soit 70%) appartenait à la tranche d'âge (30-50 ans).

En Algérie et par absence de cadre législatif obsolète, il résulte que les herboristes algériens exercent en réalité dans une semi-clandestinité.

5.1.2.2. Données qualitatives

L'étude ethnopharmacologique réalisée au niveau de la région de la Mitidja, montre l'importance de l'utilisation de la partie du fruit de la grenade dans le traitement thérapeutique. Son utilisation, son mode et l'efficacité de son emploi le goût, le prix et les précautions d'emplois sont pris en considération

- Usage de la plante

Les plantes médicinales sont utilisées de par le monde, certains sont prises seuls, d'autre en association avec d'autres plantes.

En ce qui concerne l'usage de la plante, nos résultats montrent que sur les 47 consommateurs interrogés, 32 utilisent l'écorce de grenade pour des fins thérapeutiques soit 66% et 15 consommateurs pour des fins thérapeutiques et cosmétiques soit 32%, et une personne pour l'usage cosmétique soit 2 %.

Ces données sont justifiées par le fait qu'au niveau de cette région le consommateur est intéressé par des traitements traditionnels pour soulager ses douleurs quotidiens (ulcères, Diarrhées) et ces remèdes sont la plupart héritées par leurs ancêtres.

L'utilisation médicale de la grenade remonte à plusieurs décennies mais ce n'est que très récemment que l'on a redécouvert son efficacité à prévenir toute une série de pathologies potentiellement mortelles. En Afrique, l'écorce de grenade est utilisée pour soigner les diarrhées.

- Etat d'utilisation de la plante

L'enquête sur l'usage de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. par la population de la région de la Mitidja nous a permis sur les 47 consommateurs interrogés, l'utilisation de la partie de la plante est à 82% sous forme desséchée, 2% l'utilisent fraîche et 11% l'utilisent sous les deux formes. Cette utilisation des écorces de grenades à l'état desséché s'explique par leurs aptitudes de conservation durant la périodes de récolte ainsi que leurs disponibilités chez les herboristes durant toute l'année sachant que la grenade est un fruit saisonnier qui ne dure pas toute l'année.

- Mode de préparation

Plusieurs modes sont utilisés pour des fins thérapeutiques de l'écorce de grenade. Les résultats de ces modes que les herboristes préconisent au consommateur sont donnés par la figure 5.3 :

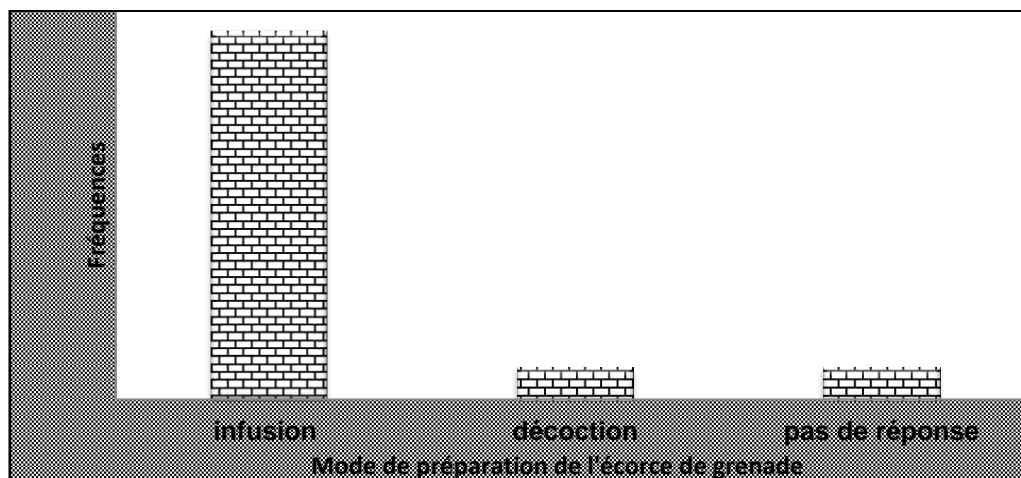


Figure 5.3 : Mode de préparation de l'écorce de grenade

D'après les résultats ci-dessus, 85% des herboristes conseillent leurs clients de préparer l'écorce de grenade en infusion, 7% de le préparer en décoction alors que 7 % non pas voulu de divulguer de ces informations.

L'écorce du fruit est utilisée comme remède traditionnel contre la diarrhée. Les tanins ellagiques concentrés de l'écorce de grenade possèdent, en outre, un pouvoir antiseptique contre certains germes ainsi que des agents infectieux de la malaria [176].

- Satisfaction du consommateur

Les résultats de la satisfaction du consommateur ou client a été donnée par les herboristes enquêtées selon les résultats de la figure 5.4 :

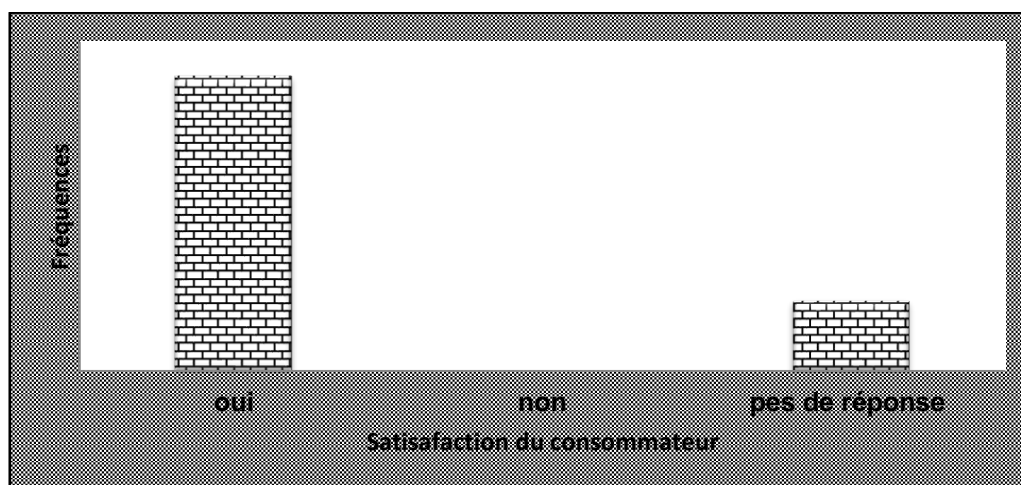


Figure 5.4 : Satisfaction du consommateur auprès de l'herboriste

Selon ces résultats, un pourcentage de 81% des herboristes ont évoqués la satisfaction des consommateurs alors que les 19% restants non pas voulu donné de réponses.

La satisfaction des utilisateurs quant à l'usage de l'écorce de fruit de *Punica granatum* a été notée lors de cette enquête suite à l'effet provoqué par l'utilisation de ces écorces et d'absence d'effet indésirable ou de toxicité.

- Disponibilité :

Sur la question de la disponibilité ou non de ces écorces et leur facilité de procuration, les résultats ont été comme ils sont présentés par la figure 5.5 et qui montrent que l'écorce de grenade est disponible toute l'année chez 62% des herboristes alors qu'il existe une pénurie en été et selon 38% des herboristes.

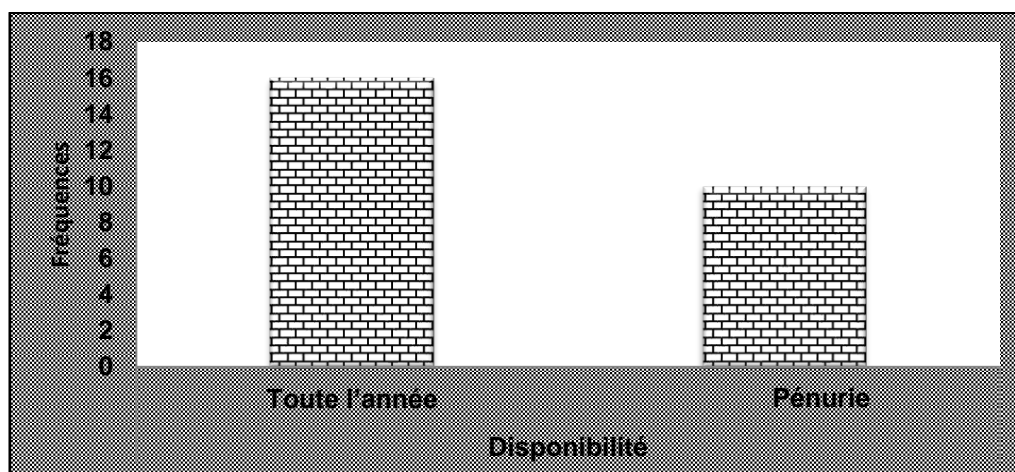


Figure 5.5 : Disponibilité des écorces de grenades

Cette pénurie revient au fait que dans la saison de récolte de la grenade se situe entre le mois de Septembre et Novembre en Algérie.

Pour les variétés de grenades vendues chez les herboristes de la région de la Mitidja, les résultats du tableau 5.5 montrent que pour le traitement thérapeutique la variété « El kares » est la variété vendue par 46% des herboristes questionnés, 35% vendent un mélange de variété alors 19% n'ont pas donné de réponses.

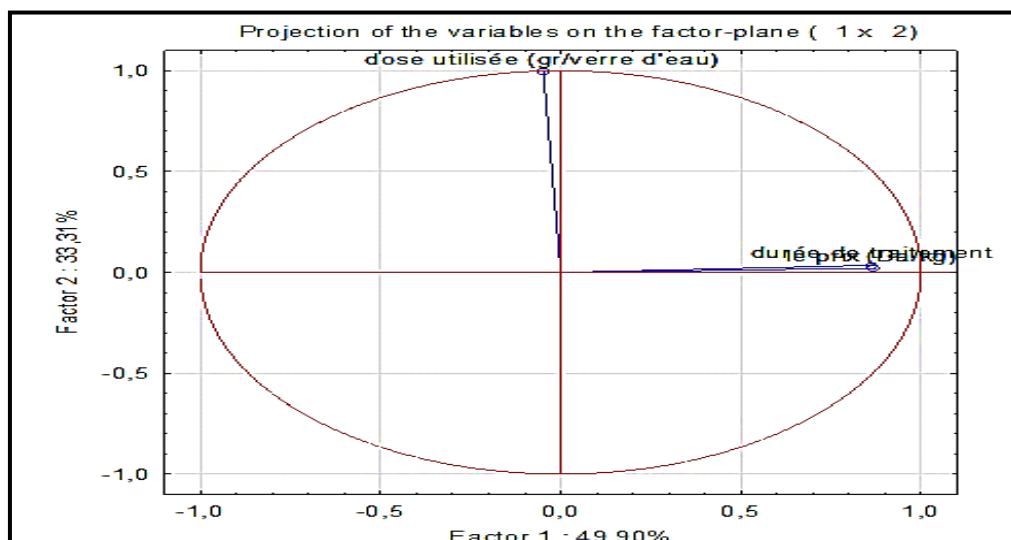
Tableau 5.5 : Type de grenades vendues par les herboristes

Réponses	mélange de variétés	Variété El kares	pas de réponse
Effectifs	34,62	46,15	19,23
Fréquences (%)	9	12	5

5.2.3. Données quantitatives

Les variables quantitatives, à savoir : le prix, la durée de traitement et la dose utilisée exprimée en g/verre d'eau) ont été analysées par ACP (STATISTICA 10), les résultats obtenus sont représentés dans **l'Appendice F (tableau F 2)**.

Pour les variables sur le plan principal, ils sont présentés par la matrice des vecteurs propres. Le cercle des corrélations sur le plan principal (figure 5.6) montre que les variables : " Dose utilisée (g/verre d'eau), durée de traitement (jour) et Prix (Da/kg) sont situées des directions différentes



Figures 5.6 : Présentation des variables sur l'axe de corrélation

Pour la projection des individus, et à partir des résultats présentés par la figure 5.7, on distingue que les deux variables : durée de traitement et le prix sont identiques et sur le même point.

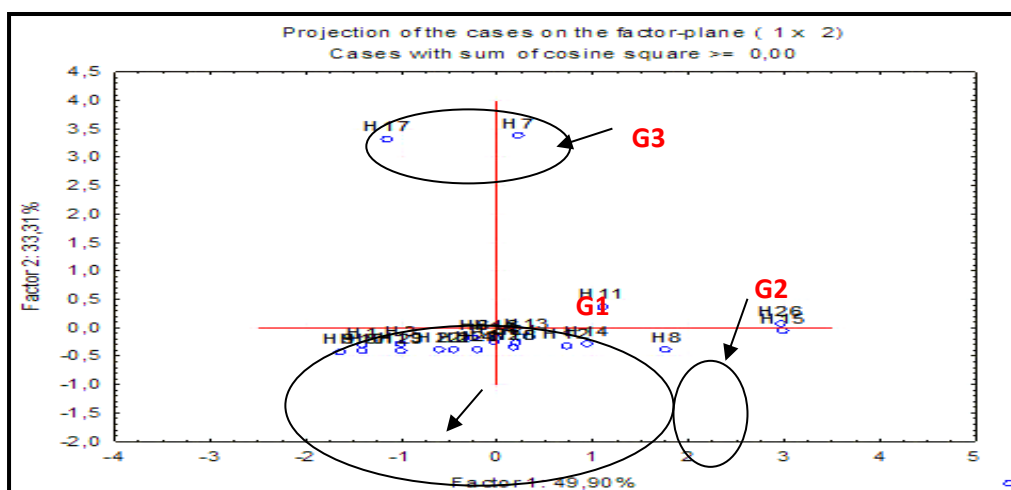


Figure 5.7 : Répartition des individus dans le plan défini par les axes 1 et 2

Selon la projection représentée dans la figure 5.7 on constate que les individus sont répartis en 3 groupes :

- Le premier groupe contient 22 herboristes ce qui représente 84 % de la population enquêtée qui sont proches de la moyenne, ils vendent à un prix moyen (environ 613 Da/kg), et prescrivent une dose moyenne d'utilisation (environ 16 g/verre d'eau), ce groupe représente une grande partie de la population enquêtée.
- Le deuxième groupe contient 2 herboristes (ce qui correspond à 7.7% de la population enquêtée) qui vendent à un prix élevée et préconisent une dose d'utilisation basse, cela peut être expliqué par le fait que ce sont des herboristes modernes.
- Le troisième groupe réunit les 2 herboristes n° 7 et 17 (ce qui correspond à 7.7% de la population enquêtée) qui vendent à un prix faible et préconisent une dose élevée d'utilisation.

5.3. Caractéristiques morphologiques et physicochimique des trois cultivars de grenades

5.3.1. Caractéristiques morphologiques du fruit de la grenade

Les caractéristiques morphologiques des fruits des trois cultivars de grenades étudiés, cultivés sur un sol homogène sont indiquées dans le tableau 5.6.

Tableau 5.6 : Caractéristiques morphologiques de fruits trois cultivars de grenades algériennes

Cultivar	Doux de Koléa	Doux de Messaad	Bordj Mira n°11
Pf_m	175,83±1,62 ^{ac}	241,33±0,03 ^b	183,69 ± 1,08 ^{cb}
Df_m	7,26±0,23 ^a	8,54±0,27 ^c	7,64±0,03 ^b
LTf_m	8,07±0,58 ^c	8,82±0,01 ^a	8,27±0,12 ^{ba}
LC_m	1,51±0,12 ^a	2,26±0,02 ^c	1,60±0,01 ^{ba}
Dc_m	1,72±0,15 ^c	1,46±0,05 ^a	1,52±0,11 ^b
PEc_m	65,50±0,92 ^a	102,64±1,42 ^c	69,44±0,91 ^b
PME_m	4,70±0,03 ^b	3,87±0,03 ^a	6,54±0,30 ^c
EEc_m	0,08±0,06 ^{ba}	0,05±0,06 ^a	0,09±0,01 ^{cb}
RdtE_m	37,25± 0,06 ^a	42,53±0,08 ^b	37,80 ^b ±0,03 ^a

Abréviation : Pf :poids de fruit, Df :diamètre de fruit, LTf :longueur totale fruit, LC :longueur calice, Dc :diamètre calice, PEc : poids de l'écorce, PMC : poids des membranes capillaires, EE :épaisseur de l'écorce, Rte : rendement de l'écorce. Les valeurs portant la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$) et les résultats sont classés par ordre croissant ; $a < b < c < d$.

D'après les résultats donnés par le tableau 5.6, les caractéristiques morphologiques des trois cultivars de grenades ont révélé une différence significative entre les fruits ($P < 0,05$), cette différence a affecté tous les paramètres tels que le poids, le diamètre et longueur du fruit. L'écorce a aussi montré une différence significative ($p < 0,05$).

Le poids moyen du fruit de la grenade entière pour les trois cultivars variait de $175,83 \pm 1,62$ à $241,33 \pm 0,03$ g, tandis que celui des écorces varie entre $65,50 \pm 0,92$ et $102,64 \pm 1,42$ g. La longueur totale et le diamètre du fruit varie $8,07 \pm 0,58$ - $8,82 \pm 0,01$ et $7,26 \pm 0,23$ - $8,54 \pm 0,27$ respectivement.

Le poids moyen du fruit de grenade est plus élevé pour le cultivar Doux de Messaad et il est plus faible pour le cultivar Doux de Koléa. Le poids des fruits est considéré comme un paramètre important pour le consommateur.

Selon les critères rapportés par MARTINEZ et al [36] pour des cultivars espagnols, nos fruits sont classés comme de taille moyenne. Le poids est une caractéristique variétale qui peut fluctuer en fonction du cultivar et des conditions écologiques [16].

Les trois cultivars de fruits ont un poids moyen plus ou moins différent, tandis que leur récolte a été faite à la même période, dernière semaine de mois de Septembre.

Dans leurs études sur des différents cultivars, plusieurs auteurs ont présenté des résultats qui concordent avec les nôtres. H'MID [174], a enregistré des valeurs variables entre 206,6 et 506,67g pour des cultivars Marocains, ZAREI et al [197] ont montré un poids variable entre 210,17 et 358,60 g pour des cultivars libanais. Cela fait inspirer que le poids des fruits à maturité dépend du cultivar qui sont des informations précieuses pour les agriculteurs et les professionnels de la filière [21].

D'un autre côté, plusieurs autres études ont montré une variation des plus importantes paramètres morphologiques qui caractérisent la grenade. Le poids varie entre 125 et 400,74 g [38,39, 202,197]. Nos cultivars se classent dans cette marge et la variation du poids des fruits est principalement influencée par le génotype. Les conditions pédoclimatiques qui peuvent aussi jouer un rôle important. Leur taille est un trait important qui attire le consommateur pour le marché du frais

Le diamètre et la longueur moyenne des trois cultivars présentent une forte corrélation ($P < 0,05$) avec le poids moyen des grenades.

Il existe une relation entre le poids du fruit et son diamètre. La longueur et le diamètre du fruit augmentent pendant leur développement et leur maturation, alors que le diamètre du fruit augmente plus vite que la longueur [13].

ORHAN *et al* [27] et DANDACHI *et al* [133] ont signalé que cette connaissance est particulièrement pertinente dans la conception ou la sélection de l'emballage approprié pour la manipulation et le stockage des fruits.

La longueur moyenne du calice des trois cultivars varie de 1,51- 2,62 cm alors que le diamètre moyen du calice se situe entre $1,51 \pm 0,12$ - $1,72 \pm 0,15$ cm. Ainsi, la dimension du calice est une caractéristique spécifique de chaque cultivar étudiée.

Nos résultats sont comparables avec ceux de TEHRANIFAR *et al* [202] qui a montré que la longueur et le diamètre du calice des fruits de la grenade cultivés en Iran se situent entre 1,57 – 2,4 cm et entre 1,46 - 19,68 cm respectivement.

Pour l'écorce, le poids moyen pour les trois cultivars se situe entre $65,50 \pm 0,92$ - $102,64 \pm 1,42$ g, celui des membranes internes varient entre $3,87 \pm 0,03$ - $6,54 \pm 0,30$ g.

L'épaisseur de l'écorce des fruits des trois cultivars varie de 0,05 pour Doux Messaad à 0,09 pour Bordj Mira. Les écorces de Bordj Mira sont plus épaisses ($0,09 \pm 0,01$ cm) par rapport à celles de Doux Messaad qui présente une écorce plus fine ($0,05 \pm 0,06$ cm).

Nos résultats sont proches de ceux trouvés par TEHRANIFAR *et al* [202] qui ont montré une variation de l'épaisseur de l'écorce entre 0,031- 0,053 mm et qui sont supérieurs à ceux rapportées par RADUNIC *et al* [203].

Le pourcentage des écorces pour les trois cultivars étudiés varie entre $37,25 \pm 0,06$ et $42,53 \pm 0,08$ %. Le fruit de Doux de Messaad présente un rendement plus élevé en écorces par rapport aux deux autres cultivars malgré leurs épaisseurs fines.

Les fruits de la grenade à écorce fine sont préférés par le consommateur en raison de leur facilité d'épluchage et la réduction des déchets de fruits.

Les résultats des caractéristiques morphologiques de fruits de ces trois cultivars de grenades montrent que chacun deux est différent pour la plupart des paramètres mesurés excepté le poids et la longueur moyens du fruit. Cette variation de caractères morphologiques entre les trois cultivars variation du poids de fruit dépend du cultivar et de son origine géographique.

Le cultivar de Doux de Messaad s'avère plus prometteur en combinant le poids et l'écorce du fruit qui sont une propriété très utile pour son développement avec un plus grand potentiel agricole.

5.3.2. Caractéristiques morphologique des arilles et pépins

Les arilles sont la partie comestible du fruit de la grenade contenant le jus, la pulpe et les pépins. La connaissance de leurs caractéristiques permet aux industries de transformation de mieux promouvoir ce fruit.

Le tableau 5.7 donne les caractéristiques morphologiques des arilles et des pépins de fruits de trois cultivars de grenades étudiés :

Tableau 5.7 : Caractéristiques morphologiques des arilles et pépins de fruit

Cultivar Paramètre	Abbréviation	Doux de kolea	Doux de Messaad	Bordj Mira n° 11
Arilles	PA_m	32±0,06 ^b	29±0,05 ^a	38±0,08 ^c
	La_m	10,41±0,83 ^{bac}	10,03± 1,25 ^{abc}	10,73±1,01 ^{cab}
	Da_m	6,43±0,86 ^{bac}	5,56±1,42 ^{abc}	7,63±0,65 ^{cba}
	Rdt_m	63,48±0,89 ^{bca}	68,55±2,60 ^{cba}	61,66±0,65 ^{abc}
Pépins	Pp_m	5 ±0,01 ^{ba}	3±0,01 ^{ab}	5±0,01 ^{ba}
	Lp_m	7,5±0,73 ^{ba}	7,32±1,27 ^{ac}	7,74±0,78 ^{cb}
	Dp_m	2,68±0,37 ^{ab}	2,86±0,52 ^{bc}	2,87±0,71 ^{ca}

Abréviation Pa :poids de l'arille, Da :Diamètre de l'arille, La:Longueur de l'arille, Ra :Rendement en arille,Pp :Poids de pépin, Dp :Diamètre de pépin, Lp :Longueur de pépin,. Les valeurs portant la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$). Ces résultats sont classés par ordre croissant ; $a < b < c < d$.

Les résultats obtenus des caractéristiques morphologiques des arilles ont révélé une différence significative ($p < 0,05$) pour la majorité des paramètres. En ce qui concerne les arilles et les pépins, la variété Bordj Mira présente les meilleures caractéristiques morphologiques pour tous les paramètres sauf le rendement des arilles qui apparait meilleur chez la variété de Doux de Messaad avec 68,55±2,60 %.

Le poids des arilles est meilleur pour la variété de Bordj Mira (38±0,08 g) suivi de celui de Doux de koléa (32 ± 0,06 g) et de Doux de Messaad (29 ± 0,05g).

Nos cultivars de grenade ont un poids moyen d'arille proche de ceux enregistrés pour des cultivars italiens [205] et qui se situent entre 30 et 60 g, de ceux D'ALCARAZ-MARMOL et *a* [204] pour des cultivars Espagnols, de HMID [174] pour les cultivars marocains.

Les cultivars Iraniens ont montré aussi un poids d'arilles proche de nos résultats obtenus avec une valeur de 21,00 g pour le cultivar «Ganesh» et 31,60 g pour celui de «Dholka» [202].

D'autre part, en observant la largeur de l'arille, les trois cultivars ont montré une différence significative ($p < 0,05$). Le cultivar de Bordj Mira avait des arilles plus longs ($10,73 \pm 1,01$ mm) et plus larges ($7,63 \pm 0,65$ mm).

Nos résultats sont similaires à ceux de plusieurs cultivars étrangers comme celle de l'Iran, Oman et l'Afrique du Sud [43, 206, 13].

Le rendement en arilles est une propriété très appréciée par le consommateur ainsi que par les industries de transformations des grenades [15].

Le cultivar de Doux de Messaad ($68,55 \pm 2,60$ %) présente un rendement en arilles meilleur que pour celui de Bordj Mira ($61,66 \pm 0,65$ %).

Ces valeurs sont comparables à ceux rapportés par TAHNARIFER et al [202] avec un rendement de $57,86 \pm 75,48\%$, pour les cultivars iraniens [46].

Le rendement en arilles de nos cultivars est plus élevé que celui trouvé par Hmid [6] pour des cultivars Marocain variant de 53,4 à 61,2%.

Les arilles ont une valeur économique présentant des traits très importants pour l'alimentation et la production industrielle [21].

Dans cette étude, les résultats des caractéristiques des arilles des trois cultivars de grenade montrent une similarité proche. Le cultivar de Doux de Messaad est le plus prometteur avec un rendement en arille plus élevé ($68,55 \pm 2,60\%$) par rapport à ceux de Doux de Koléa ($63,48 \pm 0,89\%$) et Bordj Mira ($61,66 \pm 0,65$ %).

Des études antérieures ont confirmé que le cultivar avec un pourcentage élevé en arilles a un grand potentiel d'utilisation en industrie de jus et de boissons et est également plus dégusté par le consommateur [26, 56].

MELGAREJO-SANCHEZ et al [32] ont indiqué que l'augmentation de la taille des fruits ne semble pas être une conséquence de l'amélioration de développement de la taille de l'arille ou son élargissement.

Par ailleurs, le poids moyen des arilles était mal corrélé au poids du fruit pour certains cultivars, indiquant que celui qui est plus lourd et plus gros, ne présente pas forcément d'arilles plus grands.

Pour les pépins et selon les résultats du tableau 5.6, le poids moyen, la longueur moyenne et le diamètre moyen variaient à partir de 0,03 à 0,05 g, 7,32 - 7,74 mm et 2,68 - 2,87 mm respectivement.

Nos résultats sont en concordance avec ceux des cultivars Marocains (3,8-4,5) pour le poids moyen, la longueur moyenne de 5,98 à 7,54 mm et de 2,18 à 2,90 mm pour leur diamètre moyen.

La caractérisation morphologique des trois cultivars locale de la région de la Mitidja nous ont permis de choisir le meilleur cultivar qui est représenté par Doux de Messaad connu par « Messaad » au niveau de cette région.

Ces attributs morphologiques peuvent être utilisés pour discriminer les cultivars et ils sont des facteurs importants qui doivent être pris en compte lors de la sélection du matériel utilisé pour établir des normes commerciales ou pour la conception de matériel de tri et d'emballage post-récolte. Nos cultivars sont caractérisés avec des calices semi -fermés et qui sont préférés car les fruits montrent une réduction des infections fongiques de fleurs et de couronnes de fruits dans le champ.

5.3.2 Caractéristiques physico- chimiques

5.3.2.1. Détermination du pH, de l'acidité titrable, du degré Brix et de l'indice de maturité des jus

Les résultats obtenus du pH, de l'acidité titrable (TA), du degré Brix (TSS) et de l'indice de maturité (IM) des trois cultivars de jus de grenade algériens sont présentés par le tableau 5.8 :

Tableau 5.8 : pH, acidité titrable (TA), solides solubles totaux (TSS), indice de maturité (MI) des jus de grenade algériens

Cultivars	pH	Extrait sec (MS/100 g)	Acidité titrable (g/ 100 ml)	Rendement en jus (%)	Indice de maturité (%)
Douxde Koléa	4,12 ± 0,13 ^a	15,8±0,53 ^a	0,27 ±0,034 ^a	57,33±0,12 ^{bc}	58,51±0,56 ^b
Douxde Messaad	3,89 ± 0,46 ^a	14 ± 0,95 ^a	0,70 ±0,034 ^a	62,36 ±0,11 ^c	20,0 ± 0,63 ^a
Bordj Mira 11	4,18 ± 0,24 ^a	15,5±0,53 ^a	0,24 ±0,06 ^a	42,90±0,11 ^a	64,58±0,60 ^c

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type (n = 3). Les moyennes avec les mêmes lettres dans la colonn verticale n'étaient pas statistiquement significatives ; Ces résultats sont classés par ordre croissant ; a<b<c<d.

L'analyse des résultats ne montre pas de variation significative entre les différents paramètres des jus des trois cultivars.

La valeur élevée du pH est observée pour le cultivar Bordj Mira avec une valeur de 4,18 ± 0,24 et celle qui est la plus faible est obtenue chez le cultivar Doux

de avec une valeur de $3,89 \pm 0,46$. Le cultivar de Doux de Messaad est plus acide par rapport aux deux autres cultivars.

Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par KALAYCIOGLU et *al* [207] qui ont enregistré un pH de 4,56 et ont signalé que le pH augmente lorsque la teneur en humidité décroît dans les arilles, ce qui conduit à un déséquilibre du processus d'oxydo-réduction. Ce phénomène mène vers une perte de la maturité de la membrane facilitant ainsi l'oxydation enzymatique de composés phénoliques en polymères de couleur brune et une création de réactions de brunissement dans les arilles. D'autre part TAHNIFAR et *al* [202] ont trouvé un pH situé entre 3,16 - 4,09. L'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration, FDA) a restitué un pH de 2,93 à 3,20 pour les parties comestibles de la grenade consommée au frais.

MARTINEZ et *al* [36] a révélé que le pH du jus de grenade est assez élevé au début de la formation du fruit et il diminue rapidement à partir du mois de juillet.

Cependant et après avoir comparé nos résultats avec ceux d'autres auteurs étudiants différents cultivars de grenades, des gammes de pH ont été trouvés et sont similaires aux nôtres, avec GADZE et *al* [208] qui ont montré un pH variant de 2,9 et 4,0; OZGEN et *al* [78] de 2,98 et 3,68; FERRARA et *al* [61] de 2,93 et 3,59; RADUNIC et *al* [203] de 2,81 à 3,90; et MELGAREJO-SANCHEZ et *al* [32] de 3,49 à 5,14.

Nombreux sont les facteurs tels que le cultivar des fruits, le stade de maturité, le post-récolte et la manipulation qui ont contribué aux variations de pH [79]. Les arilles de la grenade contiennent du jus, de la pulpe et la partie boisée (pépins) riche en plusieurs composés phytochimiques, mais l'un des plus importants traits du point de vue goût est leur contenu en solides solubles.

Dans notre étude, le Taux de Solides Solubles(TSS) varie de $14 \pm 0,95$ à $15,8 \pm 0,53^\circ$ Brix.

Il est plus élevé chez le cultivar Doux de Koléa avec une valeur de $15,8 \pm 0,53^\circ$ Brix et plus faible chez le cultivar Doux de Messaad avec de $14 \pm 0,95^\circ$ Brix.

Nos résultats se montrent en accord avec ceux obtenus par HMID [6] pour les 18 cultivars Marocaines qui présentent des valeurs comprises entre 12,33 et $17,07^\circ$ Brix et ceux des cultivars tunisiens rapportés par EL FALLEH et *al* [58] avec des valeurs qui se situent entre 12,90 et $16,63^\circ$ Brix. D'autres cultivars espagnols présentent une teneur en Taux de Solides Solubles variant entre 14,00–16,80% [74].

Ces différences peuvent être dû non seulement aux génotypes différents mais aussi à l'environnement et à la période de récolte [48].

Cependant, la valeur de TSS " $14 \pm 0,95$ " de nos cultivars correspond à la valeur minimale proposé par l'Association de l'industrie du jus et des nectars (AIJN), Ligne directrice provisoire de référence pour le jus de grenade [209].

En comparaison avec le pH, l'acidité titrable est plus élevée chez le cultivar de Doux de Messaad avec une valeur de 0,70 g/100 ml contre un pH plus faible, alors que pour le cultivar Doux de Messaad enregistre une acidité de $0,24 \pm 0,06$ g/100 ml contre un pH de $4,18 \pm 0,24$.

Dans cette étude, l'acidité titrable a augmenté, tandis que la valeur du pH a diminué chez les trois cultivars. L'acidité est inversement corrélée avec le pH. Les fruits mûrs, à faible teneur en acide, avaient un pH élevé [27]. Ces différences ne peuvent pas être seulement dues à la variation génétique, mais aussi aux différents critères de sélection et du temps de récolte optimal.

Au cours de la maturation du fruit de grenade, l'hydrolyse de l'amidon et la libération des sucres comme le glucose et le fructose permettent une augmentation de la concentration en sucres solubles ainsi qu'une augmentation du degré Brix. Il qui présente une forte corrélation avec la concentration en sucre [210].

Par ailleurs, une amélioration du goût de jus et sa saveur est obtenu suite à l'augmentation de la teneur en sucre qui coïncide avec la diminution de l'acidité titrable et l'augmentation du pH.

Le rendement en jus des trois cultivars de grenade étudiés varie de $42,90 \pm 0,11$ à $62,36 \pm 0,11$. Le cultivar Doux de Messaad présente des arilles très juteux par rapport aux deux autres cultivars Koléa et Bordj Mira 11.

Ces résultats concordent avec ceux de TARAI et GHOSH [41] qui ont rapporté un rendement en jus de 51,2 à 64,2% chez les grenades cultivées en Inde et ceux d'ORHAN et al [27] montrant une grande variabilité entre les rendements en jus (19,00 - 80,00%). Cette richesse en jus variant de 19-80% présente une opportunité pour l'industrie de transformation de jus.

Selon MPHAHLELE et al [209] des cultivars de grenades sucrées présentent un meilleur rendement en jus qui augmente avec la maturation du fruit.

L'indice de maturité est responsable de goût et de la saveur principale du jus, il permet de classer la qualité organoleptique de la plupart des espèces de fruits ainsi

que la grenade [36]. Cet indice est variable selon le cultivar et semblait être un bon indicateur de maturité des fruits.

Pour nos cultivars, la valeur de l'indice de Maturité est relativement élevée pour le cultivar de Bordj Mira avec une valeur de $64,58 \pm 0,60$ et elle est plus faible pour le cultivar de Doux de Messaad avec une valeur de $20 \pm 0,63$.

Selon ces résultats obtenus, et selon la classification établie par Martinez [36], ces cultivars sont classés dans la catégorie des grenades douces.

Nos résultats étaient plus élevés que Martinez et al. Ceux obtenus montrant une valeur qui se situe entre 7,7 à 35,2 [72]. Ils sont similaires à ceux trouvés par MENA et al. [73] qui ont déterminé des indices de maturité compris entre 52,15 et 61,67 pour Valenciana, alors que 5.19 et 29.08 pour d'autres cultivars.

En Croatie le rapport TSS / TA variait de 11,5 à 33 [270], 5,4–37,7 et 4,8–37,7 pour l'italien [262, 47] et 37,4–77,6 pour les cultivars marocains [32].

Pour le consommateur, l'indice de maturité est considéré comme un meilleur indicateur de la qualité du goût et de la saveur pour le fruit du grenadier. Il permet une meilleure indication des teneurs individuelles en sucres ou en acides [29].

D'après la classification de Martinez et al. [36], les variétés douces présentent un indice de maturité qui varie de 31 à 98, ceux qui sont aigre-doux leur indice de Maturité se situe entre 7 à 24.

Nos résultats obtenus montrent que les deux cultivars Doux de Koléa et Bordj Mira 11 sont douces, alors que Doux de Messaad est classé dans la catégorie aigre douce.

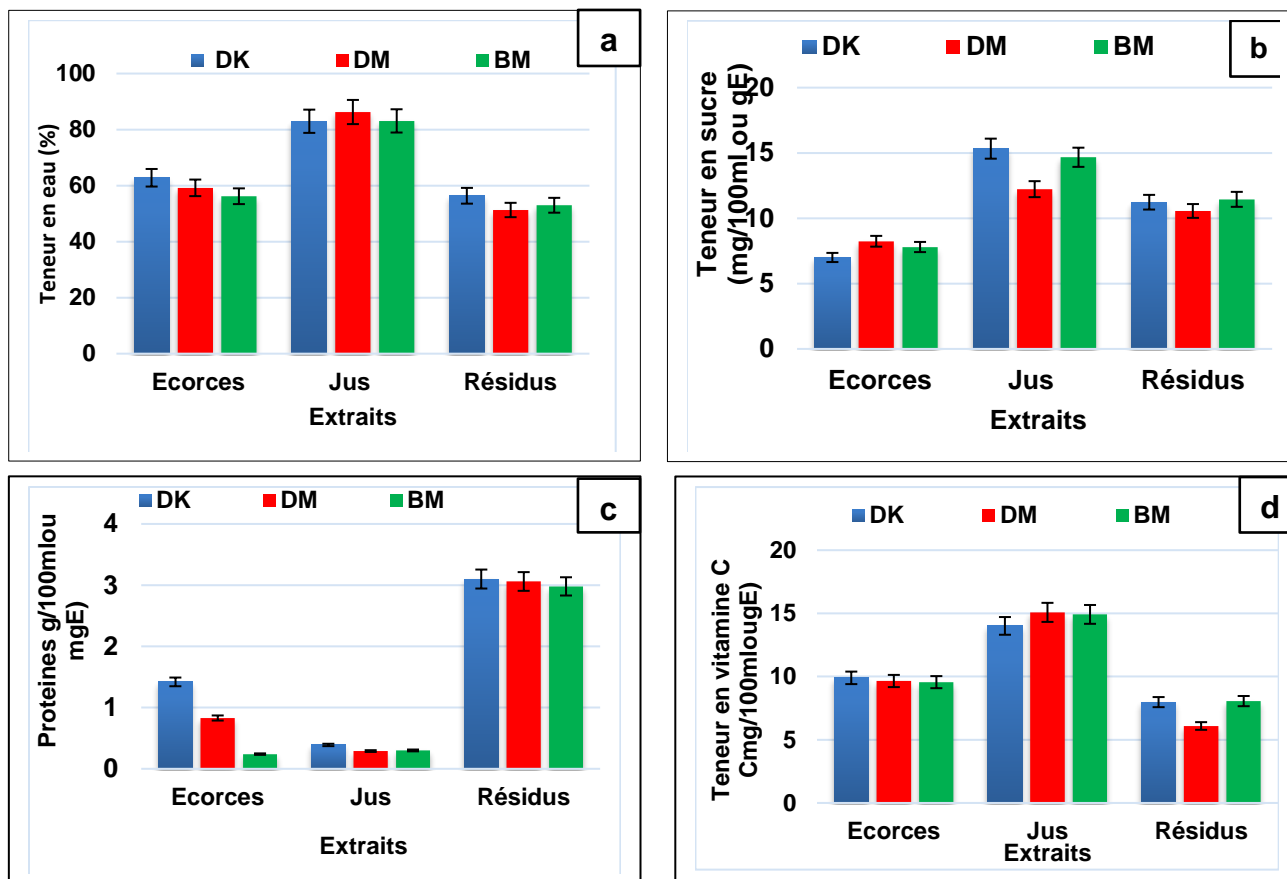
5.3.2.2. Détermination des sucres totaux, acide ascorbique, protéines, teneur en eau des dérivés de trois cultivars de grenades

Les résultats obtenus de la teneur en eau, en sucres totaux, en protéines et en acide ascorbique de différentes dérivés des trois cultivars de grenade sont représentés dans la figure 5.8.

Les valeurs obtenus montrent une différence significative ($p < 0,05$) entre les trois cultivars et que chacun des dérivés de fruits de grenades, jus, écorces et résidus présentent des résultats proches pour les quatre paramètres.

Pour les écorces, la teneur en eau est plus élevée pour le cultivar Doux de Koléa avec une valeur de $80,8 \pm 0,4\%$. Le jus présente une valeur plus élevée pour le cultivar Doux de Messaad présente une teneur plus élevée avec $86,27 \pm 0,48\%$.

Dans les résidus d'extraction, la teneur en eau présente des valeurs proches chez les cultivars Doux de Messaad et Bordj Mira M11 avec $71,29 \pm 0,18 \%$ et $72,98 \pm 0,46 \%$.



*Les barres d'erreur sur les différents graphes correspondent à ces écarts-types.

Figure 5.8 : teneur en eau(a), sucres totaux(b), protéines(c) et acide ascorbique(d) des dérivés de trois cultivars de grenade

Les fruits frais sont très riches en eau, ils renferment 60 à 90%. Le jus du fruit de la grenade est très riche en eau surtout pour les cultivars juteux comme il en est le cas pour celui de Doux de Messaad.

La teneur en eau varie considérablement dans le jus et l'écorce tout au long de la maturité des fruits. Le jus de grenade contient 84,57 % de teneur en eau pour les cultivars Iraniens qui concordent avec nos résultats [212].

Par ailleurs, DAFNY-YALIN et al [34] ont rapporté un taux d'humidité de 85,40 % dans les jus de fruits frais. La variation entre les teneurs en eau pour nos cultivars et leurs dérivés peut être due à une variabilité génétique. La figure 5.8 montre la teneur en eau(a), en sucres totaux(b), en protéines(c) et en acide ascorbique(d) de jus, des écorces et de résidus d'extraction de trois cultivars de grenade.

Différentes études ont montré une variation de la teneur en eau dans différents fruits pendant les périodes de maturation et de stockage [40, 41].

Selon MITCHEL et al [212], l'augmentation de la teneur en humidité réduit la teneur en taux de lipides, des protéines et des glucides qui mènent à une diminution de la valeur énergétique.

Le jus et les écorces ainsi que les résidus d'extraction des trois cultivars de grenades étudiées montrent des teneurs en eau élevées. Cette quantité d'eau est un paramètre qui doit être pris en considération lors de la conservation du fruit et aussi par l'industrie de transformation du jus [213].

Le taux de sucre totaux varie significativement ($p < 0,05$) pour les trois cultivars et en fonction de la partie du fruit. Il est plus élevé dans le jus du cultivar de Doux de Koléa avec une valeur de $15,33 \pm 0,32$ g/100ml de jus. Ainsi, le jus de grenade contient une grande quantité de sucres totaux comparés à d'autres jus, comme celui élevé du jus de raisin [36].

AVIRAM et al [9] ont constaté que le jus du cultivar de grenade fraîche contient 10% du total des sucres

Les écorces de nos cultivars étudiés présentent une concentration du sucre est faible surtout chez le cultivar Doux de Messaad avec une teneur de $10,24 \pm 1,15$ g/100mg de MS.

Les résidus d'extraction présentent des teneurs plus élevées que celles des écorces pour les trois cultivars ($10,56 \pm 0,56$ à $11,45 \pm 1,32$ mg/100 mg de matières sèches).

Plusieurs auteurs ont déclaré que les sucres dans les fruits varient en fonction du cultivar considéré, durant le stade de maturité. Cependant, d'autres rapports ont indiqué que la divergence observée peut être due à différentes conditions agro-climatiques. En revanche, d'autres chercheurs pensent que le facteur du cultivar en soi (génotype) influence principalement les profils des sucres de grenade [209].

L'acide ascorbique est abondant et à de nombreuses fonctions biologiques dans les fruits, il contrôle de nombreux aspects d'oxydation-réduction et l'activité antioxydante [214].

Nos résultats indiquent que la concentration en acide ascorbique était significativement plus élevée dans le jus avec $15,08 \pm 0,12$ mg /100 mL que dans les écorces ($9,65 \pm 0,54$ mg/100 ml) pour les cultivars de Doux de Messaad et Bordj Mira M11 respectivement.

TEHRANIFAR et al [202] ont rapporté la présence de la vitamine C dans les génotypes de grenade entre 9,9 - 20,9 mg /100 ml de jus. Ces résultats sont similaires aux nôtres.

Des valeurs élevées d'acide ascorbique dans la grenade signifient son utilisation potentielle comme un bon antioxydant qui peut prévenir les problèmes de sante par la réduction du risque des maladies cardiaques, de la pression artérielle et des cancers.

L'apport quotidien en acide ascorbique est d'environ 30 mg / jour pour adultes et 17 mg / jour pour les enfants. Par conséquent, ce fruit pourrait être considéré comme une bonne source d'acide ascorbique [198].

La teneur en protéines des trois cultivars de grenade a révélé une différence significative ($p < 0,05$). Elle est plus élevée dans les résidus d'extraction par rapport aux deux autres parties du fruit avec $3,06 \pm 0,12$ mg /100 ml de jus chez le cultivar Doux de Messaad contre $1,42 \pm 0,38$ mg /100 ml de jus dans les écorces pour le cultivar Doux de Koléa.

Ces valeurs sont similaires à celles rapportées par Tarai et al [56] et inférieur à ceux de Ismail et al [215] avec 1,05 % de différences. Ces différences peuvent être expliquées par l'origine des cultivars.

5.3.3. Analyse de la corrélation

La matrice de corrélation reliant les caractéristiques morphologiques des trois cultivars de grenades est présentée dans le tableau 5.9.

Tableau 5.9 : Matrice de corrélation entre les paramètres morphologiques de grenade

Paramètre	Pf	Df	LTf	PEc	PMc	EEc	Pa	REa	Pp
Pf	1,000	0,889**	0,802* *	0,973** *	-0,702	-0,032	-0,592	-0,396	-0,366
Df	0,889**	1,000	0,790	0,938**	-0,533	0,112	-0,481	-0,482	-1,138
LTf	0,802**	0,790	1,000	0,789*	-0,389	0,125	-0,122	-0,327	-0,170
PEc	0,973**	0,938**	0,786*	1,000	-0,718	-0,112	-0,657	-0,412	-0,275
PMc	-0,702	-0,533	-0,389	-0,718	1,000	-0,112	-0,657	-0,412	-0,275
EEc	-0,302	0,112	0,125	-0,112	0,683*	1,000	0,609*	0,384	0,531
Pa	-0,592	-0,481	0,122	-0,657	0,636*	0,609*	1,000	0,142	0,466
R arilles	-0,396	-0,481	-0,412	-0,412	0,384	0,011	0,142	1,000	0,115
Pp	0,366	-0,138	-0,170	-0,275	0,531	0,301	0,466	0,115	1,000

Cette matrice révèle plusieurs corrélations entre les différentes variables morphologiques étudiées. Elle montre une forte corrélation du poids moyen des fruits avec plusieurs paramètres dimensionnels (longueur ($r=0,80$), diamètre ($r=0,889$) et épaisseur du péricarpe ($r=0,973$). Ils indiquent une forte relation positive ($p<0,05$) indiquant que les plus gros fruits sont plus longs et ont un poids de fruit plus élevé. En revanche, le poids moyen des écorces est inversement proportionnel avec le poids des membranes internes ($r=-0,718$), eux aussi corrélés négativement avec le poids moyen du fruit ($r=-0,702$).

Une corrélation a été observée aussi entre le poids des arilles et l'épaisseur des écorces ($r=0,609$). Le rendement de arilles est faiblement corrélé avec le poids moyen des arilles ($r=0,142$) et le poids moyen des pépins ($r=0,115$). Ce rendement est négativement corrélé avec le poids des fruits et des écorces. Dans la grenade, la taille des fruits est fortement corrélée avec l'écorce et le poids de la membrane [14].

5.4. Caractérisation phytochimique et identification des composés phénoliques

5.4.1. Analyse qualitative : Screening phytochimique

Les résultats des analyses phytochimiques préliminaires sont indiqués dans le tableau 5.10 :

Tableau 5.10 : Résultats du screening phytochimique du jus et des extraits de grenade

Composés	Extraits								
	Jus			MEOHME			EOTHR		
	DK	DM	BM	DK	DM	DM	DK	DM	BM
Flavonoïdes	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
Tanins	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)	(++)
Saponines	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Anthocyanes	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Alcaloïdes	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
Terpènes et des	(++)	(++)	(++)	(+++)	(++)	(+++)	(+)	(+)	(+)

MEOHME :Extrait hydro-methanolique de l'ecorce,EOTHR :extrait ethanolique de résidus

+++ Forte présence ; ++ Présence moyenne ; + Présence, - absence

Ces tests phytochimiques facilitent l'estimation quantitative des composés chimiques pharmacologiquement actifs. Le dépistage dans cette présente étude a révélé la présence de la majorité de métabolites secondaire.

Les flavonoïdes et les tanins sont présents en forte quantité dans les jus et les extraits des écorces, alors que leur présence est moyenne dans l'extrait éthanolique des résidus.

Les saponines sont en présence plus ou moins faible dans les trois différents extraits. La présence des anthocyanes est plus forte dans les jus que dans les extraits des écorces et les résidus de grenade.

La présence des alcaloïdes est plus forte dans les extraits des écorces, faibles dans les jus et absente dans les extraits des résidus d'extraction.

Les terpènes et les stérols sont plus condensés dans les extraits de l'écorce que dans ceux dans les jus, par ailleurs ils sont avec une présence faible dans les extraits de résidus.

Les flavonoïdes et les tanins sont des composés phénoliques qui constituent un groupe majeur qui agissent comme antioxydants primaires ou piègeurs de radicaux libres. Ces composés se sont avérés présents dans les extraits et pourrait être responsable de la capacité antioxydante de ces cultivars de grenade.

Les extraits d'écorces des trois cultivars de grenades sont composés d'un plus grand nombre de composés bioactifs. Cette composition varie selon la méthode et le solvant d'extraction [216].

Ces tests phytochimiques préliminaires sont utiles pour déterminer les constituants chimiques présents dans notre matériel végétal qui peut conduire à une estimation quantitative. La présence de ces composés peut confirmer leur utilisation thérapeutique.

5.4.2. Caractérisation et identification phénolique des jus de grenades et leur activité antioxydante

5.4.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

Le test avec le réactif Folin–Ciocalteu constitue l'une des méthodes les plus communes pour la quantification des polyphénols totaux. Leurs teneurs ont été calculées à partir de la droite d'étalonnage (**Appendice G, Figure G2**) et exprimées en milligramme d'équivalence d'acide gallique utilisé comme standard par grammes de la matière sèche végétale (mg EAG/g MS). Les résultats de la composition en polyphénols totaux dans les jus de trois cultivars étudiés sont présentés dans la figure 5.9 :

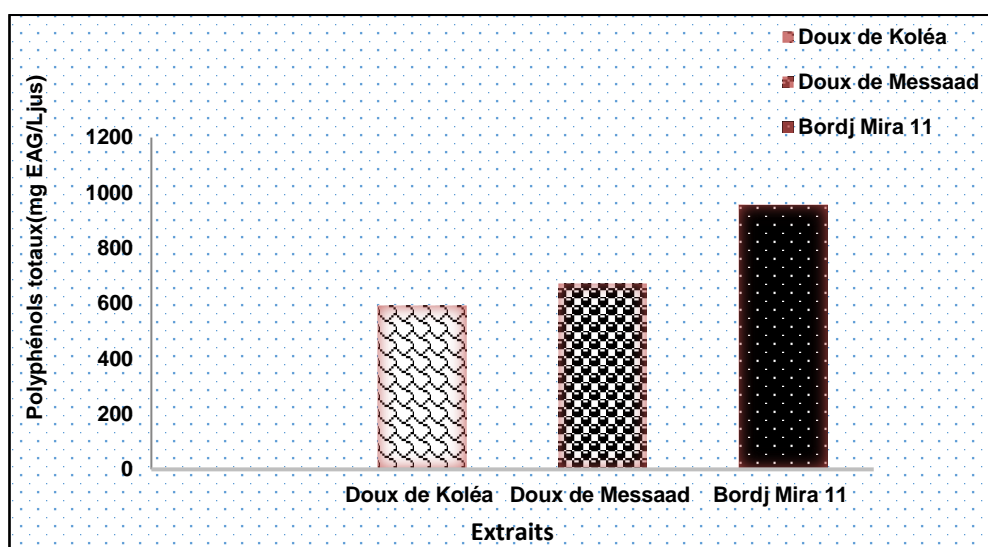


Figure 5.9 : Teneurs en polyphénols totaux des jus des trois cultivars dgrenades

D'après les résultats illustrés par la figure 5.9, les teneurs en polyphénols totaux sont comprises entre 593 et 956 mg EAG/L de jus.

Une différence significative ($P < 0,05$) a été observée entre les trois cultivars. Il a été démontré par les travaux de MPH AHLELE et al [209] que le génotype des plantes peut affecter la teneur en composés phénoliques des fruits.

Le jus du cultivar de Bordj Mira est plus riche en polyphénols totaux ($956 \pm 0,42$ mg EAG/L de jus) par rapport aux cultivars Doux de Messaad ($671 \pm 1,4254$ mg EAG/L de jus) et Doux de Koléa ($593 \pm 1,54$ mg EAG/L de jus).

La comparaison des teneurs en polyphénols totaux de nos cultivars avec celles rapportées dans la littérature, montre qu'elles sont similaires. En effet, une étude réalisée par H'MID [6], sur des cultivars Marocains, montre que leurs teneurs varient significativement entre 1284,42 et 9476,32 mg/L) et celle d'EL FALLEH et *al* [53] pour des variétés tunisiennes enregistrant des teneurs comprises entre $689 \pm 1,97$ mg EAG /L et $1370 \pm 1,62$ mg/L.

En outre, l'étude d'AKHAVAN Et *al* [92] réalisée sur 8 jus de cultivars de Croatie enregistre des teneurs significatives variant entre 942 –2931 mg EAG / L. Cependant, cette composition est plus élevée qui est de l'ordre de 2083–3436mg EAG/L pour les jus élaborés à partir des huit cultivars en Turquie [169].

Plusieurs études ont montré des différences significatives du contenu total polyphénolique chez divers cultivars de grenade. FAWOLE et OPARA [39] ont rapporté des teneurs qui varient entre 296 à 985 mg / L de jus et qui sont supérieurs à ceux de MDITSHWA et *al* [217] avec 208 – 344 mg / L de jus.

Cette concentration polyphénolique et sa composition dans la grenade dépendent du cultivar. Les composants les plus abondants dans le jus de grenade sont les anthocyanes, les catéchines, les tanins et les acides ellagique. De plus, la saison de développement, la maturation [35] et la variabilité génétique conduit à des variations dans la biosynthèse phénolique des métabolites dans ces cultivars [211].

En plus du cultivar, ces variations en polyphénols totaux peuvent être attribuées aux méthodes analytiques, au stade de maturité, et aux conditions environnementales. Par ailleurs, la surestimation de ces composés phénoliques totaux par la méthode du réactif Folin-Ciocalteu est due à une interférence avec d'autres facteurs de réduction [69].

En effet, ce réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques, mais également de certains sucres réducteurs (glucose, fructose) et de protéines (tyrosine, tryptophane).

Les études de MENA et *al* [74] et LI et *al* [218] ont rapportés que la teneur en polyphénols totaux varie aussi en fonction de la partie du fruit.

D'autre part, la concentration phénolique et sa composition dans les fruits de grenade dépendent des composants les plus abondants qui sont les anthocyanes, les catéchines, les tanins ellagique et galliques et les acides ellagique.

En outre, la saison de développement et le stade maturation [219], la variabilité génétique entraîne des variations de la biosynthèse des composés phénoliques métabolites chez les cultivars.

En plus de cette composition, ces phénols sont associés à la couleur, aux caractéristiques sensorielles (saveur, astringence et dureté), aux caractéristiques nutritionnelles et à l'activité antioxydante [211].

FISCHER et al [77] avaient étudiés des cultivars de grenade de type 'Ganesh' à différents stades de développement et ont évoqué que la teneur en polyphénols totaux diminue d'environ 74% pendant la croissance et la maturation du fruit. Ceci est confirmé par d'autres auteurs qui remarquent une réduction de la concentration en polyphénol totaux à cause de la biosynthèse des métabolites secondaires chez ces cultivars qui changent en réponse au stress hydrique [211].

Alors que ces polyphénols de la grenade ont des effets positifs sur la santé humaine, MENA et al [74] ont indiqué que des teneurs très élevés dans la grenade ou tout autre fruit peuvent causer un défaut dans la texture et qui se manifeste par une astringence indésirable des jus extraits lors d'une transformation industrielle.

A la lumière de cette discussion, on déduit que la concentration en polyphénols totaux de la grenade est liée le plus au cultivar et non pas à son goût, et le contenu élevé de la teneur en polyphénols totaux peut contribuer de manière significative à l'utilisation de ce jus comme source d'antioxydants naturels.

5.4.2.2. Dosage des flavonoïdes

Connu par leurs propriétés antioxydantes, les flavonoïdes sont les principaux composés phénoliques qui existent dans les fruits. Les teneurs en flavonoïdes dans les jus des trois cultivars de grenades étudiés ont été estimées par la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La concentration des flavonoïdes a été déterminée en se référant à la droite d'étalonnage (**Appendice G Figure G3**). Les teneurs sont exprimées en milligramme d'équivalence de quercétine utilisée comme standard par gramme de la matière sèche végétale (mg EC/g MS). La figure 5.10 présente la teneur en flavonoïdes des jus des trois cultivars de grenades étudiées :

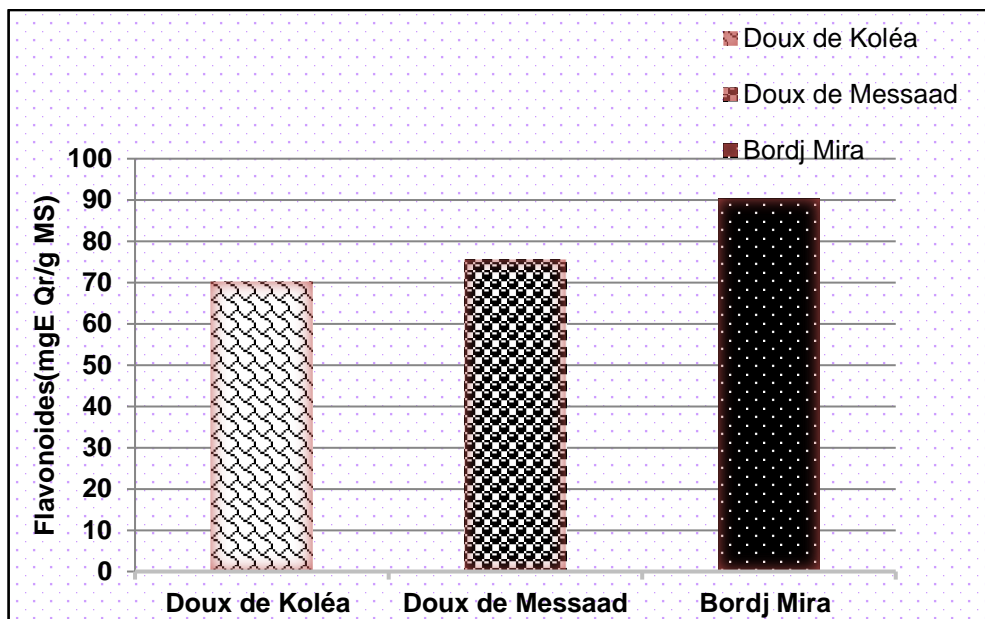


Figure 5.10 : Teneur en flavonoïdes des jus des trois cultivars de grenades

Les résultats illustrés par la figure 5.3.1 et le tableau 5.9 montrent des teneurs qui sont significativement différents ($P < 0,05$) et qui se situent entre $70,33 \pm 1,98$ et $90,39 \pm 0,29$ mg EAG/L de jus.

Le jus du cultivar Bordj Mira est plus riche en flavonoïdes avec $90,39 \pm 0,29$ mg EQr/L de jus alors que la plus faible quantité de flavonoïde a été retrouvée dans le jus de Doux de Koléa avec $70,33 \pm 1,98$ mg EQr/l de jus.

Cette variation de la concentration des flavonoïdes dans le jus des trois cultivars a été corrélée à la technologie de traitement et de préparation de jus [26].

Une concentration modérée de ces composés contribue à un arôme typique du jus de grenade, alors qu'une concentration excessive de flavonoïdes lui confère un goût désagréable et astringent [220].

Notre résultat montre des teneurs en flavonoïdes plus fortes que celles établies par plusieurs fruits, l'ananas (3,24 mg EQr/L), l'acérola (9,6 mg EQr/ L), la prune (7,1 mg EQr/100 L) et la banane (23,7 mg EQr/L) [221]. Le jus de raisin est considéré comme étant le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 7,24 mg EQr/ 100 mL [244].

GUO et al [157] ont indiqué que la valeur obtenue pour le contenu des flavonoïdes du jus de grenade est de 174 mg EQr/l, alors que pour celui de la pomme est de 92mg EQr/l. Dans la même étude, ils ont conclu que la consommation quotidienne de jus de grenade est potentiellement meilleure que le jus de pomme en termes d'amélioration de la fonction antioxydante chez les personnes âgées.

H'MID et al [6] a enregistré un intervalle de teneurs en flavonoïdes dans les jus de 18 cultivars Marocaines variant entre 144,46-569,89 EQr mg / L).

Treize flavonoïdes différents appartenant à cinq sous-classes de flavonoïdes non colorés (flavan-3-ols, flavonols, flavanones, flavones et dihydrochalcones) ont été identifiés dans le jus de grenade [74].

Selon Haghi et al [222], les flavonoïdes sont toujours représentés par une faible teneur. C'est l'un des groupes les plus importants des composés phénoliques ayant un effet potentiel sur les activités biologiques et une action thérapeutique sur certaines pathologies telles que le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer. Cette étude a montré aussi que ces composés ont une très forte capacité à bloquer la prolifération des cellules humaines issues de cancers du sein, de la prostate, du colon, du poumon et de peau ainsi qu'une prévention contre les maladies cardiovasculaires.

5.4.2.3. Dosage des tanins hydrolysables

La concentration des tanins hydrolysables dans les jus des trois cultivars de grenade est déterminée en se référant à la droite d'étalonnage (**Appendice G, figure G4**). Les teneurs sont exprimées en milligramme d'équivalence d'acide tannique utilisée comme standard par gramme de la matière sèche végétale (mg ER/100g MS).

Les tanins hydrolysables comprennent les gallotannins et les ellagitannins qui sont des composés prédominants dans le fruit de grenade. Ils sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [222].

Le niveau de la teneur en tanins dans le jus de grenade peut être un bon indicateur pour sa qualité nutritionnelle. Dans le jus préparé à partir des fruits entiers, ils représentant en moyenne 99 à 100% du total des composés phénoliques dans les péricarpes, 87% dans le jus de grenade de fruits entiers et seulement 33% dans le jus de grenade à base d'arilles isolées [246].

Les résultats des tanins hydrolysables des jus des trois cultivars de grenades sont présentés par la figure 5.11 :

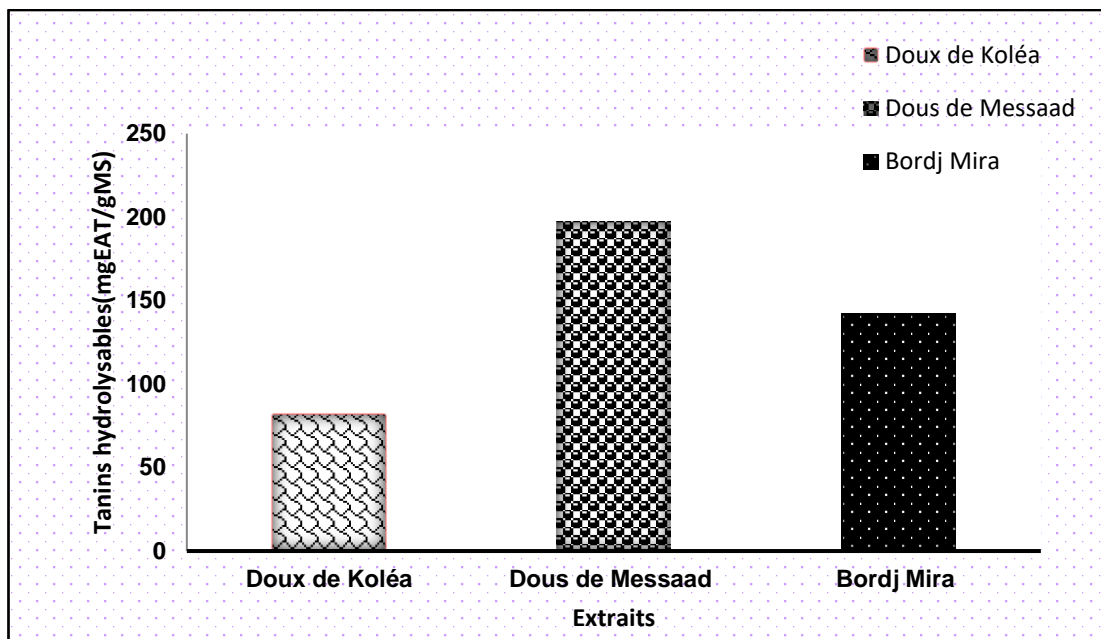


Figure 5.11 : Teneur en tanins hydrolysables des jus des trois cultivars de grenades

Dans notre étude, le jus a été préparé à partir des arilles seulement, nos résultats obtenus montrent une variabilité significatives ($P < 0,05$) pour les teneurs en tannins hydrolysables. Elle est dominée dans le jus de Doux de messaad ($197,12 \pm 0,19$ Mg EAT/L de jus) et plus faible dans le jus de Doux de koléa ($82,30 \pm 0,32$ Mg EAT/ L de jus). C'est la présence de cette quantité de tannins qui donne le goût astringent au jus frais de la grenade.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par ZAREI et al [197] qui ont trouvé un taux de tanins de $125 \pm 0,12$ g E AT/L de jus frais.

Des teneurs plus élevées ont été enregistrées par FERNANDES et al [198] pour des cultivars espagnols avec $325,3$ mg EAT/ 100 ml de jus alors que d'autres teneurs plus faibles ont été trouvés pour le cultivar Mollar Elch ($26,0$ mg EQA / 100 ml de jus).

Ces différences peuvent être causées par le type de cultivar type, le climat, l'état édaphique, la maturité et surtout la méthode de détermination de ces tanins.

5.4.2.4. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes font partie des composés phénoliques qui contribuent à la couleur rouge, bleue ou violette de nombreux fruits, y compris le jus de grenade. [75,56]. La teneur en anthocyanines des jus de trois cultivars locales a été déterminée et les résultats sont résumés dans la figure 5.12 :

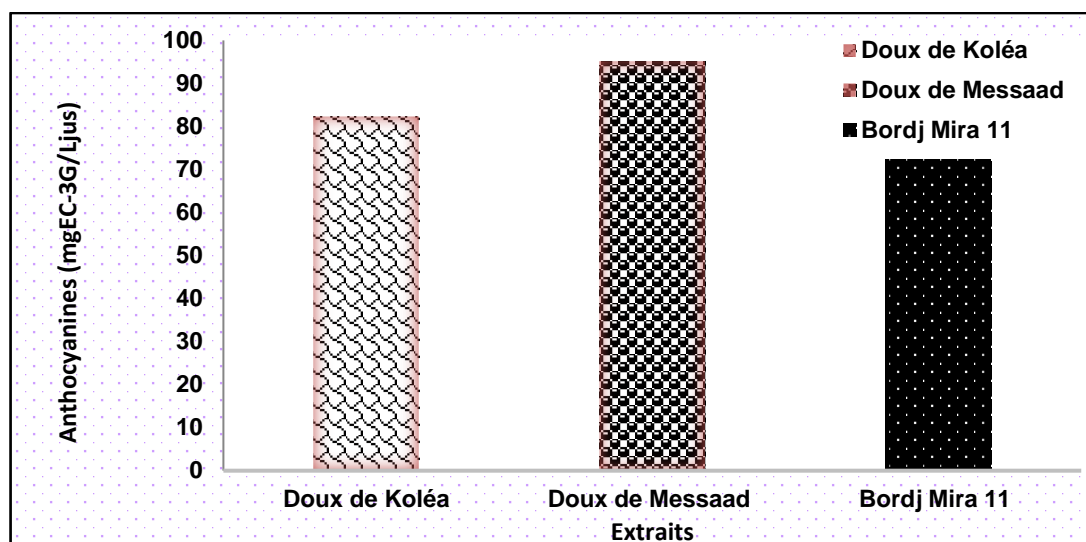


Figure 5.12 : Teneur en anthocyanines des jus des trois cultivars de grenades

L'une des plus importantes caractéristiques qui affecte sa qualité est sa couleur rouge qui est variable en fonction de la concentration en anthocyanes et les structures chimiques des anthocyanes individuelles.

La valeur la plus élevée en anthocyanines a été enregistrée par le jus de Doux de Messaad avec $95,12 \pm 0,19$ mg EC-3 G/L de jus, caractérisé par une couleur rouge foncée. La plus faible teneur d'anthocyanine a été enregistrée par le jus de Bordj Mira, montrant une couleur rose rougeâtre moins foncée que pour les jus des deux autres cultivars. Les quantités d'anthocyanines variaient considérablement, ce qui correspondait à une différence de la couleur rouge des jus.

Nos résultats sont en concordance avec ceux rapportés par AMRI et *al.* [200] pour des cultivars tunisiens dans lesquelles les teneurs en anthocyanes étaient compris entre 51 et 490 mg 100/L Delphinidine. Le 3,5-diglycoside était l'anthocyane prédominant dans tous les cultivars (407 mg EC-3 G /L).

FISCHER et *al* [170] ont signalé que la teneur en anthocyanes par rapport aux composés phénoliques totaux était encore plus élevée (17 à 93%) dans les jus produits à partir d'arilles.

Nos résultats sont supérieurs à ceux de TEHRANIFAR et *al* [202] pour un cultivar Iranien (30,11 mg EC-3 G /L de jus) qui ont prouvé que le degré de maturité affecte grandement la concentration des anthocyanines de la grenade.

Par ailleurs, nos résultats sont conformes à ceux trouvés par LEGUA et *al* [60] confirmant ainsi la grande pertinence nutritionnelle du jus de grenade.

GIL et al [13] avaient rapporté auparavant que la teneur en anthocyanes contenu dans le jus des grenades tunisiennes a atteint des valeurs de 6 à 120 mg d'EC-3-G/L et que les composés anthocyaniques sont identiques dans de nombreux cultivars de grenade, quelle que soit la zone de culture. Cependant, les quantités relatives de types d'anthocyanes individuels varient selon les cultivars.

Par ailleurs, ÇAM et al [61] ont signalé des teneurs plus faibles (8,1 et 36,9 mg EC-3 G /L de jus) avec une variation des niveaux des anthocyanes totaux entre les différents cultivars de grenade due à une grande hétérogénéité génétique. Nos résultats sont supérieurs.

Selon BEN-SIMHON et al [226], la cyanidine 3,5-diglucoside est le principal anthocyanine présent à une Concentration plus élevée (189 à 364 mg/l) et responsable de la pigmentation rouge au cours des différentes les stades de maturité de jus de grenade. Cette teneur en anthocyanines varie selon le cultivar étudié et elle augmente lors de la maturation du fruit.

TODARO et al [226] a évoqué une teneur en anthocyanes totale comprise entre 53,0 et 196,6 mg / L avec une valeur moyenne de 110,0 et a révélé une grande variabilité parmi les cultivars.

LI et al [219] ont étudié les profils en anthocyanes de trois cultivars chinois, signalant la prédominance d'anthocyanes monoglucosidiques représentant 92% de leur teneur total.

L'analyse des anthocyanes par HPLC a mis en évidence six principaux composés dans les trois échantillons analysés par LABBE et al [227] : cyanidine 3,5-diglucoside (Cy3,5), delphinidine 3,5-diglucoside (Dp3,5), pélargonidine 3,5-diglucoside (Pg3,5), cyanidine Le 3-glucoside (Cy3), delphinidine 3-glucoside (Dp3), et le 3-glucoside de pélargonidine (Pg3). Le contenu total de l'anthocyanine a été calculé en additionnant le contenu des anthocyanes individuels.

ALIGHOURCHI et BARZEGAR [228] avaient montré que delphinidine- 3,5-diglucosides est l'anthocyanine dominante suivie par la cyanidine-3,5-glucosides. Par contre, leurs collaborateurs MOUSAVINEJAD et al [229] ont confirmé que la cyanidine-3,5-glucosglycosyléesides est la plus dominante dans le jus de grenade. A travers leurs études de leur dominance dans le jus de grenade, les formes glycosylées sont les plus abondantes que les formes monoglycosylées.

5.4.2.5. Identification des composés phénoliques dans les jus de grenade

Au cours des dernières années, le jus de grenade a beaucoup attiré l'attention de beaucoup de chercheurs en raison de sa valeur nutritive et de ses propriétés antioxydantes. Il présente une activité antioxydante trois fois supérieure à celui du thé vert [13] et deux, six et huit fois supérieurs à ceux du raisin / canneberge et du jus d'orange[202] respectivement.

C'est une importante source de composés bioactifs. Ces composés sont principalement des polyphénols, des flavonoïdes (flavones, flavanones, catéchines et isoflavones) et des composés apparentés (acides phénoliques, chalcones et isoflavones) [9].

Le tableau 5.11 présente le temps de rétention et les pourcentages de réponse chromatographique des mélanges d'étalons :

Tableau 5.11 : Temps de rétention et pourcentage de réponse chromatographique

N°	Etalon	Temps de rétention	Pourcentage [%]
1	A.gallique	8,201	5,4
2	Resorcinol	11,587	5,1
3	Catechine	21,063	14,7
4	NI	29,720	2,9
5	Berbérine	29,853	16,3
6	Rutine	31,953	16,2
7	NI	33,487	0,1
8	Myrcetine	34,703	6,1
9	NI	34,920	0,4
10	Quercétine	38,637	25,7

*ND : non identifié

La chromatographie liquide haute performance(HPLC) est une méthode précise de détermination et d'identification des composés phénoliques de la grenade.

Ces composés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention (Rt) à ceux d'étalons purs injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. Les résultats ont été exprimés en% de réponse chromatographique de chaque composé identifié par rapport à la surface totale obtenue en analysant les jus de grenades

La figure 5.13 montre les résultats des profils chromatographiques obtenus par l'analyse HPLC des jus de Doux de Koléa, Doux de Messaad et Bordj Mira présentés par les temps de rétention et les pourcentages de réponses.

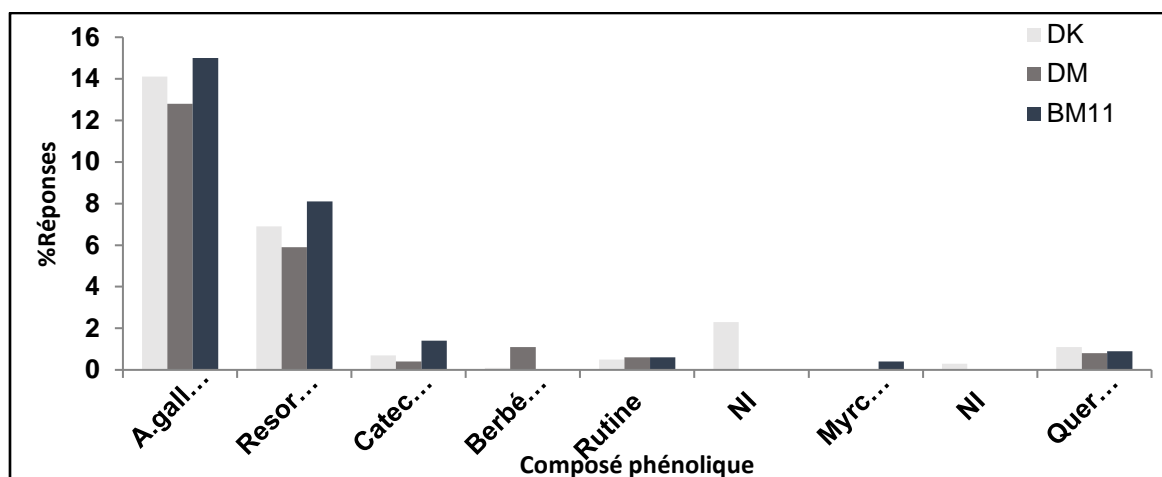


Figure 5.13 : Profil en pourcentage de la réponse chromatographique de jus de grenade

Plusieurs composés ont été détectés dans le jus de trois cultivars de grenade :

- Pour le jus de Doux de Koléa, 61 composés ont été détectés et 8 ont été identifiés.
- Dans le jus de Doux de Messaad, 57 composés ont été détectés avec 6 ont été identifiés.
- Un nombre de 6 composés ont été identifiés dans le jus de Bordj Mira pour qui ont été détectés.

Les 11 composés détectés, dont neuf ont été identifiés se regroupent en deux classes de composés phénoliques selon les pourcentages de réponses chromatographiques.

- La première classe comprend les flavonoïdes, dont le resorcinol, catechine, berberine, rutine et myrcétine.

- La deuxième classe de composés l'acide gallique qui appartient aux acides phénoliques.

L'acide gallique, le resorcinol, la quercétine, la rutine et la catéchine ont été identifiés dans les échantillons des trois jus de grenades. La berbérine est présente que dans les jus de Doux de Koléa et Doux de Messaad.

La myrcétine qui est un flavonoïde qui pas n'a été détecté que dans les jus de Doux de Koléa et Bordj Mira.

Par ailleurs, deux composés présents ont été détectés à des pourcentages plus moins modérés mais n'ont pas été identifiés.

Les résultats présentés dans le tableau 5.11 confirment que les trois jus de grenade testés présentent des flavonoïdes (resorcinol, catechine, berberine, rutine et myrcetine) et des acides phénoliques (acide gallique).

L'analyse HPLC réalisée dans notre étude a révélé que l'acide gallique était l'acide phénolique le plus abondant dans les jus de Doux de koléa et de Doux de Messaad, suivi du composé flavonoïde resorcinol qui se présente à 8,1% dans le jus de Bordj Mira et 6,9% dans le jus de Doux de Koléa.

En outre, pour les autres flavonoïdes, la catéchine représentait 1,4% dans le jus de Bordj Mira, la rutine avec 0,6% pour les jus de Doux de Messaad et Bordj Mira et un pourcentage de 1,1% dans le jus de doux de koléa.

A travers ces résultats, on peut confirmer qu'il existe une grande similarité dans la composition phénolique des différents échantillons de jus de grenade

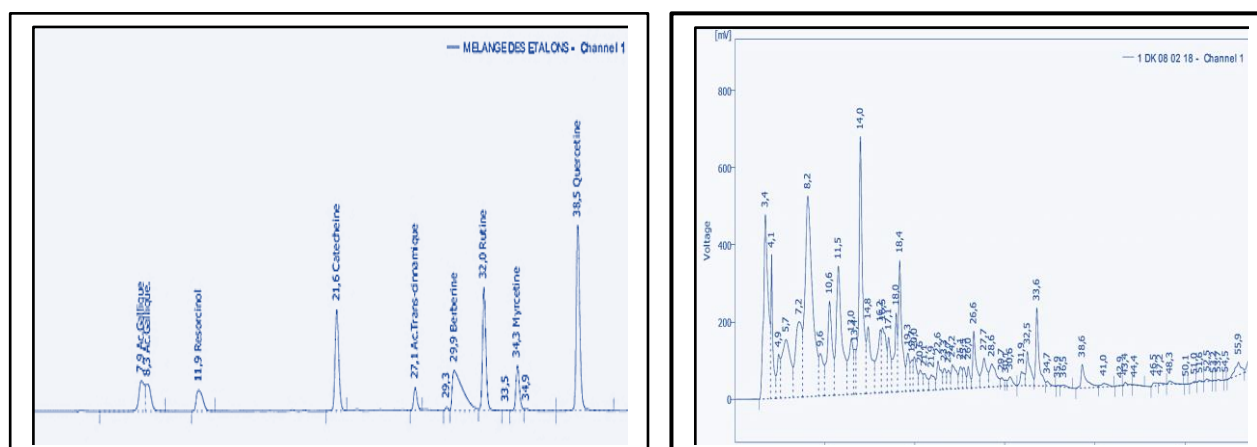
De nombreux auteurs ont prouvé la présence de différents composés phénoliques dans le jus de la grenade par analyse HPLC.

HMID [6] a signalé la présence d'acide gallique, de catéchine, de quercétine et de rutine dans le jus de grenade de cultivars Marocains.

FISCHER et al [77] ont identifié 48 composés dans trois cultivars variantes de jus de grenade, dont 9 anthocyanes, 2 gallotannins, 22 ellagitannins, 2 gallagyl esters, 4 acides hydroxybenzoïques, et 7 acides hydroxycinnamiques et 1 était dihydroflavonol.

En revanche, MENA et al [75] ont identifié 75 composés par UHPLC-M, dont 21 composés ont été provisoirement identifiés pour la première fois dans le jus de grenade du cultivar Mollar Elche. Les composés qui ont été séparés représentent 37 ellagitannins, 6 gallotannins, 14 flavonoïdes non colorés, 5 dérivés d'acide phénolique, 6 anthocyanes, une flavanolanthocyanine, 6 lignanes et 3 acides organiques.

Les profils chromatographiques d'HPLC sont présentés par la figure 5.14 :



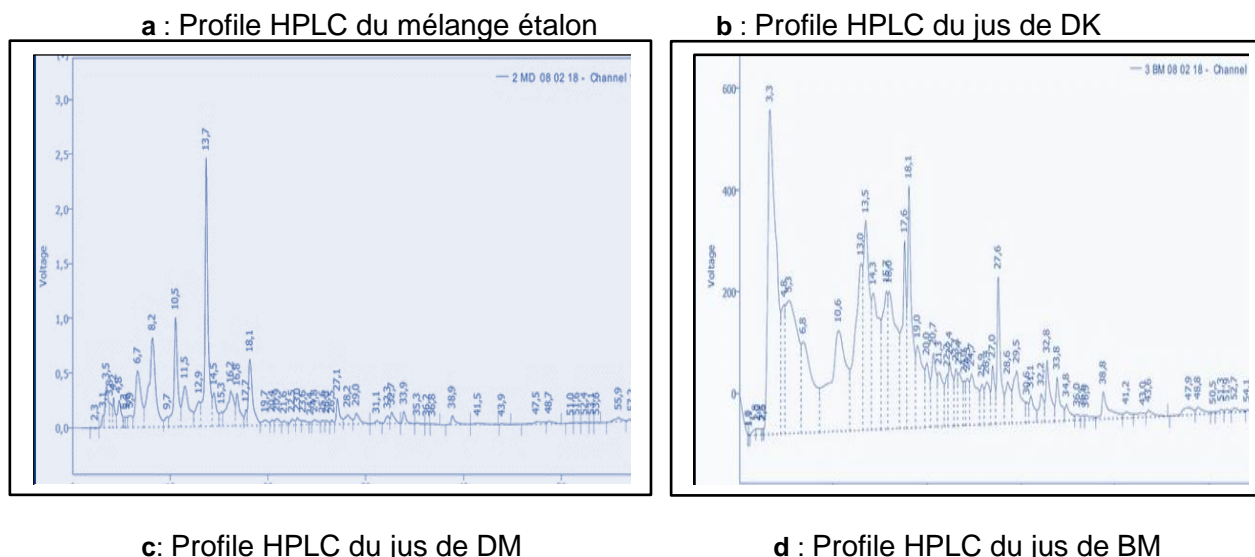


Figure 5.14 : Profil HPLC des étalons et des trois jus de grenade

La caractérisation par HPLC nous a permis l'identification d'un acide phénolique et de cinq flavonoïdes ainsi que leurs pourcentages. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'analyse spectrophotométrique.

5.4.2.6. Activité anti radicalaire et antioxydante

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire et antioxydante des jus des trois cultivars de grenades a été réalisée dans le but de disposer de données objectives pour valoriser ces fruits. Deux méthodes ont été entreprises dont leur utilisation est couramment employée : la méthode d'inhibition du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur par le test FRAP.

5.4.2.6.1. Piégeage des radicaux libres par le test DPPH

L'activité anti-radicalaire des jus des trois cultivars étudiés sont évaluées suivant la neutralisation du radical DPPH, en fonction de la concentration de ce jus. Elles sont exprimées en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de chacun des jus de grenades et de deux standards BHT et de l'acide ascorbique (vitamine C). Les résultats de cette activité sont représentés par la figure 5.15 :

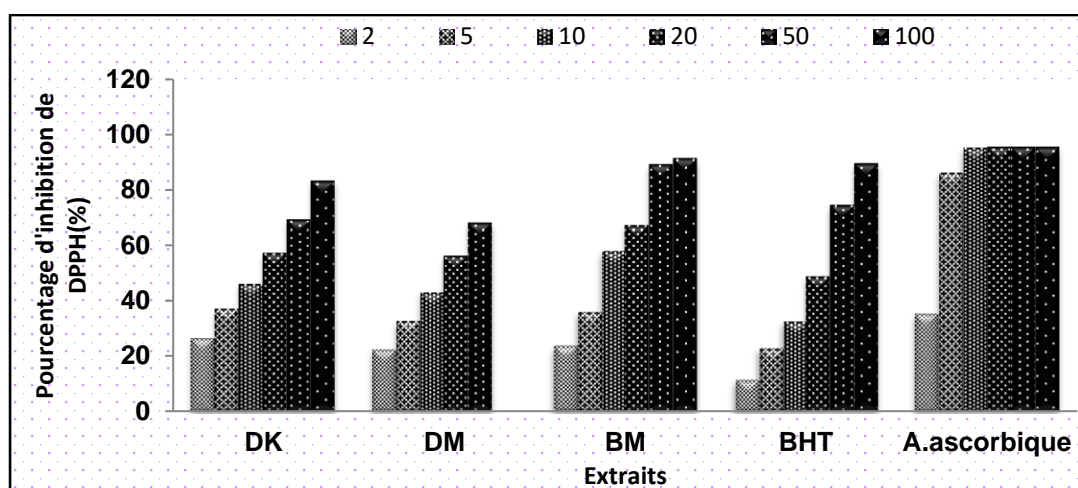


Figure 5.15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des jus testés des standards

Les résultats de la figure 5.15 montrent une augmentation significative du pourcentage d'inhibition du radical DPPH ($P < 0,05$) selon une concentration de 2 à 100 mg /ml.

Les trois jus montrent un pouvoir inhibiteur allant de 26,17 % à 83,1% pour Doux de Koléa, de 22,1% à 81, 25 % pour Doux de Messaad et de 23,54% à 91,2 % pour Bordj Mira. Les pourcentages du pouvoir inhibiteur des standards BHT et l'acide ascorbique varient significativement de 11,2 % à 89,35%, respectivement.

Il s'avère que les pourcentages d'inhibition des jus des trois cultivars sont pratiquement équivalents à celui du standard BHT pour le cultivar de Bordj Mira11.

Le standard, acide ascorbique montre un pouvoir de piégeage le plus élevé (95,34%) par rapport au standard BHT, il a une faible concentration de 10 mg/mL et inhibe presque complètement le radical stable DPPH.

Le jus de Bordj Mira11 a une activité antioxydante plus élevée qui peut être expliquée par sa teneur en polyphénols totaux plus forte. MUTAHAR et al [230] a révélé que l'activité antioxydante est positivement liée à la teneur en polyphénols totaux, ce qui confirme ces résultats.

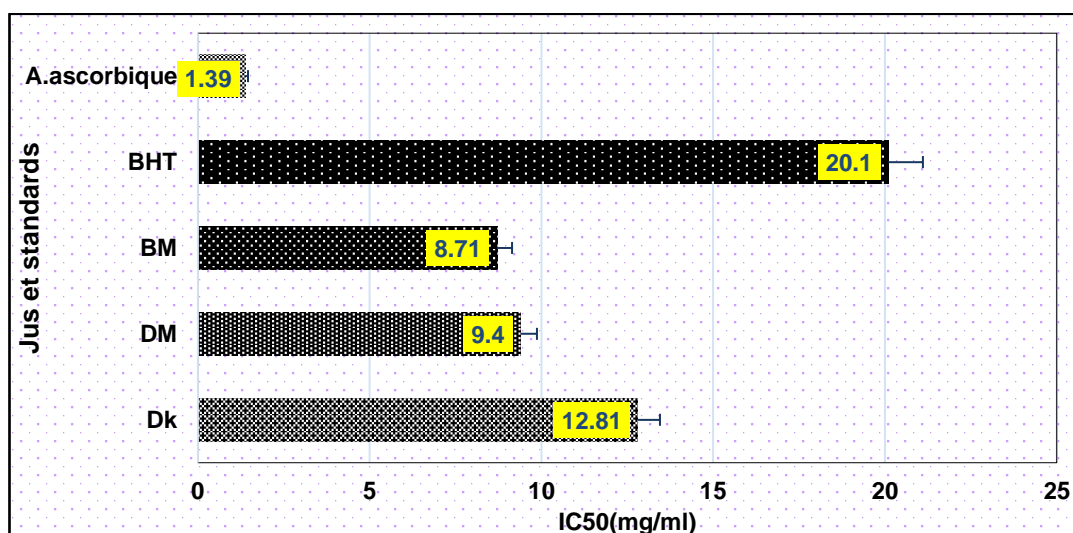
Ces résultats sont également supérieurs à ceux obtenus pour les 18 cultivars Marocains étudiées par H'MID [6] variant entre 31,16 % à 66,82 % pour les cultivars locaux et entre 45,65 % et 76,3 % pour les cultivars étrangers. Par Ailleurs, les cultivars Iraniens ont révélé des résultats aussi inférieurs ($25,6 \pm 1,7$ et $46,8 \pm 2,6$ % [93.

A cet égard, le pouvoir antioxydant du jus de grenade dépend du cultivar, de la région de culture, de la maturation des fruits et des facteurs agricoles. La technologie utilisée pour le traitement du jus peut affecter également la capacité antioxydante du

jus de grenade [231]. Cette différence peut être expliquée par la méthode d'extraction utilisée.

Ces pourcentages d'inhibition du radical libre des jus de grenade et de leurs standards ont été rapportés sous forme de courbes. Elles sont exprimées en fonction de la concentration des jus et leurs standards BHT et acide ascorbique (appendice I figures I1, I2, I3, I4, I5).

Les IC_{50} des trois jus de grenades ainsi que ceux des standards BHT et acide ascorbique sont présentées par la figure 5.16.



IC₅₀ (mg/ml) : concentration de jus inhibitrice d 50% du DPPH ; BHT : butylhydroxytoluène .Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Figure 5.16 : Valeurs des IC_{50} des trois jus de grenades et des standards

Les résultats de cette figure montrent que les jus de grenade ainsi que les rendements différent significativement ($P < 0,05$). Elles inhibent les 50 % du radical libre DPPH et se situent entre $8,71 \pm 0,21$ et $12,81 \pm 0,03$ mg/ml pour les trois cultivars de grenades, alors que ceux des standards BHT et d'acide ascorbique sont supérieurs avec $20,10 \pm 0,19$ et $1,39 \pm 0,12$ mg/ml respectivement.

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH du jus de Bordj Mira est plus élevé que ceux des deux autres variétés avec une IC_{50} de $8,71 \pm 0,21$ mg/ml. Cependant, ce pouvoir est inférieur à celui du BHT qui enregistre une valeur de $20,10 \pm 0,19$ mg/ml et supérieur à celui de l'acide ascorbique avec $1,39 \pm 0,12$ mg/ml.

La valeur d' IC_{50} est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante I%). Le jus de Messaad est considéré comme celui le moins riche

en antioxydant par rapport aux deux autres jus Bordj mira11 et Doux de Koléa. Il est, en revanche, meilleur que celui du standard BHT.

Ces résultats montrent aussi que le BHT révèle une IC50 double de ceux des trois jus de grenades et allant jusqu'à vingt fois à celle de l'acide ascorbique.

Le standard acide ascorbique a révélé un fort pouvoir antioxydant traduit par des IC50 faibles même à concentration faible contrairement à ceux des trois jus et du BHT.

A une concentration de 5 mg/ml, le pourcentage d'inhibition du BHA vis-à-vis du radical DPPH est de l'ordre de 18,34% comparativement à celui de la vitamine C qui est de 55,12 %, bien que ceux des trois jus soient de l'ordre de 44,26, 47,34 42,76 % pour le DK, DM et BM11. Ces résultats ont indiqué que les tanins hydrolysables, y compris la punicalagine, étaient les principaux composés influençant la capacité antioxydante des jus de grenade [9,11]. Ces composés présentent une activité antioxydante élevée en raison des 16 groupes hydroxyles de la molécule [11].

Les résultats obtenus d'études par FERRARA et al [62] sur les variétés cultivées en sud d'Italie ont montré des IC50 se situant entre 2,51– 6,35 mg/ml de jus. Ces derniers sont proches de ceux obtenus par notre cultivar Bordj Mira 11.

Une étude d'ALCARAZ-MARMOL et al [204] sur l'activité antioxydante de seize cultivars espagnols a mis en évidence des IC₅₀ comprises entre 6,39 ± 0,18 et 7,08 ± 0.34mg/ml pour les jus de ces grenades. Ces résultats concordent avec les notres.

La grenade est l'un des fruits ayant une activité antioxydante élevée par rapport aux sept fruits principaux. Ces jus ont une quantité substantielle de composés phénoliques et une activité de balayage des radicaux libres importante [65]. Ils peuvent être considérés comme des antioxydants naturels.

5.4.2.6.2. Activité antioxydante par le test FRAP

La cinétique de la réduction du fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) par les jus des trois cultivars ainsi que les concentrations inhibitrices IC50 sont exprimés dans la figure 5.17 :

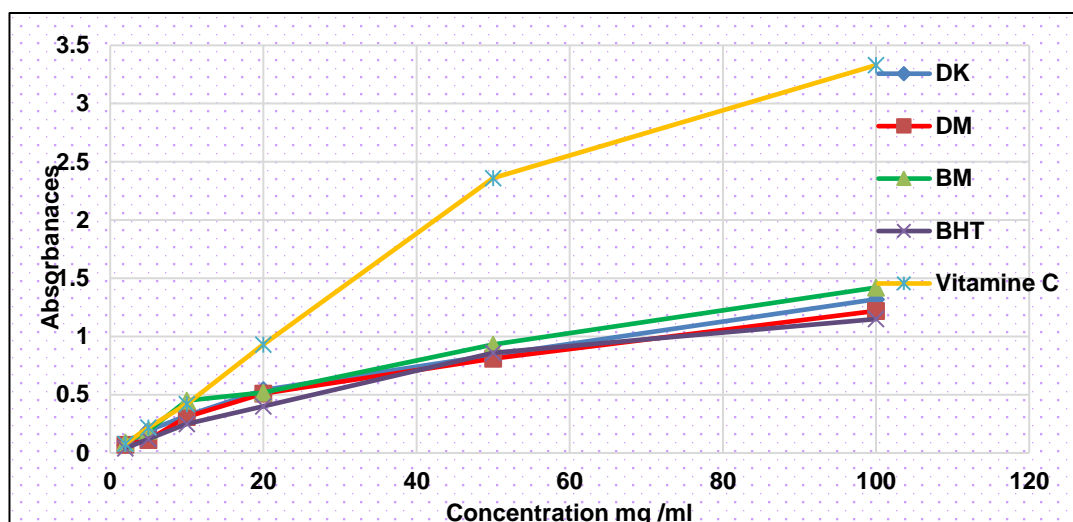


Figure 5.17 : Pouvoir réducteur des trois jus de grenade testés et des standards

D'après les résultats de la figure 5.17, les jus de grenade et des standards montrent un pouvoir réducteur de fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Une augmentation proportionnelle de l'effet réducteur par rapport aux concentrations de jus utilisés pour chaque échantillon.

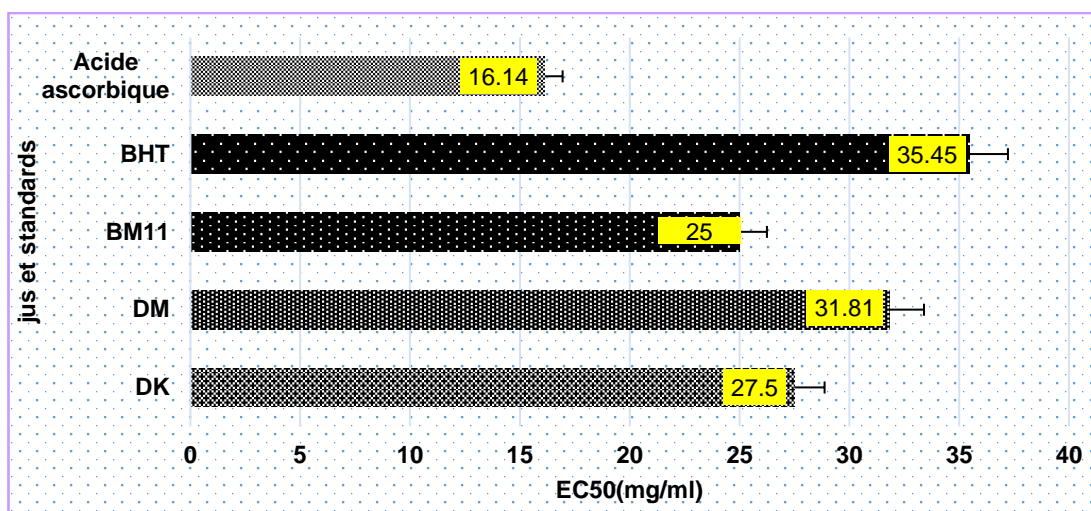
Ces effets réducteurs se différencient significativement ($p < 0,05$) et se justifient par ceux trouvés par ALCARAZ-MARMOL et *al* [204] qui ont signalé qu'il existe une augmentation linéaire avec l'augmentation de la concentration.

A une concentration de 100mg /ml, le pouvoir réducteur des trois jus est meilleur pour le cultivar Doux de Messaad avec une absorbance de $1,51 \pm 0,06$, mg/ml suivi de celui de Doux de Koléa avec $1,40 \pm 0,09$ mg/ml et de Doux de Messaad avec $1,22 \pm 0,03$ mg/ml.

En revanche, pour une concentration de 2mg/ml, les pouvoirs de jus des trois cultivars ne présentent pas de différence significative.

A cette concentration, le standard BHT a un pouvoir réducteur plus faible ($1,19 \pm 0,09$) que celui des jus, alors que celui de l'acide ascorbique est le plus élevé ($2,37 \pm 0,06$). Parallèlement, leurs pouvoirs réducteurs varient significativement ($P < 0,05$) de 0,40 à 1,19 pour le BHT et de 0,36 à 3,33 pour l'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés également en concentration efficace (EC_{50} , mg/ml) qui est la concentration de chaque jus ou standard correspondant à une absorbance égale à 0,5. La figure 5.18 présente les concentrations effectives EC_{50} (mg/mL) des trois jus grenades et standards.



IC50 (mg/ml) : concentration efficace de jus à une absorbance de 0,5; BHT : butylhydroxytoluène. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Figure 5.18 : Valeurs d'EC₅₀ des trois jus de grenades et des standards

Cette valeur d'EC₅₀ est un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle.

La concentration effective EC₅₀ la plus élevée est exprimée par le jus de Bordj Mira alors que celle de Doux de Messaad est la plus faible. Le standard acide ascorbique présente le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport au standard BHT.

Ainsi, la grenade peut être classée dans la catégorie des fruits à activité antioxydante élevée. En outre, les extraits de grenade présentaient une valeur FRAP élevée par rapport aux aliments contenant une activité antioxydante élevée telle que le thé vert et le vin rouge [232].

Les variations des activités antioxydantes des fruits de la grenade sont reflétées par l'effet des parties du fruit, du cultivar et des méthodes d'extraction des échantillons.

5.4.3. Influence des teneurs en composés phénoliques sur les activités des jus de grenade

En combinant les résultats de cette partie de notre étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une relation étroite entre les teneurs en composés phénoliques des extraits bruts et leurs capacités antioxydantes. Cette influence a été réalisée par une régression R². Les coefficients de corrélation sont rassemblés dans le tableau 5.12.

Tableau 5.12 : Corrélation linéaire entre les activités antioxydante et les teneurs en composés phénoliques

Paramètres	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins	Anthocyanes	DPPH	FRAP
Polyphénols	1,000	0,990	0,948	-0,898	0,983	-0,845

Flavonoïdes	0,990	1,000	0,894	-0,828	0,999	-0,910
Tanins	0,948	0,894	1,000	-0,990	0,874	-0,639
Anthocyanes	-0,898	-0,828	-0,990	1,000	-0,803	0,532
DPPH	0,983	0,999	0,874	-0,803	1,000	-0,924
FRAP	-0,845	-0,910	-0,639	0,532	-0,924	1,000

Les résultats rassemblés dans le tableau ci-dessus, relèvent que les polyphénols semblent être fortement corrélés avec la teneur en flavonoïdes ($r=0,990$), les tanins($r=0,948$) et l'activité anti radicalaire DPPH($r=0,983$).

Par ailleurs, des corrélations négatives existent entre les anthocyanes et les polyphénols ($r=-0,898$), les flavonoïdes ($r=-0,828$) et les tanins ($r=-0,990$). D'autre part, ils sont négativement corrélés avec l'IC₅₀ et modérément corrélés avec l'activité antioxydante FRAP.

À cet égard, LI et *al* [219] ont rapporté que l'activité radicalaire de DPPH des jus de grenade est influencée par les polyphénols($r=0,983$), les flavonoïdes ($r=0,999$) et les tanins($r=0,874$).

Dans notre étude, une forte corrélation négative a été enregistrée entre l'activité antioxydante "FRAP" et les polyphénols($r=-0,845$), les flavonoïdes ($r=-0,910$) et l'IC₅₀ ($r=-0,924$).

Nos résultats sont supérieures à ceux KALAYCIOGLU et *al* [208] qui enregistrent une corrélation significative entre le DPPH et les polyphénols ($r = 0,528$) Néanmoins, elle est absente avec les flavonoïdes.

ÇAM et *al*. [61] ont déjà démontré cette corrélation en étudiant 8 jus de grenade. Par ailleurs, GIL et *al* [13] ont rapporté que les principaux composés antioxydants dans les jus de grenade sont des tanins hydrolysables, mais les anthocyanes et les dérivés de l'acide ellagique contribuent également à la capacité antioxydante totale du jus.

La valeur de corrélation la plus élevée dans les jus de grenades a été obtenue entre l'activité antioxydante et les flavonoïdes($r=0,999$). De même, la méthode FRAP comparée à la méthode DPPH donnait la plus forte corrélation négative avec la teneur totale en flavonoïdes ($-0,910$).

5.4.4. Composés phénoliques des écorces de grenades et leur optimisation durant l'extraction

5.4.4.1. Rendements d'extraction

Les poudres d'écorces de trois cultivars de grenades de Doux de Koléa, Doux de Messaad et Bordj Mira11 ont été soumises à trois méthodes d'extractions en utilisant comme solvants un mélange de méthanol/eau (80/20).

Les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage (%) et les résultats des rendements d'extraction sont présentés dans la figure 5.19.

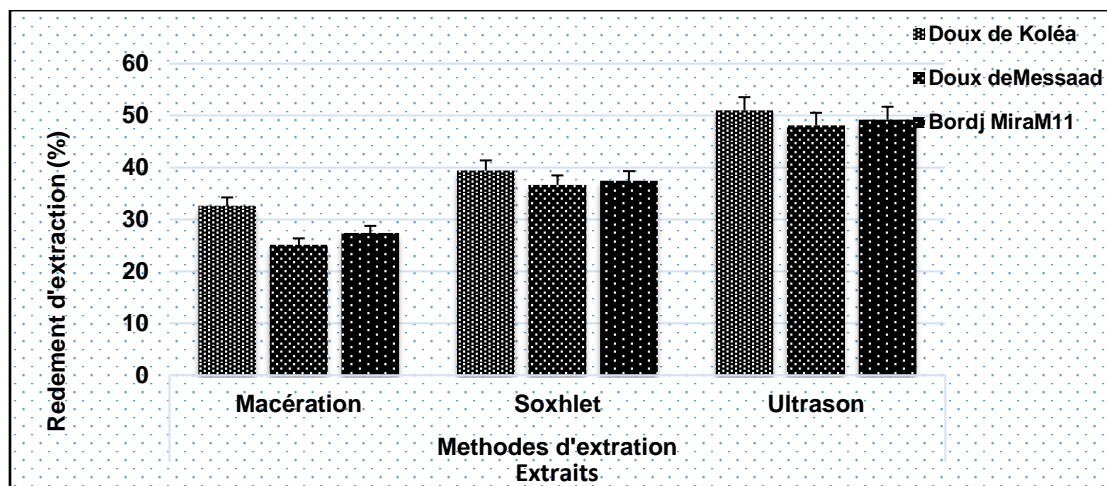


Figure 5.19 : Rendement d'extraction des écorces des trois cultivars de grenades

Les rendements les plus élevés ont été enregistrés par la technique non conventionnelle assistée par ultrason pour les extraits d'écorces des trois cultivars. Celui de Doux Koléa a donné le meilleur rendement avec $52,00 \pm 0,57$ %.

Selon ses résultats, il ressort que le rendement d'extraction diffère chez les cultivars selon la méthode d'extraction. Sur la base de ces méthodes, le pourcentage de rendement de l'écorce de grenade varie significativement ($P < 0,05$).

L'extraction par la méthode conventionnelle, soxhlet, a conduit à des rendements comparativement plus élevés ($35,63 \pm 0,09$ à $38,47 \pm 0,55$ %) que ceux de la méthode de référence mais plus faibles que ceux enregistrés par la méthode d'ultrason.

En plus de la méthode d'extraction, le rendement en composés phénoliques de plantes est associé à la polarité, la solubilité, ainsi qu'à certains paramètres d'extraction comme la nature du solvant, sa concentration, température et le temps d'extraction [32,34].

La méthode non conventionnelle a donné une forte extraction produite en quelques minutes tout en utilisant comme solvant le mélange méthanol/eau.

Des extraits méthanoliques écorces de grenades Saoudiennes obtenus par la méthode de macération, ont permis d'obtenir un rendement plus élevé ($45,4\% \pm 5,3\%$) [233].

L'amélioration du rendement d'extraction de composés bioactifs lors de l'application d'ultrasons est attribuée à l'augmentation du taux de transfert de masse due à la cavitation du solvant induite par l'onde ultrasonore traversant le milieu [255].

Nos rendements d'extraction sont nettement inférieurs à ceux enregistrés par ZAKI *et al* [234] qui ont obtenu un rendement de 48,2% en utilisant comme méthode la macération avec des extraits hydro-méthanoliques.

CHEMAT *et al* [113] ont révélé que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols.

Les résultats obtenus confirment les résultats des travaux de WANG *et al* [114] qui ont démontré que l'écorce de grenade totale extraite avec du méthanol donne un rendement supérieur à celui de l'eau et l'attribuent aux différences de la polarité entre les solvants et, par conséquent, à la solubilité du soluté.

D'autre part, LAPORNIK *et al* [130] ont signalé que la combinaison du mélange solvant organique /eau permet d'avoir un milieu à polarité modérée qui accrue l'extraction des polyphénols.

Lantzouraki *et al* [235], ont signalé aussi un rendement d'extraction de 39,40% pour la méthode de soxhlet et 51% en mode ultrason. Ces résultats concordent avec les nôtres. L'extraction par la méthode de Soxhlet est meilleure avec un solvant polaire.

Dans cette méthode, le reflux de l'ébullition du solvant peut réduire la viscosité et sa tension superficielle pour rendre les substances solubles dans la matrice végétale [121]. De plus, la température influence la circulation du solvant et l'interaction solvant/soluté améliorant ainsi la solubilisation des composés [236].

D'autre part, les rendements d'extraction élevés obtenus avec le méthanol résultent de la faible sélectivité de ces solvants, conduisant l'extraction d'une grande variété de composés.

Pour l'extraction par méthode d'extraction non conventionnelle, dite ultrason, l'effet de l'interaction entre la température et les ondes ultrasons étaient significatives (valeur $p < 0,05$). Une température plus élevée et des ultrasons ont augmenté les rendements d'extraction.

La température influe sur le rendement global en modifiant la solubilité du soluté dans le solvant d'extraction et en modifiant sa viscosité et sa densité, exerçant un effet remarquable sur l'activité de cavitation.

Le choix de la technique appropriée à l'extraction dépend de plusieurs paramètres :

- la famille des composés à extraire ;
- les caractéristiques structurales de la matrice botanique (graines, feuilles, écorces, fleurs, etc.)
- la qualité et le rendement requis pour l'extrait.
- les conditions du processus (température, pression, etc.).
- la faisabilité économique de la mise à l'échelle du processus [257].

○

5.4.4.2. Dosage des polyphénols totaux

Les méthodes de macération, de soxhlet et d'ultrason ont été appliquées pour l'extraction des polyphénols totaux. Ils nous ont permis de déterminer à l'aide d'un dosage du réactif Folin-Ciocalteu les teneurs en polyphénols totaux des extraits des écorces de trois cultivars de grenade locale. Elles sont exprimées en mg Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche. Les résultats sont représentés par la figure 5.20 :

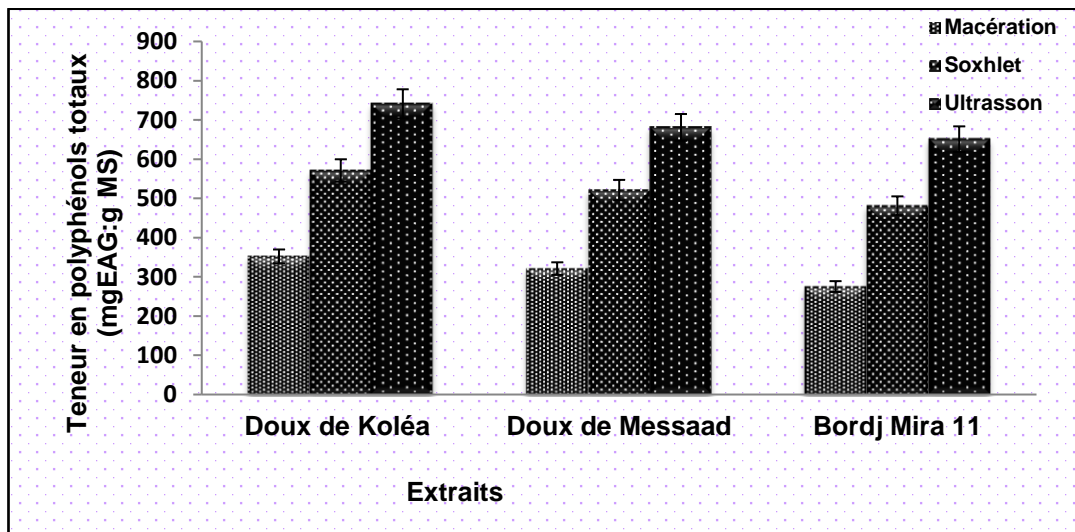


Figure 5.20 : Teneur en polyphénols totaux des extraits d'écorces de grenades

L'utilisation de solvants organiques très purs peut entraîner la déshydratation et la dégradation des cellules végétales ainsi que la dénaturation des protéines de la paroi cellulaire, rendant ainsi l'extraction de composés phénoliques difficile [253].

Pour cette raison, des mélanges hydroalcooliques sont les systèmes de solvants les mieux adaptés à l'extraction en raison des différences de polarités des composés phénoliques [238].

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux des écorces des trois cultivars de grenades montrent que l'extraction assistée par ultrasons (UAE) a enregistré des teneurs supérieures à ceux des deux autres méthodes Soxhlet et la méthode de référence.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits des trois cultivars varient significativement ($P < 0,05$) de $275,27 \pm 0,32$ à $352,11 \pm 0,49$ mg EAG /g MS pour la méthode de macération, de $481,07 \pm 0,04$ à $571,08 \pm 0,51$ mg EAG /g MS pour la méthode de soxhlet et de $641 \pm 0,57$ à $741 \pm 0,23$ mg EAG /g MS pour le procédé à ultrason. L'extraction assistée par ultrasons a permis une amélioration du rendement d'extraction de près de 3 fois comparé à l'extraction témoin.

Pour les trois méthodes d'extraction, la teneur en polyphénols totaux est plus élevée chez les extraits du cultivar de Doux de Koléa avec $352,11 \pm 0,49$ mg EAG/g MS pour la méthode de macération, celle de soxhlet avec une teneur de $571,08 \pm 0,51$ mg EAG /g MS et $741 \pm 0,23$ mg EAG /g MS pour la méthode d'ultrason.

Les différences significatives observées entre les cultivars sont probablement dues à leur génotype car ce sont des cultivars qui se sont développés dans les mêmes conditions écologiques et selon le même mode de culture [74,86].

WANG et al [114] ont révélé que le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols. Une combinaison de différents solvants est plus efficace pour extraire les antioxydants.

Les teneurs en polyphénols totaux obtenues par notre méthode de référence sont en accord à ceux obtenus par EGHDAMI et al [239] avec $330,2 \pm 0,04$ mg EAG /g MS) et supérieures à ceux trouvés par ORAK, et al [240] avec une teneur de $179,03 \pm 1,36$ mg EAG /g MS).

Pour la méthode de soxhlet, le contenu phénolique des extraits des écorces des cultivars iraniens de Malas-Saveh et d'Agha mohammadali s'établissait à $232,8 + 15,1$ et mg EAG /g MS et 168.21 ± 13.9 mg EAG /g MS respectivement. Nos résultats étaient supérieurs [241].

En raison de la différence dans l'expression des unités des résultats, les comparaisons avec les données des autres auteurs trouvaient des difficultés surtout en ce qui concerne les méthodes de soxhlet et ultrason.

D'après ALI et KUMAR et al [242], le contenu en polyphénols totaux de l'extrait variait de 182 à 400 et de 245 à 449 mg EAG/ g pour les méthodes de soxhlet et celle d'ultrasons respectivement.

En comparaison avec les différentes méthodes d'extraction, AL-RAWAHI et al [243] ont conclu que l'extraction au méthanol des écorces de grenade a montré une plus grande capacité d'extraction de composés phénoliques et qui est supérieure à celle de l'eau et de l'éthanol.

Cependant, certains auteurs ont évoqué que la présence de l'éthanol dans le solvant d'extraction a pour avantage d'accélérer le transfert de masse entre le solide et le liquide en augmentant la perméabilité des tissus végétaux et facilite la destruction des barrières entre le soluté et la matrice végétale. L'éthanol est plus préférable car il est sans danger et favorise l'évaporation de l'eau.

Travaillant sur plusieurs méthodes d'extraction, MASCI et al [262] ont justifié que les bons rendements en composés phénoliques d'écorces de grenades sont obtenus en utilisant un appareil de Soxhlet pendant 6 h.

La méthode d'extraction solide-liquide est une méthode simple qui peut être mise en œuvre sans avoir recours aux technologies développées.

En utilisant du méthanol liquide, on obtient une grande quantité de composé polyphénolique mais sauf que le composé produit sera nocif pour la santé humaine et animale. L'éthanol ou l'acétate d'éthyle est préféré dans le cas où ils produisent un bon rendement.

Il est à signaler que les résultats des teneurs en polyphénols totaux dosés par la méthode de Folin manquent d'exactitude suite à l'interférence avec d'autres facteurs de réduction comme les protéines par les acides aminés (Tyrosine, Tryptophane) et les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose [77].

Plusieurs études ont démontré l'efficacité du processus de l'extraction par ultrason par rapport à d'autres méthodes.

La Méthode à ultrason est une technologie économique et bénéfique qui n'a pas besoin d'équipement coûteux [245,246].

Les ultrasons progressent l'efficacité de l'extraction par solvant en augmentant la diffusion et en améliorant le transfert de masse et la pénétration du solvant. La cavitation acoustique qui a lieu lors de la sonication détruit les cellules des écorces et permet la libération facile des composés phénoliques [266].

La variation du contenu phénolique total de la grenade peut être influencée par le solvant utilisé pour l'extraction [247].

5.4.4.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de faible masse moléculaire produits par les plantes. Ils appartiennent à la classe des composés phénoliques et présentent une activité antioxydante élevée [72].

Les résultats des flavonoïdes des extraits des écorces de grenade estimés par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et exprimés en mg EQR/g MS, obtenus par les trois méthodes d'extraction sont indiqués dans la figure 5.21 :

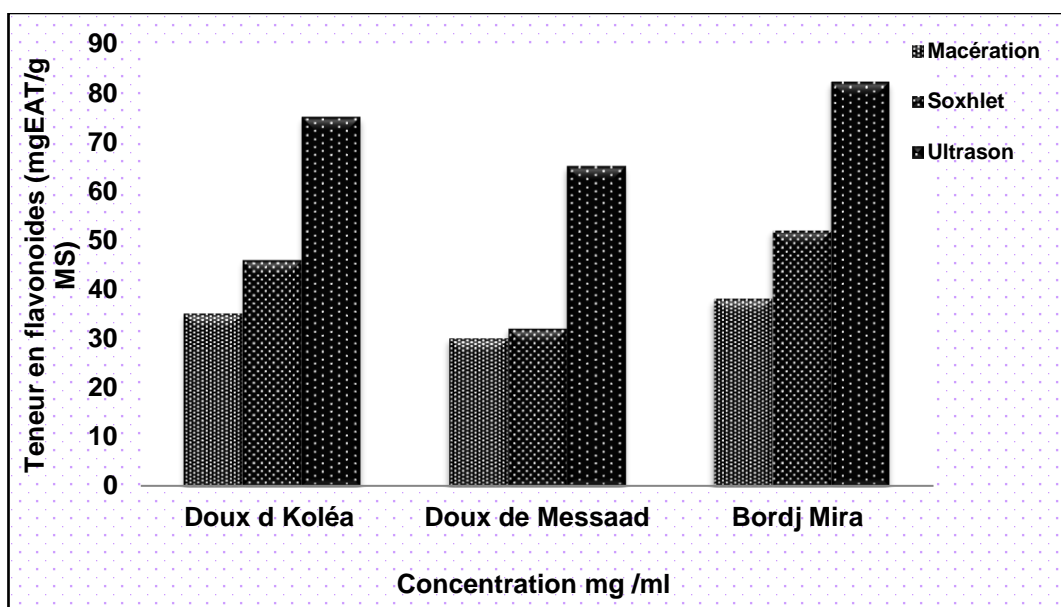


Figure 5.21 : Teneur en flavonoïdes des extraits d'écorces de grenades

Le taux en flavonoïdes des extraits hydrométhanoliques des trois cultivars de grenades varient significativement ($P < 0,05$). Les résultats de la méthode de référence varient de $30,32 \pm 0,46$ à $38 \pm 0,23$ mg EQR/g, celle de soxhlet de $32 \pm 0,12$ à $52 \pm 0,54$ mg EQR /g MS alors que la méthode d'ultrason montre des teneurs plus élevées et qui varient de $65,04 \pm 0,24$ à $82,09 \pm 0,09$ mg EQR/g MS.

Selon les résultats globaux obtenus, le contenu phénolique total des écorces des trois cultivars de la grenade était plus élevé avec la méthode d'ultrason.

Li et al [80] ont rapporté que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait d'écorces de grenade. Ce fruit contient plusieurs molécules de flavonoïdes, constituant près de 0,2 à 1,0% du poids du fruit. Environ 30% de toutes les anthocyanidines de fruits sont concentrées dans l'écorce du fruit.

La variation des teneurs en composés phénoliques dépend du type de cultivar et de diverses phases de développement du fruit qui sont responsables des variations de la couleur de l'écorce, ce qui s'exprime par la variation des teneurs en flavonoïdes [208].

Nos résultats obtenus par la méthode de macération mettent en exergue une concordance avec les résultats de LI et *al* [80] qui signalent une teneur de 59,1 mg ER /g MS et avec ceux de MUTAHAR et *al* [141] qui trouvent une teneur de $56,4 \pm 2,7$ EQR/g MS).

Nos résultats obtenus sont supérieurs à ceux évoqués par ARDEKANI et *al*. [264] et qui s'estiment à $25,05 \pm 0,56$ mg Eq Qr /g MS.

A l'instar de ce qui a été déjà observé des polyphénols totaux pour la méthode de soxhlet, la teneur en flavonoïdes était toujours plus élevée pour les extraits d'écorces des trois cultivars de grenades par rapport à ceux de la méthode de référence.

LI et *al* [219] ont déduit que cette différence en teneurs des flavonoïdes est étroitement liée au type de fruit (aigre ou doux) et la région de croissance.

La grenade est composée d'une riche variété de flavonoïdes qui comprennent environ 0,2% à 1,0% du fruit. Environ 30% de toutes les anthocyanidines présentes dans la grenade sont contenues dans l'écorce. Ils sont constitués de flavonols, des flavones, du kaempférol, de la lutéoline, de la quercétine et une teneur élevée en acides phénoliques tels que l'acide caféique, les acides fumariques, l'acide chlorogénique et l'acide p-coumarique [246].

Les ellagitannins, la catéchine et l'acide ellagique sont aussi présent.

Lantzouraki et *al* [235] ont prouvé que l'utilisation des ultrasons pour extraire les composés bioactifs de la matrice végétale peuvent favoriser la rupture des cellules en améliorant le contact soluté / solvant.

Ils ont observé aussi, que les ultrasons augmentent l'effet de la cavitation et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur qui augmentent elle-même la dégradation des composés thermolabiles.

Les principaux constituants chimiques isolés de l'écorce de grenade par la méthode chromatographique HPLC sont les suivants : acide gallique, acide ellagique, acide caféique, acide chlorogénique, acide p-coumarique [247].

L'extraction assistée par ultrason réduisait considérablement le temps d'extraction et augmentent les rendements d'extraction de nombreuses matières

végétales. Cependant, peu de travaux rapportent l'utilisation de cette méthodologie dans les processus d'extraction de *Punica granatum L.*

5.4.4.4. Dosage des tanins hydrolysables

Les résultats obtenus par l'effet des trois méthodes d'extraction sur la teneur en tanins hydrolysables sont présentés par la figure 5.22 :

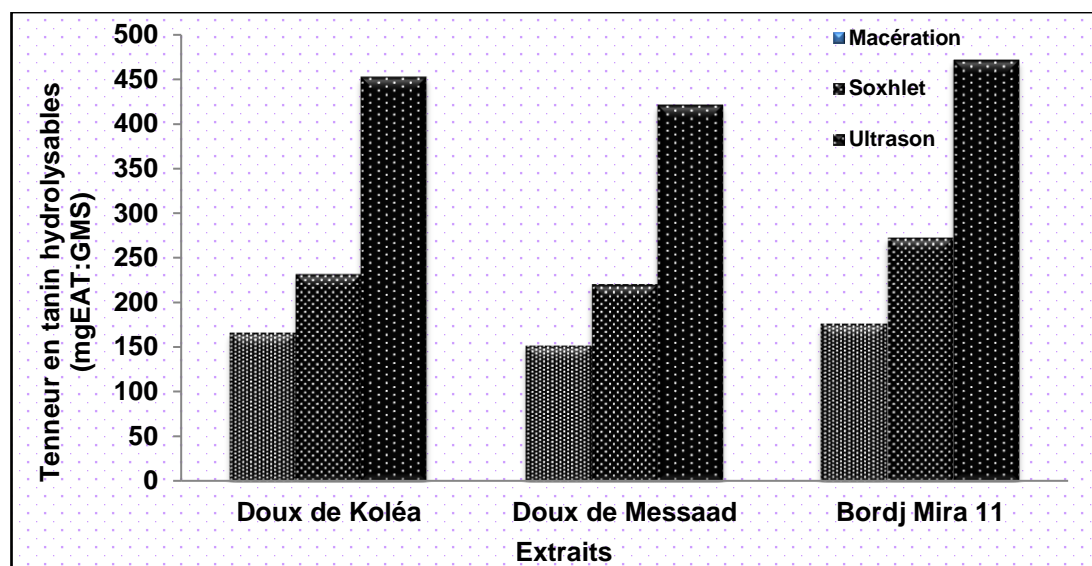


Figure 5.22 : Teneur en tanins hydrolysables des extraits de grenades

Les résultats des teneurs en tanins hydrolysables dans les écorces des trois cultivars étudiés variaient en fonction de la méthode de l'extraction et du cultivar étudié.

STINTZING et al [244] ont suggéré qu'il existait une grande diversité sur la méthode appropriée pour évaluer les composés phénoliques (tanins) dans les tissus végétaux.

Les écorces extraites par la méthode assistée par ultrason ont enregistré un meilleur taux par rapport aux deux autres méthodes. Ces tanins hydrolysables sont exprimés en mg EAT/ g MS et varient en fonction de la méthode d'extraction.

La méthode de macération a enregistré des teneurs en tanins hydrolysables situées entre $151,32 \pm 0,08$ et $175,15 \pm 0,04$ mg EAT/ g MS), inférieures à celles obtenues par la méthode de soxhlet et qui varient de $220,08 \pm 0,23$ à $271,64 \pm 0,13$ mg EAT/ g MS.

En revanche, les concentrations moyennes en tanins hydrolysables des extraits hydro-methanoliques enregistrées ($421,07 \pm 0,16$ à $471,32 \pm 0,7$ mg EAT/g MS) et sont obtenus par la méthode assistée par ultrason.

Les teneurs en tanins hydrolysables sont relativement proches pour les trois cultivars avec un maximum de $471,32 \pm 0,7$ mg EAT/ g MS (Doux de Messaad) pour la

méthode d'ultrason et un minimum de $151,12 \pm 0,08$ mg EAT/ g MS (Doux de Koléa) pour la méthode de référence.

En plus de la méthode d'extraction, SAAD et al [241] ont souligné que ces résultats montrent clairement la part la plus importante des tanins hydrolysables dans les écorces de grenade et les différences pourraient être expliquées par des différences génétiques et d'échantillonnage "environnemental".

D'autre part et pour des cultivars tunisiens, EL FALLEH et al [53] ont obtenus des teneurs proches de nos résultats avec $139,63 \pm 4,25$ mg EAT/g MS.

Les écorces de grenade constituent une source importante de tanins par rapport à ceux présents dans différents bois, celui de *Pinus sylvester* qui a enregistré 6,7 mg EAG / g MS), le *Cedrus atlantica* avec 8,2 mg GAE / g MS) et enfin le bois *Quercus robur* a révélé une teneur de 64,7 mg GAE / g MS [147].

En comparaison avec les résultats obtenus pour des cultivars tunisiens obtenus par une méthode de macération, nos résultats sont proches avec un maximum de $175,15 \pm 0,04$ mg EAT/g MS.

SINGH et al [73] ont étudié des cultivars turcs et ont présentés des concentrations en tanins hydrolysables 22 à 27 fois supérieures à celles des tanins condensés.

Ces résultats montrent que les niveaux fluctuants de tanins hydrolysables entre les différents cultivars pourraient être dus à l'épaisseur de ces écorces. Les épaisseurs de grenade mentionnées dans la littérature sont de 4,0 mm, 3,5 mm et 3,2 mm pour les cultivars tunisiens [245]. La teneur en tanins varie avec l'épaisseur de l'écorce.

Par ailleurs et selon QU et al [183], la polarité du solvant, la méthode et la température d'extraction, le rapport solide/solvant et la taille des particules sont des paramètres déterminants pour le processus d'extraction.

5.4.5. Les extraits des écorces de grenade comme antioxydants et antimicrobiens

5.4.5.1. Activité anti-radicalaire DPPH

Le DPPH est un composé radicalaire largement utilisé pour déterminer la capacité de piégeage des radicaux libres de divers échantillons. Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits d'écorces du cultivar Bordj Mira étudié sont

exprimés en termes de pourcentages d'inhibition du radical DPPH et sont présentés par la figure 5.23 :

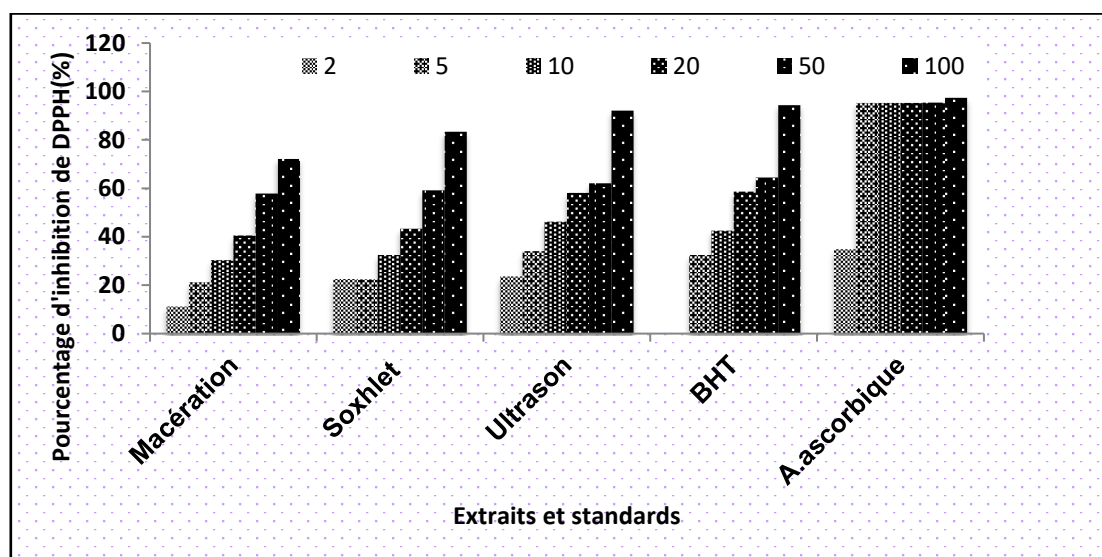


Figure 5.23 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH du cultivar Bord j Mira

Des différences significatives ($P < 0,05$) ont été trouvées entre les valeurs des extraits des trois méthodes et ceux des standards. Les résultats obtenus par la méthode assistée par ultrason sont les plus élevés.

La variabilité des résultats des différentes activités antioxydantes peut être expliquée par la différence en teneurs des composés phénoliques.

Selon CALIN-SANCHEZ et *al* [31], l'activité antioxydante est modifiée en fonction de la partie du fruit de grenade.

Les écorces de fruit grenades exhibent la plus grande valeur d'activité antioxydante testés par les trois méthodes d'extraction à une concentration de 100 mg/ml. Cette activité a enregistré un pourcentage de 72,11 %, 83,33% et de 92,11 pour chacune des méthodes étudiées.

Les méthodes de macération et soxhlet et celle assistée par ultrason montrent des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH présentant une différence significative du pouvoir de piégeage ($P > 0,05$).

Pour la méthode de référence, nos résultats sont nettement inférieurs à ceux rapportés par MUTAHAR et *al* [230] qui ont trouvés un pourcentage de 99,3%.

Ces auteurs ont montré que l'activité de balayage de DPPH en tant que réaction REDOX était clairement liée aux composés phénoliques totaux des extraits des écorces de grenades.

A des concentrations de 100 µg/ml, les pourcentages d'inhibition de DPPH pour les extraits de deux cultivars Egyptiens Manfalouty et Wardey ont atteint 80,21% et 70,87% respectivement par rapport à ceux du BHA (97,5% [281]). Ces résultats concordent avec les nôtres.

Nos résultats confirment ceux obtenus par EL FALLEH et *al* [53] sur l'activité antioxydante, en signalant qu'elle est plus élevée avec le méthanol et que les extraits de grenade ont démontré forte élimination des radicaux DPPH.

MANSOUR et *al* [221] ont montré une variabilité des résultats de l'activité antioxydante pour des cultivars tunisiens, selon le solvant utilisé (méthanol et eau) et qu'ils étaient fortement corrélés aux composés phénoliques totaux.

Actuellement, plusieurs travaux réalisés sur des extraits de grenades en vue de l'étude de leurs activités antioxydants ont révélé des corrélations entre les deux méthodes étudiées soxhlet et d'ultrason.

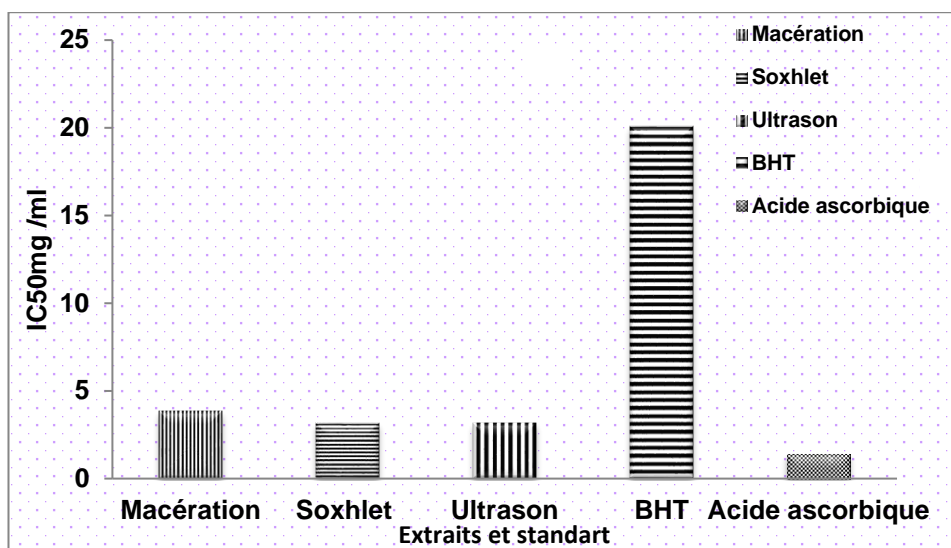
L'activité d'élimination des radicaux de DPPH varie de 15 à 56,02% pour la première méthode de référence et de 51,84 à 67,94% pour la deuxième méthode de soxhlet [248]. Ces résultats sont inférieurs aux résultats obtenus par les extraits de notre cultivar local.

Par ailleurs et en comparaison avec les résultats obtenus avec CARNIEL et *al* [247] qui ont étudié l'activité antioxydante en utilisant comme solvant l'éthanol par la méthode assistée par ultrason, leurs résultats concordent avec les nôtres et qui ont présenté une inhibition allant de 88,00% à 92,35%.

L'extraction assistée par ultrasons augmente significativement les teneurs en flavonoïdes individuels par rapport aux méthodes conventionnelles. L'intensification de l'extraction par l'utilisation des ultrasons peut être attribuée à la propagation des ondes de pression ultrasonores dans le solvant [246].

L'activité de piégeage des radicaux libres déterminée par DPPH a été exprimée en tant que valeur IC_{50} (la concentration efficace de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH initial). L'activité antioxydante des extraits de grenades obtenus pour l'ensemble des trois méthodes a été comparée à ceux de deux antioxydants standards : la vitamine C et le BHT.

Les concentrations en extraits d'écorces de grenades qui inhibent le 50% du radical libre DPPH varient de 3,12 à 3,83 pour les trois méthodes, soit supérieur à ceux de la vitamine C ($IC_{50} = 20,10 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$) et du BHT ($IC_{50} = 20,10 \mu\text{g} \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$). Les résultats sont présentés dans la figure 5.24 :



IC₅₀ (mg/ml) : concentration de l'extrait de grenade inhibitrice d 50% du DPPH ; BHT :butylhydroxytoluène .

Figure 5.24 : Valeurs des IC₅₀ des extraits de l'écorce de Doux de koléa

La comparaison des IC₅₀ de nos extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction ont révélé que la méthode d'ultrason a un pouvoir antioxydant plus élevé que celui obtenu par la méthode soxhlet.

Cette concentration IC₅₀ de l'extrait du cultivar Doux de Koléa était plus active par rapport à celle du standard BHT qui enregistrerait une faible inhibition. Ainsi, l'extrait d'écorces de Doux de Koléa peut être utilisé en industrie agroalimentaire comme agent efficace contre l'oxydation.

Les concentrations qui inhibent le 50% du radical DPPH dans cette étude sont en concordance avec celles enregistrées par EL FELLAH et *al* [59], soit une IC₅₀ de 3.58±0.38 µg/ml.

Cependant, les résultats des extraits de grenades ont été inférieurs à nos résultats et qui étaient enregistré par MASCI, et *al*. [265] qui ont démontré que l'IC₅₀ du BHT est quatre fois plus élevé que celle de l'écorce de grenade.

Pour la méthode de soxhlet, les concentrations inhibitrice du radical DPPH obtenus par MANSOUR et *al* [171] sont proches des nôtres à des concentrations (1,9 à 4,3 µg / ml).

La concentration obtenue par l'extrait de Doux de koléa a été aussi comparable avec celle de NEGI et JAYAPRAKASHA [249] qui a utilisé quatre différents solvants comprenant l'éthanol, l'acétone, le méthanol et de l'eau et qui confirme que le méthanol a donné le rendement plus élevé en antioxydants et le plus bas avec l'eau.

En effet et en raison des différents potentiels antioxydants de différents composés, l'activité antioxydante de l'extrait de grenade dépend fortement du solvant d'extraction.

Les concentrations d'inhibition de 50% du DPPH obtenus par la méthode conventionnelles Soxhlet et celle assistée par ultrason ont montré que la deuxième méthode a enregistré des résultats qualitatifs et quantitatifs meilleurs.

Pour la méthode assistée par ultrason et en comparaison avec nos résultats, KONSOUA [250] a évoqué qu'une IC₅₀ plus faible et qui variait entre 0,06 et 0,08 mg/ml dans les écorces de grenades, présente une activité anti-radicalaire supérieure à celle trouvée dans les jus et les pépins avec des IC₅₀ comprises entre 1,3 -1,7 et 0,48-0,62 respectivement.

L'activité antioxydante des écorces de grenades est 8 à 21 fois plus élevée que celles des jus et des pépins respectivement.

Sur la base des résultats obtenus par la concentration d'IC₅₀, l'étude en cours s'associe aux études précédentes rapportant une activité plus intense de piégeage des radicaux par le DPPH dans les écorces de la grenade par rapport à la pulpe de grenades tunisienne [65].

L'activité antioxydante des plantes et leurs extraits est essentiellement due à la présence de composés phénoliques. En conséquence, de nombreuses études ont confirmé l'existence de bonnes corrélations entre les teneurs en composés phénoliques et leur activité antioxydante des plantes. Le tableau 5.13 présente le résultat de la matrice de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire DPPH :

Tableau 13 : Matrice de corrélation de l'extrait de grenade

Paramètre	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins hydrolysables	DPPH
Polyphénols totaux	1,000	-0,844	0,865	0,887

Flavonoïdes	-0,844	1,000	-0,460	-0,500
Tanins hydrolysables	0,865	-0,460	1,000	0,999
DPPH	0,887	-0,500	0,999	1,000

Dans le but de connaître lequel de ces composés phénoliques est responsable de l'activité antioxydante, il est intéressant de la relier avec les teneurs de ces composés. Une exploration de cette liaison a consisté à déterminer la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins hydrolysables et l'activité antiradicalaire DPPH.

Une corrélation fortement significative a été établie entre les teneurs des polyphénols, les tanins hydrolysables et l'activité antioxydante (0.887 et 0,999) et 0.99, $p \leq 0.05$). Cependant, une corrélation faible a été évaluée d'une part entre le l'activité antioxydante et les flavonoïdes($r=-0,460$). D'autre part, ces derniers sont négativement corrélés avec les polyphénols totaux($r=-0,844$).

FISCHER et al [77] et EL FALLEH et al [59] ont rapporté une bonne corrélation avec les teneurs en polyphénols totaux et en tanins hydrolysables pour la méthode de macération($r=0,865$).

L'activité antioxydantes du l'extrait était bien supérieure à celle de jus de grenade et a été également associées aux composés phénoliques totaux. Ainsi, leurs variations se reflétaient par les effets des parties du fruit, du cultivar et des méthodes d'extraction des échantillons.

5.4.6. Activité antimicrobienne

L'émergence des germes multiresistants causant une perte de l'efficacité des antibiotiques a poussé les scientifiques à la recherche de nouvelles molécules naturelles jouant le rôle d'agent antimicrobien.

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits des écorces des trois cultivars de grenades a été évaluée par deux tests : le test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits par la méthode de diffusion sur gélose et les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

A cet effet, une comparaison de la capacité des extraits des écorces des trois cultivars à inhiber la croissance des micro-organismes a été réalisée.

5.4.6.1. Test de sensibilité par la méthode de diffusion sur gélose

L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donné par MUTAI et al [82] qui ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice : lorsque le diamètre d'inhibition ≥ 30 mm
- Fortement inhibitrice lorsque : $21\text{mm} < \text{le diamètre d'inhibition} < 29\text{mm}$.
- Modérément inhibitrice lorsque : $11\text{mm} < \text{diamètre d'inhibition} < 20\text{mm}$.
- Légèrement inhibitrice lorsque : $10\text{ mm} \leq \text{diamètre de la zone d'inhibition} < 16\text{ mm}$.
- Non inhibitrice : diamètre d'inhibition < 10 .

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition de ces extraits vis-à-vis des quatre souches bactériennes et deux souches fongiques sont reportés par la figure 5.25 :

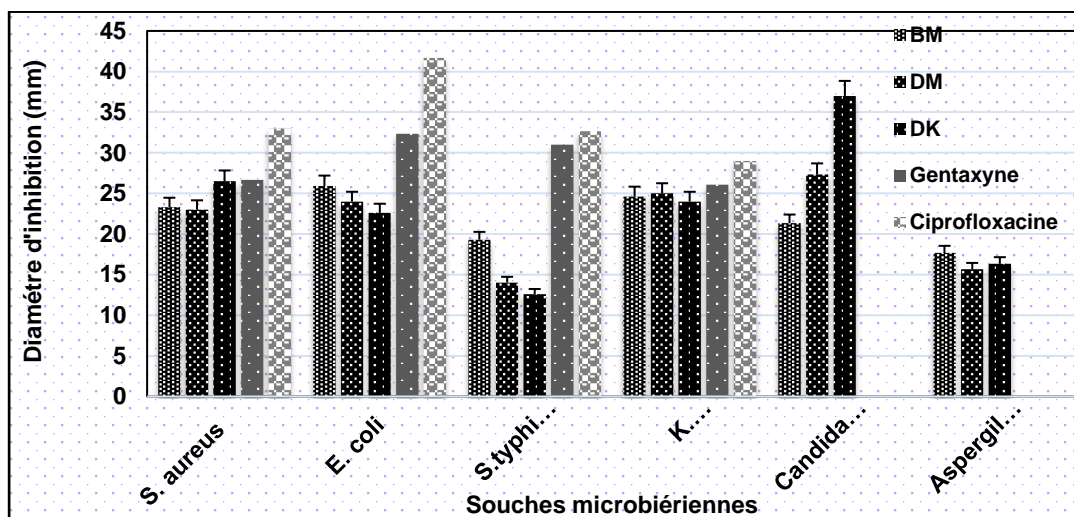


Figure 5.25 : Zones d'inhibition des extraits d'écorces de grenades et d'antibiotiques

Ces résultats montrent une différence significative avec chacune des souches bactérienne et fongique. Elles présentent un comportement différent vis avis des extraits testés et aussi des antibiotiques.

Les résultats de l'activité antimicrobienne reportés dans la figure 5.25 montrent que les trois extraits étudiées sont actives vis-à-vis des bactéries Gram (-) (*E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. typhémuruim*) et Gram (+) (*S. aureus*). L'effet inhibiteur des extraits testés s'est exprimé aussi bien avec les souches fongiques.

En effet, l'extrait de Bordj Mira 11 a manifesté une forte activité inhibitrice avec la souche de bactéries Gram positive, *Staphylococcus aureus* (23,3 mm) qu'avec celles Gram négatives *Echerichia Coli* (25,9 mm) et *Klebsiella pneumonia* (24,6mm). Avec la souche *Staphylococcus typhémuruim*, il s'est montré légèrement inhibiteur.

Par ailleurs, cet extrait a montré aussi une inhibition modérée contre les souches fongiques *Candida albicans* (21,33mm) et *Aspergillus niger* (17,66mm).

L'extrait de Doux de Messaad a montré une forte activité contre la souche gram positive de *S.aureus* (23mm), ainsi qu'avec les souches gram négatives *E.coli* et *K.pneumoniae* (24mm et 25mm) respectivement.

Pour la souche gram négative *S.typhémuruim*, une légère activité inhibitrice s'est enregistrée (14,03mm).

Pour les souches fongiques, cet extrait a montré une action fortement inhibitrice pour la souche de *Candida albicans*(27,33mm) et légèrement inhibiteur pour la souche d'*Aspergillus niger*(15,66 mm).

L'extrait de Doux de Koléa de sa part a montré une forte activité inhibitrice sur les trois souches bactériennes *S.aureus* (26,5 mm),*E.coli* (22,6mm) et *K.pneumoniae*(24mm). Pour la bactérie *S.typhémuruim*, l'action était légèrement inhibitrice (12,6mm).

Avec les souches fongiques, cet extrait a montré une très forte activité inhibitrice contre la levure *Candida albicans*(37mm) et légèrement inhibiteur avec le champignon d'*Aspergillus niger* (16,66mm).

La souche de bactérie à gram (+), *Staphylococcus aureus* a révélé des diamètres d'inhibition différents pour les deux antibiotiques avec 26,66±1,52mm pour Gentamycine et 33±2,65mm pour l'antibiotique Streptomycine.

Les deux antibiotiques ont manifesté une forte action inhibitrice contre la majorité des souches bactériennes négatives, avec 32,33mm et 26,08mm de Gentamicine contre *E.coli* et *K.pneumoniae* respectivement. Streptomycine a montré une inhibition plus forte que le premier contre ces deux souches négatives avec 41,66mm pour *E.Coli* et 29mm pour *K.pneumoniae*.

La souche *S.typhémuruim* a enregistré des zones d'inhibition très forte, 31mm avec Gentamicine et 32,66 pour l'antibiotique Streptomycine.

Nos extraits testés ont présenté tous une activité bactéricide contre les souches Gram (+) et Gram (-) ainsi qu'une activité fongicide plus ou moins forte.

Selon nos résultats, les extraits ont une activité antimicrobienne très diversifiée et variable, ils attaquent les souches testées avec une intensité différente selon le type d'extrait et la souche microbienne.

Les extraits des trois cultivars de *Punica granatum L.* ont montré le meilleur effet inhibiteur dans cette méthode, avec le plus grand diamètre enregistré contre

staphylococcus aureus de $27,9 \pm 0,30$ mm, plus proche du diamètre donné par l'action de l'antibiotique Streptomycine ($33 \pm 2,65$ mm) et plus fort que celle manifestée par Gentamicine ($26,66 \pm 1,52$).

Ces résultats sont prouvés par l'étude de NEGI et al [249] sur un cultivar de *Punica granatum* L où l'extrait avait une activité inhibitrice intéressante avec un effet antibactérien manifesté sur cinq souches testées avec des diamètres d'inhibition variant de $11 \pm 0,03$ à $34 \pm 0,01$ mm et qui sont plus inhibiteurs que ceux trouvés par les antibiotiques.

Mansour et al [221] ont démontré que les extraits de grenade ont une activité antimicrobienne significative contre *Echerichia coli* et *Staphylococcus aureus*, leurs résultats corroborent avec les nôtres.

D'autre part, les travaux d'AL-ZOREKY [183] ont montré que des extraits d'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de ces deux dernières souches [28].

Une autre étude in vivo et in vitro de CHOI et al. [252] ont montré que les effets de divers d'extraits d'écorces de grenade ont inhibé la croissance de la souche *Salmonella* [29].

Selon les résultats de plusieurs tests antibactériens, il est à constater que les souches bactériennes présentent une sensibilité élevée liée à la composition de la membrane de la bactérie (Gram positif et Gram négatif) et le composant majeur de l'extrait.

REGUIEG ET HAMMADI [177] ont signalé que cette activité inhibitrice peut être due à la présence de tanins qui pourrait être responsables par leur capacité à inactiver la synthèse de certaines enzymes et des protéines membranaires des microorganismes avec des polysaccharides.

Les bactéries Gram négatifs sont plus résistantes que les bactéries Gram positifs grâce à leurs membranes externes lipopolysaccharidiques (LPS) [178].

5.4.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Une détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) relative à nos extraits les plus actifs sur les bactéries à Gram (+) et ceux négatives a été réalisée.

Par ailleurs, plus cette CMI est faible plus l'activité antibactérienne des extraits est meilleure.

L'évaluation des CMI des extraits de trois cultivars de grenades ont révélé une variation du pouvoir inhibiteur selon l'extrait testé et selon la souche bactérienne.

L'extrait de Doux d koléa a montré une tolérance pour les quatre souches bactériennes, la souche de *Staphylococcus aureus* avec une CMI faible de 0,125 mg/ml révélant un fort pouvoir inhibiteur.

Pour les souches gram négatives, cet extrait a montré un pouvoir inhibiteur similaire pour *E.coli* et *K.pneumoniae* (0,25 mg/ml). cependant, CMI est plus forte (1,35 mg/ml) avec *S.typhémuruim*. Un faible pouvoir inhibiteur a été enregistré.

L'extrait de Doux de Messaad a montré une CMI similaire pour les deux souche de *S.aureus* et *E.coli* (0,25mm). La souche de *Klebsielle pneumonia* a montré une action inhibitrice plus faible.

Les écorces du cultivar Bordj Mira ont montré des CMI proches contre les souches de *S.aureus* et *S.typhémuruim* (0,65mg/ml) et 0, 78 mg/ml pour *E.Coli* et *K.pneumonia* qui a montré une CMI plus faible de 0,25mg/ml. Les résultats des CMI obtenues sont rapportés dans la figure 5.26 :

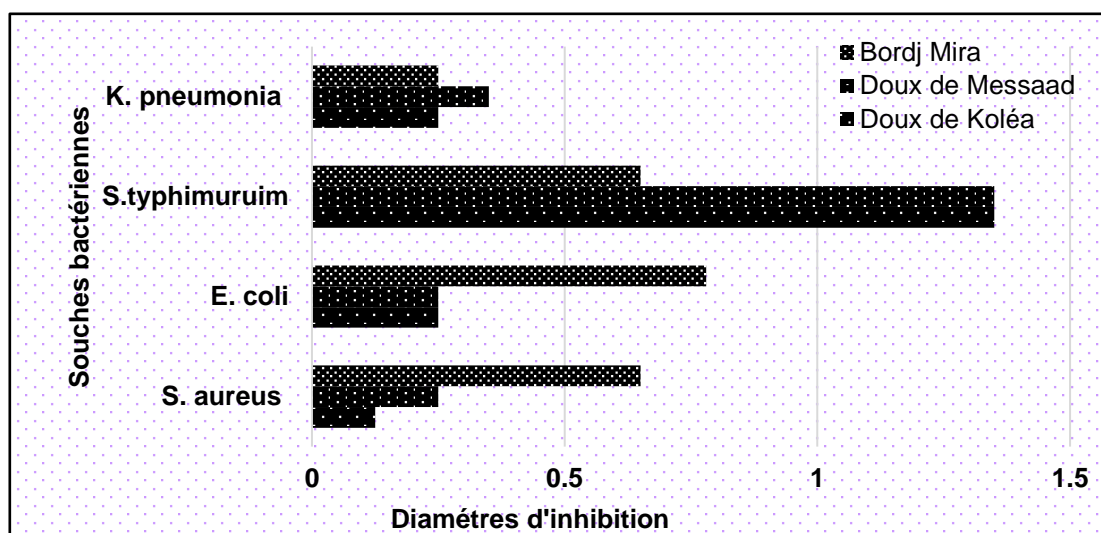


Figure 5.26 : CMI de l'extrait des écorces de trois cultivars de grenades

Les souches *Klebsiella pneumonia* et *S.aureus* présentent des CMI proches qui laissent dire que chacun des extraits testés présentent une plus faible activité inhibitrice contre cette souche.

Doux de Koléa a révélé une activité bactéricide contre les quatre souches testées.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'activité antibactérienne des extraits d'écorce de grenades sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Ainsi, REGUIEG et HAMMADI [177] ont signalé que l'extrait méthanolique présente une tolérance sur toutes les souches testées avec une concentration allant de 0,07 à 1,25 mg / ml. Il est capable de tuer plus de 90% de la population bactérienne

initiale. Ces auteurs rajoutent aussi que le mécanisme de l'effet antibactérien de cet extrait peut être dû à la présence de tanins dans ces extraits qui se lient à des protéines riches en proline et pouvant interférer avec la synthèse des protéines des parois bactériennes.

AL-ZOREKY [99] a rapporté aussi de son côté que les flavonoïdes réagissent également dans ce mécanisme et peuvent former des complexes avec les protéines solubles et les parois cellulaires des bactéries. En revanche, les saponines présentes dans cet extrait exercent également un effet antibactérien qui peut être attribuable à sa capacité à provoquer des fuites de protéines ainsi que certaines enzymes de la cellule.

D'autre part, l'addition de l'extrait de grenade riche en composés phénoliques peut provoquer une perte de la perméabilité sélective de la membrane cellulaire en modifiant ces propriétés physiques.

5.5. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par d'un plan d'expériences

Dans cette partie la méthode d'extraction de référence a fait l'objet d'une optimisation. Trois paramètres ont été testés : la concentration du solvant, le temps et la température d'extraction.

En revanche, il a été démontré que les écorces de grenade possédaient une activité antioxydante supérieure à celle des parties comestibles (arilles) en raison de l'abondance de flavonoïdes et de tanins [249].

Le solvant a été choisi par rapport à son degré de toxicité et son effet environnemental. Notre objectif était de déterminer l'effet de ces paramètres sur la quantité de polyphénols totaux et le pourcentage de l'activité antioxydante de DPPH. Ces derniers dépendent forcément des conditions opératoires.

Suite à des essais préliminaires composés de plusieurs expériences, nous sommes parvenus à sélectionner les trois paramètres. Le ratio (1g/20ml) a été maintenu fixe.

5.5.1. Optimisation des performances de l'extraction

L'efficacité du procédé d'extraction des composés phénoliques est régulée par différents paramètres. Des mélanges d'alcools contenant différentes proportions d'eau se sont révélés plus efficaces pour extraire les composés phénoliques [289].

La quantité de polyphénols totaux et le pourcentage de l'activité antioxydante obtenue à partir des extraits écorces grenade par la méthode de référence varie selon différentes conditions d'extraction.

Chaque point du plan d'expériences est capable de nous donner un certain nombre de réponses, mais dans notre cas comme il a été signalé auparavant à savoir, Contenu en polyphénols totaux et pourcentage d'activité antioxydante. Les résultats expérimentaux relatifs à chaque point du plan d'expériences sont présentés dans le tableau 5.14.

Tableau 5.14 : Données expérimentales des 15 essais du plan d'expériences

N°Exp	X1(%)	X2 (mn)	X3 (°c)	Polyphénols totaux (mgEAG/g MS)	AA (%)
1	20	60	50	343,75±0,64	84,74±0,12
2	50	120	70	336,75±0,20	92,59±0,16
3	80	90	70	438,75±0,33	85,64±0,22
4	80	120	50	749,75±0,21	92,41±0,34
5	50	120	30	429,50±0,29	90,02±0,54
6	20	120	50	364,00±0,24	91,12±0,28
7	50	90	50	387,25±0,32	78,29±0,66
8	50	60	30	312,5±0,25	82,87±0,32
9	50	90	50	389,25±0,56	78,29±0,43
10	20	90	30	374,00±0,44	75,90±0,16
11	80	60	50	540,00±0,11	82,18±0,41
12	80	90	30	456,20±0,15	76,87±0,37
13	50	60	70	328,75±0,42	86,76±0,19
14	50	90	50	379,25±0,56	86,46±0,31
15	20	90	70	338,50±0,64	78,48±0,25

Une grande variabilité d'une ligne d'essai à une autre a été observée. Les teneurs en polyphénols totaux varient de 312,5 à 749,75 mg EAG/g de MS, et une activité antioxydante de 72,59 à 92,41%.

L'extraction à une concentration de 80 % d'éthanol, à une température de 50°C pendant 120 mn a enregistré une teneur de polyphénols totaux deux fois plus élevée que celle obtenue à une concentration de 20 % d'éthanol. L'addition d'une faible quantité d'eau à un solvant organique conduit habituellement à un milieu plus polaire, ce qui facilite l'extraction des polyphénols [56]. Une concentration 80% d'éthanol améliore dans le temps de manière significative le rendement en polyphénols totaux.

Le mélange de solvants permet de moduler la polarité et de modifier la solubilité de différents composés phénoliques dans le solvant d'extraction.

Des teneurs plus faibles ont été obtenues avec une concentration de 50% d'éthanol à un temps de 120mn, enregistrant $336,75 \pm 0,20$ mg EAG/g MS, alors que pour un temps de 60 mn et à une température de 30°C, la teneur est moins élevée $312,5 \pm 0,25$ mg EAG/g MS. Ce résultat confirme que si la température est diminuée à un temps moins élevée le rendement en polyphénols totaux est plus faible.

Pour les résultats de l'activité antioxydante, le pourcentage d'inhibition est plus élevé, évalué à 92,41% pour une concentration de solvant (80%), un temps de 120mn et une température de 50°C. Une augmentation du contenu de polyphénols et de flavonoïdes, se traduit toujours par une activité antioxydante très élevée [13].

Ces résultats montrent que la teneur en polyphénol est influencée par la concentration du solvant, alors que de l'activité antioxydante est influencée par le temps et la température.

5.5.2. Résultats de l'analyse du plan d'expériences pour les polyphénols totaux

Après avoir déterminés les valeurs de chacune des réponses à partir des résultats expérimentaux, une analyse de la variance nous a révélé la validité des résultats et qui sont présentés dans le tableau 5.15 :

Tableau 5.15 : Analyse de la variance pour les polyphénols totaux

Facteurs	Polyphénols totaux				
	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré des moyens	Rapport F	p
X ₁ : Concentration du solvant	106307,6	2	53153,78	9,793077	0,007073
X ₂ : temps(s) (L+Q)	9555,1	2	4777,57	0,880222	0,451317
X ₃ : température (°c)	18488,0	2	9243,98	1,703115	0,241987
Erreur totale	43421,5	8	5427,69	-	-
Total (corrigé)	181270,9	14	-	-	-

L : linéaire, Q : quadratique

Cette analyse de la variance ANOVA et à partir du test de Fisher (Facteur F) et la probabilité ($p < 0,05$), nous a permis de connaître les variables dépendantes de celles qui sont indépendantes. L'effet de ces variables est plus significatif, plus le facteur F est élevé et la valeur de p est petite. L'intensité de l'interaction de chaque facteur est vérifié la p-value, qui donne lui une signification

En comparaison avec la somme des carrés et le degré de liberté, chaque effet (linéaire + quadratique), X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 a été testé.

D'après les résultats du tableau 5.15, les effets linéaires et quadratiques de la concentration du solvant influencent significativement ($p < 0,05$) le taux de polyphénols totaux. En revanche, l'effet linéaire et quadratique du temps et de la température d'extraction sont moins significatifs.

La réponse du taux de polyphénols totaux a été modélisée par la méthodologie des surfaces de réponses et a permis de déduire une équation mathématique à partir du logiciel Statistica.

C'est une équation polynomiale du second degré représentant l'effet des variables (facteurs) sur la réponse obtenue expérimentalement.

Le modèle obtenu est le suivant :

- Equation sans exclusion :

$$Y_1 = 409,60 + 195,6 \cdot X_1 - 189,80 X_1^2 + 41,25 X_2 - 40,81 X_2^2 + 16,63 X_3 + 69,69 X_3^2$$

- Equation après exclusion des effets non significatifs :

$$Y_1 = 409,60 + 195,6 \cdot X_1 - 89,80 X_1^2$$

Où X_1 représente la concentration du solvant, X_2 est le temps et X_3 , la température d'extraction.

Dans ce modèle, le coefficient de corrélation permet d'indiquer l'adéquation ou non du modèle prédit. Pour les polyphénols totaux et en relation avec les résultats expérimentaux, ce coefficient est estimé à 0,76 %. Il indique une bonne adéquation du modèle. Plus la valeur du coefficient de corrélation est proche de 1 (100%), plus la qualité du modèle est satisfaisante.

La régression linéaire a évalué graphiquement la qualité du modèle montre l'effet de tous les facteurs sur la réponse polyphénols totaux et est présentée par la figure 5.27 :

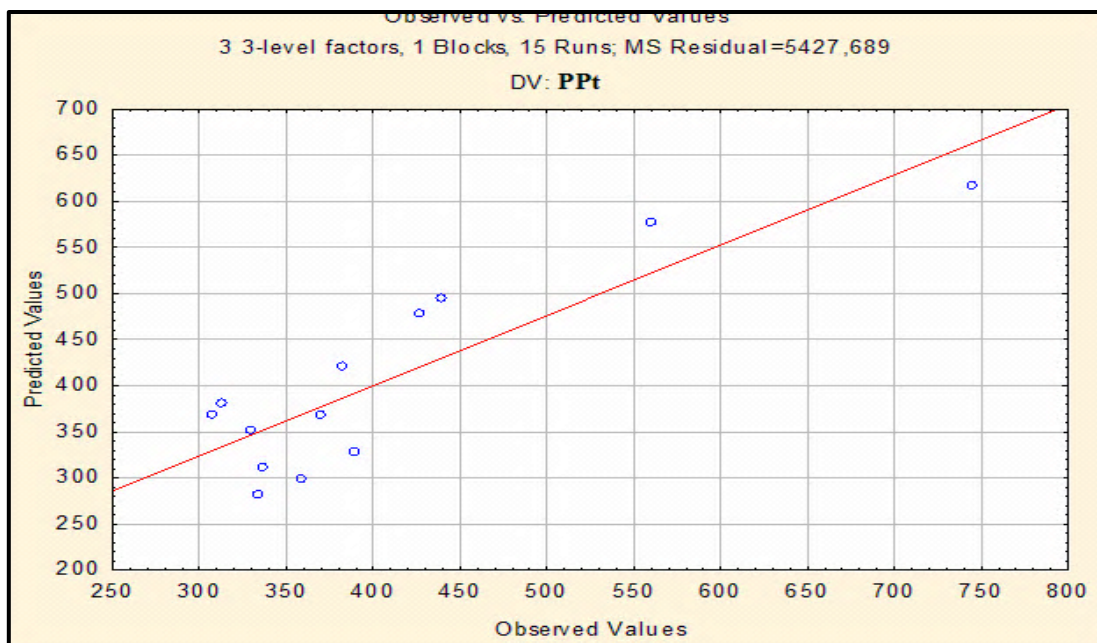


Figure 5.27 : Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues des polyphénols totaux

Comme le montre la figure 5.27., la concentration du solvant influence de façon linéaire la teneur des polyphénols totaux ou on constate une symétrie étroite qui existe entre les résultats expérimentaux et les valeurs théoriques prévues par le modèle polynomial. Selon les points considérés par le modèle quadratique et qui sont répartis au hasard sans aucune structure particulière, le modèle utilisé est validé.

Le diagramme de Pareto de la figure 5.28 montre l’influence des effets significatifs de toutes les variables quadratiques et linéaires par ordre d’importance sur la réponse étudiée.

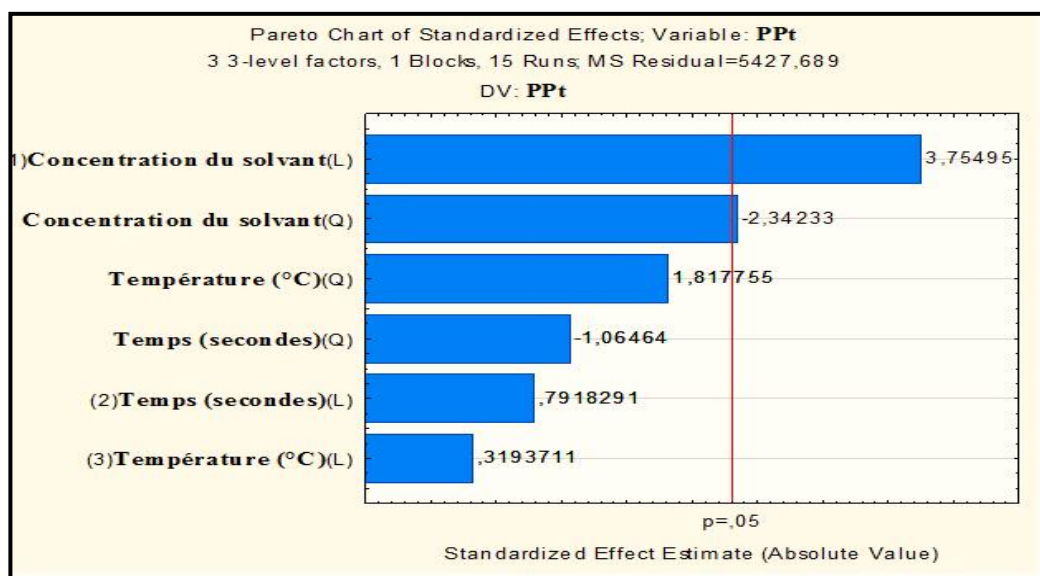


Figure 5.28 : Diagramme de Pareto

Ce diagramme et selon la longueur de la barre bleue indique que l'effet linéaire de la variable ou facteur concentration influe d'une façon excessive le taux de polyphénols. L'effet quadratique de la variable concentration présente une influence mais moins importante que pour le linéaire. Les autres variables, le temps et les températures influencent d'une façon non significative ($p > 0,05$).

5.5.3. Analyses des surfaces de réponses des polyphénols totaux

La figure 5.29. représente la surface de réponse des effets combinés des trois facteurs sur le comportement de la réponse polyphénols totaux.

Dans chaque figure (a, b et c), une variable est fixée. Le paramètre de la concentration de solvant est le plus influant sur le taux des polyphénols totaux, ces derniers augmentent linéairement avec l'augmentation de la concentration de l'éthanol dans le mélange. Pour le temps et la température, leurs influences existent mais elle est loin d'être significative.

Le taux de polyphénols totaux en fonction de la concentration du solvant et du temps est représenté par la figure 5.29.a.

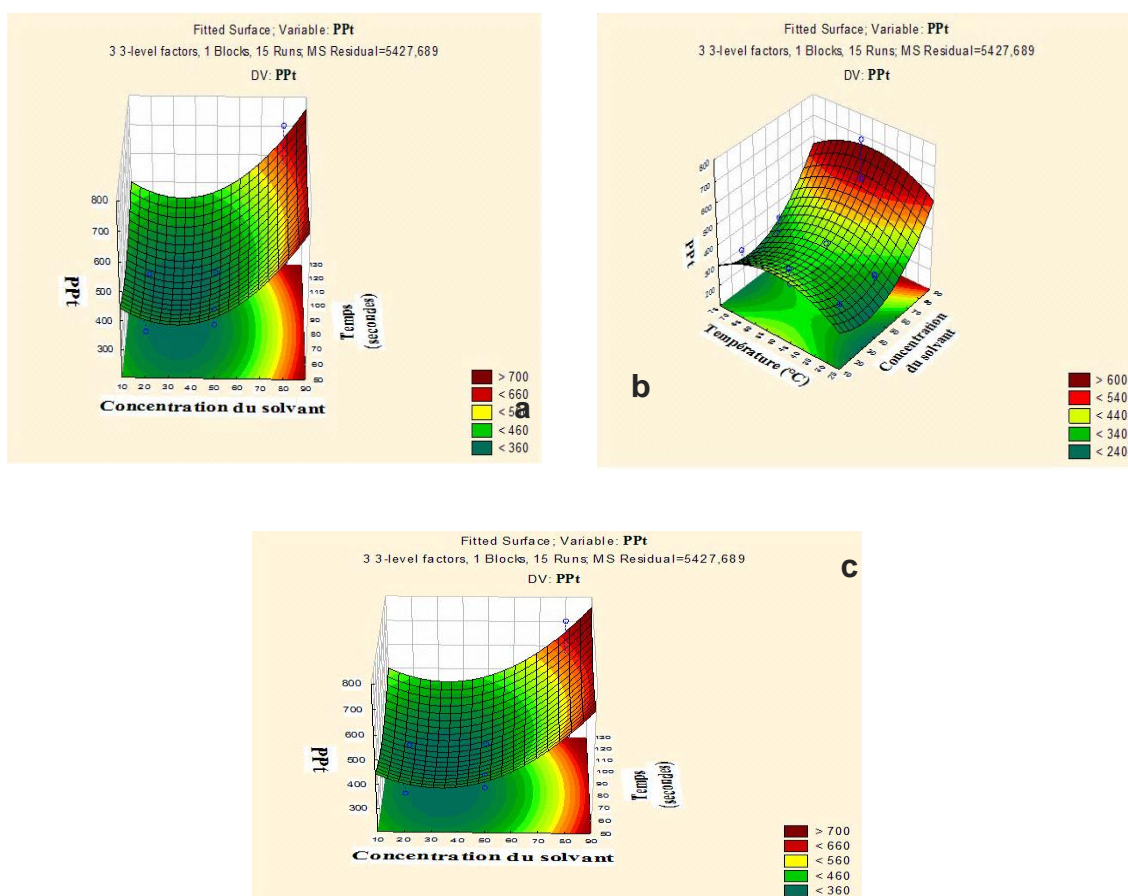


Figure 5.29 : Tracés de surface de réponse du contenu en polyphénols totaux

Les valeurs optimales de ce paramètre pour obtenir un taux maximum de polyphénols totaux sont 90 % pour la concentration de l'éthanol, un temps de 130mn et une température de 50°C.

La concentration d'éthanol a une influence prononcée sur les réponses linéaires et quadratiques. Selon les travaux de TABARAKI et al [254], la polarité du mélange éthanol-eau augmenterait continuellement avec l'addition d'eau à l'éthanol.

D'autre part il a été rapporté que la polarité du solvant utilisé dans l'extraction affecte directement non seulement la quantité de composés phénoliques totaux, mais aussi la composition des composés phénoliques [255].

Li et al [219] ont rapporté que les extraits d'écorce de grenade ont une valeur élevée en composés phénoliques, flavonoïdes et pro-anthocyanidines, qui peut créer une forte capacité antioxydante.

Cette étude montre que le modèle polynomial choisi, a pu modaliser correctement le phénomène étudié. Les conditions expérimentales optimales réalisées au sein du domaine expérimental ont permis d'arriver à une optimisation d'extraction des polyphénols totaux par le logiciel Statistica et qui sont comme suit :

Les conditions optimales pour obtenir un taux maximal de polyphénols totaux à partir de l'extrait de l'écorce de grenade, ont été obtenues avec une concentration de 50 % d'éthanol, une température de 50°C et une durée d'extraction de 120min.

5.5.4. Résultats de l'analyse du plan d'expériences pour l'activité antioxydante

Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour évaluer la signification statistique du modèle. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.16.

Tableau 5.16 : Analyse de la variance pour l'activité antioxydante

Facteurs	Polyphénols totaux				
	Somme des	Degré de liberté	Carré des moyens	Rapport F	p
X ₁ : Concentration du solvant (L+Q)	7,7734	2	3,8867	0,91120	0,440037
X ₂ : temps(s)(L+Q)	422,302	2	211,1514	49,50232	0,000031
X ₃ : température (°c) (L+Q)	36,5007	2	18,2503	4,27861	0,054502
Erreur totale	34,1239	8	4,2655	-	-
Total (corrigé)	500,804	14	-	-	-

L :linéaire, Q : quadratique

Les résultats de l'analyse de la variance, montre une valeur de P estimée à 0,00003(<0,05) pour le facteur temps. Cette valeur montre que ce facteur a eu influence sur la réponse de l'activité antioxydante. Le modèle utilisé est significatif.

Les valeurs des coefficients pour l'activité antioxydante ont été utilisées pour arriver au modèle prédictif final avec et en négligeant le non significatif sous la forme de l'équation suivante :

- Equation sans exclusion :

$$Y_1=84,82-11,99* X_1-0,17*X_1^2+7,21*X_2-9,11*X_2^2+4*X_3 0,530*X_3^2+ 4.06*X_3$$

- Equation après exclusion des effets non significatifs :

$$Y_1= 84.8 + 7.21*X_1 -9,11*X_2^2+4.06*X_2$$

Où X1 représente la concentration du solvant, X2 est le temps d'extraction.

En plus de cette équation modèle, l'analyse ANOVA indique une bonne performance du modèle avec les valeurs de coefficient de corrélation (R2) de 0,92 de l'activité antioxydante.

L'analyse statistique a donné un niveau significatif élevé, attestant de la qualité de l'ajustement du modèle en cas d'activité antioxydante ($p = 0,000031$). Les résultats ont indiqué que le modèle pourrait bien fonctionner pour la prédiction de ce paramètre étudié pour l'extraction de l'écorce de grenade.

Les trois paramètres étudiés, à savoir la concentration en solvant, la durée et la température, n'ont eu le effet soit linéaire ou quadratique l'activité antioxydante. L'effet quadratique du paramètre temps a influencé positivement sur l'activité antioxydante. Cependant, les termes d'interaction entre la concentration solvant-temps et la concentration solvant-température n'ont eu aucun effet.

L'influence de Chaque facteur sur la réponse étudiée et représentée par la figure 5.30

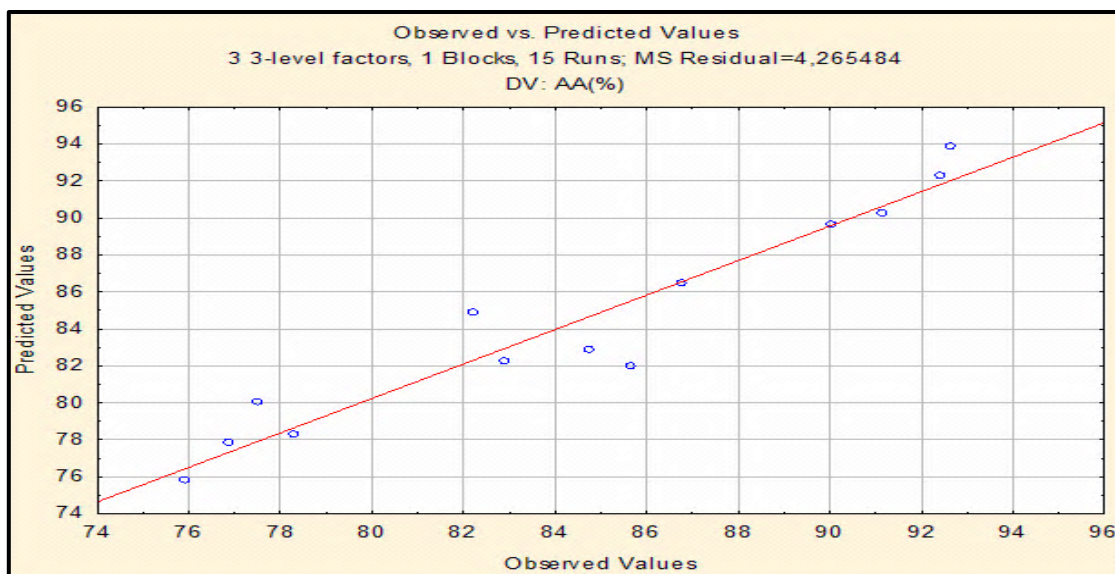


Figure 5.30 : Diagramme des résidus en fonction des valeurs prévues

Comme il a été déjà décrit pour les polyphénols totaux, on observe que le temps d'extraction influe d'une façon linéaire l'activité antioxydante, la majorité des points sont regroupés sur l'allure de la droite et très proche. Ils représentent la position des valeurs prédites Prédire les valeurs par rapport aux valeurs expérimentales dans l'extrait de l'écorce de grenade obtenu par la méthode de référence.

Le résultat obtenu par le diagramme de Pareto, illustré par la figure 5.31 montre que l'effet des facteurs sur l'activité antioxydante. Le temps est significatif ainsi que la température, ce qui signifie que leur augmentation favorise l'extraction mais à un seuil bien défini.

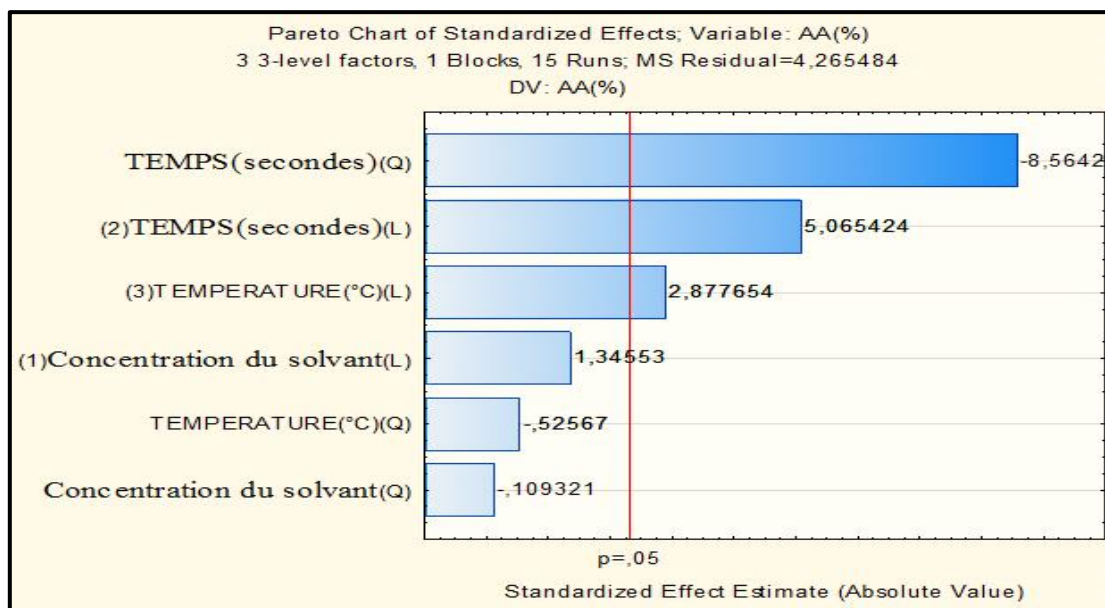


Figure 5.31 : Diagramme de Pareto

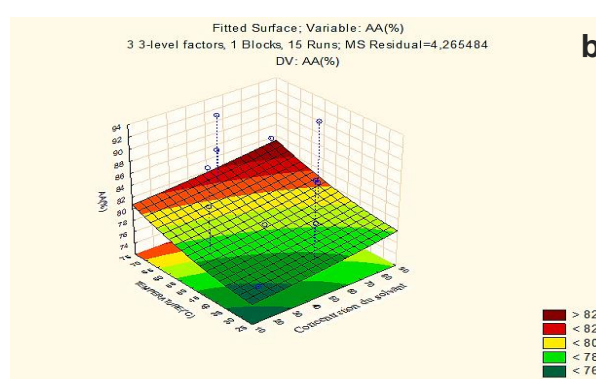
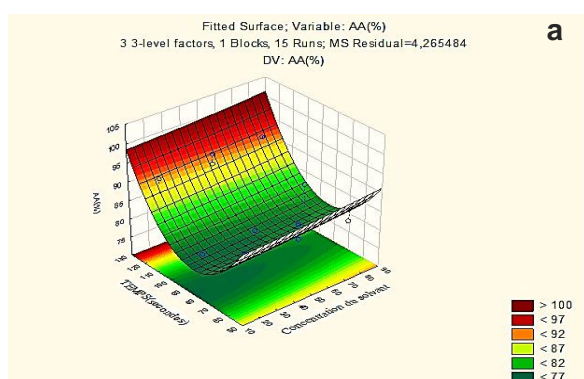
D'autre part, l'effet linéaire et quadratique du temps était positif, ce qui signifie que son augmentation ne favorise l'augmentation de l'inhibition du DPPH que jusqu'à une certaine valeur. L'effet linéaire de la température à un effet positif aussi sur l'extraction.

Le diagramme de Pareto, montre que l'effet quadratique du temps d'extraction est le paramètre le plus influent sur l'activité antioxydante, alors que l'effet linéaire est à moindre influence. L'effet linéaire de la température à une influence jusqu'à un optimum, celui du quadratique a un effet négatif sur l'activité antioxydante. L'effet quadratique de la concentration a une influence sur l'activité antioxydante, mais négative.

5.5.5. Analyse des Surface de réponse pour l'activité antioxydante

Pour exprimer l'effet de ces variables variable indépendante sur l'activité antioxydante des diagrammes de réponse en surface du modèle ont déterminés, qui consistaient à faire varier deux variables dans la plage expérimentale examinée et à maintenir l'autre variable à son niveau central(Niveau 0).

La figure 5.32 a est un graphique tridimensionnel montrant les effets de la concentration de solvant (x_1) et du temps (x_2) sur l'activité antioxydante. On peut observer que l'écorce de grenade. Le temps exerce effet important alors que la concentration n'a aucun effet. Par conséquent, la durée a joué un rôle important dans l'extraction des antioxydants qui a pu faire augmenter le pourcentage d'inhibition DPPH.



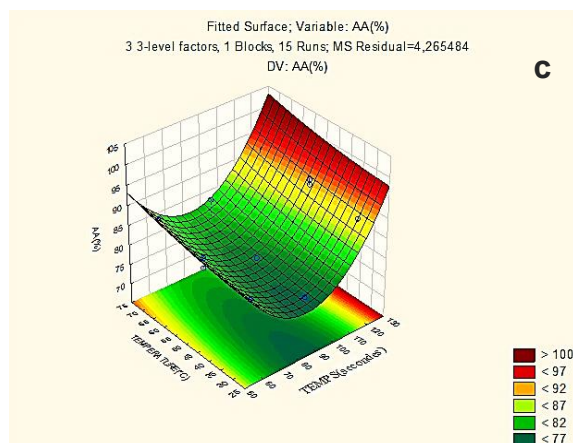


Figure 5.32 : Tracés de surface de réponse de l'activité antioxydante

Selon la figure 5.32.b, il a été observé que la concentration et temps influent simultanément sur l'extraction sur la capacité antioxydante. Ces dernières ont augmenté jusqu'à ce que le temps et la température atteignent un optimum. Le transfert de masse du matériel végétal au solvant était lié au temps et à la température.

Le temps d'extraction est un facteur important qui influence l'extraction de l'activité antioxydante. Le transfert de masse augmente avec le temps jusqu'au maximum de l'extraction. Cependant, à long terme, cette durée affecte négativement l'extraction des antioxydants, qui est probablement due à la décomposition des composés actifs pendant la durée d'extraction prolongée.

Par ailleurs, des composants indésirables, tels que des protéines et des polysaccharides, peuvent être dissous [255]. Une longue période d'extraction peut influencer négativement par la dégradation thermique d'antioxydants. Les extraits d'écorces de grenades contiennent des composés thermosensibles.

Les résultats des conditions optimales pour obtenir l'activité antioxydante maximale à partir de l'extrait de l'écorce de grenade, ont été obtenus avec une concentration de 50 % d'éthanol, une température de 70°C et une durée d'extraction de 120min.

Dans des conditions optimales, la valeur expérimentale était de 92,59 % pour l'activité antioxydante. Ces résultats expérimentaux étaient en accord avec la valeur prédite pour l'activité antioxydante (93,86%).

5.6 Activité biologique des extraits des résidus d'extraction du jus de grenade

5.6.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques de l'extrait de la bagasse de grenade par le mélange éthanol-eau nous a permis de déterminer le rendement en extrait sec et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins.

5.6.2. Rendement d'extraction

Les résultats du tableau 5.17 montrent un rendement de 28 % pour les résidus d'extraction de grenades. Ce rendement peut être dû à la méthode, au solvant d'extraction et à la partie du fruit.

Des études antérieures sur la bagasse de grenade ont rapporté que les rendements en extrait méthanolique sont plus élevées que ceux d'autres solvants (eau, éthanol, chloroforme...etc) [78]. L'utilisation de mélange éthanol-eau revient à sa moindre toxicité pour une meilleure utilisation en alimentaire ou médecine thérapeutique.

5.6.3 Teneurs en composés phénoliques

La détermination des teneurs en composés phénoliques dans les sous-produits de bagasse grenade peut être un procédé utile dans la connaissance de leur capacité antioxydante. Cette capacité permet de les considérer comme un paramètre de criblage préliminaire pour la confection de tout produit qui servira comme additif riche en antioxydants dans les aliments fonctionnels ou pour leur utilité thérapeutique.

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait de bagasse grenade a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

La figure 5.33 présente la composition polyphénolique de résidus d'extraction de grenade :

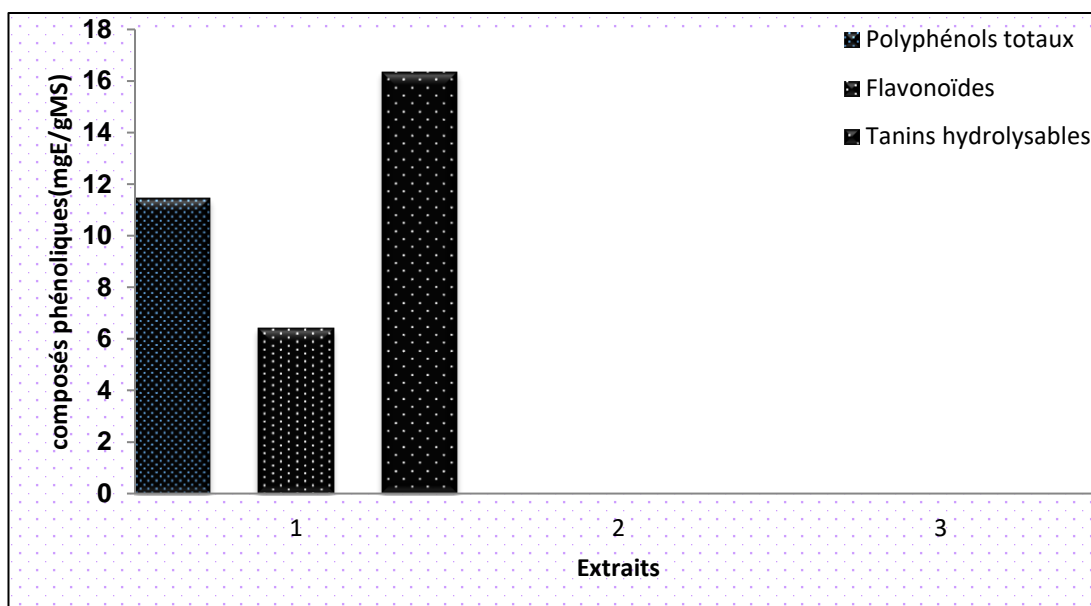


Figure 5.33 : Teneur en composés phénolique de l'extrait de résidus de grenade

Les flavonoïdes sont exprimés en mg EQr/g MS et les tanins en mg EAT/g MS. Les tanins hydrolysable sont aussi présents dans l'extrait de bagasse de grenade à une teneur de $11,47 \pm 4,83$ mg EAG/ g MS plus élevée que celle de polyphénols totaux ($11,44 \pm 4,83$ mg EAG/ g MS) et de flavonoïdes ($6,4 \pm 0,53$ mg EAG/ g MS).

Les polyphénols totaux présentent des teneurs supérieures à ceux trouvés par VIUDA-MARTOS et al/[11] et ceux de MANUKUMAR et THIRIBHUVAN [256] avec une teneur de $6,73 \pm 0,07$ et de $10,05$ mg EAG/ g MS respectivement.

La teneur en polyphénols totaux d'un extrait dépend de la méthode d'extraction, de la nature du solvant ainsi que du matériel végétal utilisé [105].KANAR

Les flavonoïdes ont enregistré une teneur de $6,40 \pm 0,53$ mg E Qr /g MS en moyenne.

Les flavonoïdes sont considérés comme de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation des atomes d'hydrogène présents dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques [89]. Ce sont pareillement considérés comme les composés les plus actifs parmi les antioxydants végétaux alimentaires. Ils ont en outre une action thérapeutique sur certaines pathologies telles que le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer [257].

La teneur en flavonoïde du résidu testé est inférieure à celle obtenue par GHARA et GHADI [258]. Cette teneur dépend du cultivar, de la maturité et des conditions de stockage [259] ainsi que la méthode utilisée pour l'extraction du jus.

Les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés d'inhibition des radicaux libres de l'oxydation lipidique in vitro.

Les tanins hydrolysables ont enregistré aussi une teneur de $16,35 \pm 0,08$ mg E AT/g MS. Peu de travaux ont été publiés sur la teneur en tanins hydrolysables des bagasses de grenade.

VIUDA-MARTOS et al [11] ont enregistré une teneur en tannins hydrolysables plus faible que la nôtre qui s'estime à $8,18 \pm 0,14$ mg EAT/g MS.

Les tanins sont connus par leur inhibition de la peroxydation lipidique et la lipoxygénase in vitro.

Selon des études antérieures, ces composés ont la capacité à piéger des radicaux tels que l'hydroxyle, le superoxyde et le peroxyde qui sont connus pour être important dans l'état prooxidants des cellules. Les teneurs en tanins dépendent en grande partie de leur structure, du degré de polymérisation, qui influe sur l'augmentation de la capacité anti radicalaire [260].

5.6.4. Activités biologiques in vitro : Piégeage du radical libre DPPH

Diverses techniques sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydante in vitro des extraits de grenade. L'activité anti-radicalaire par le piégeage du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) a été réalisée.

Le radical libre DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. Il est stable à température ordinaire et présente une couleur bien caractéristique (violette foncé). Les pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de la bagasse de grenade, du BHT et de l'acide ascorbique sont présentés par la figure 5.34 :

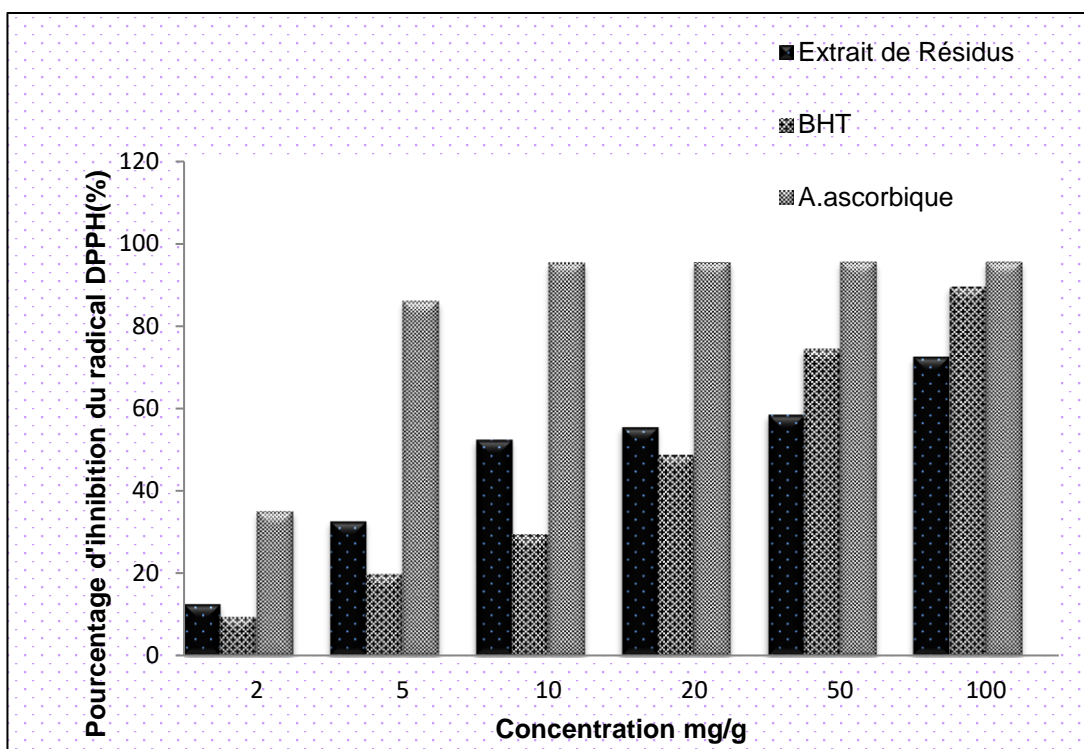


Figure 5.34 : pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH des résidus d'extraction de grenade, du BHT et de l'acide ascorbique

L'extrait de résidus de grenade montre une augmentation significative du pouvoir du piégeage du radical DPPH ($P > 0,05$) jusqu'à la concentration 50 mg/l (88,16%)

Les pourcentages d'inhibition du radical libre présenté par la figure 5.6.3. montre une augmentation proportionnellement à la concentration de l'extrait jusqu'à une concentration de 10mg/ml où cette inhibition se stabilise à un pourcentage de 52,4%.

L'acide ascorbique montre un pouvoir de piégeage le plus élevé par rapport au BHT, qui même à faible concentration (10mg/ml), il inhibe la moitié du radical stable DPPH.

L'extrait des bagasse de grenade a montré une bonne inhibition du radical DPPH avec $52,4 \pm 0,20\%$ même à faible concentration (10mg/mL) et qui reste constante avec les autres jusqu'à 100 mg/mL. La teneur en composés phénoliques peut expliquer cette forte activité antioxydante. Il est plus faible que l'antioxydant Standard le BHT ($74,39 \pm 0,10$).

L'antioxydant synthétique, le BHT est un Additif alimentaire utilisé pour prévenir la détérioration au cours de la conservation des aliments. Son utilisation est de plus en plus restreinte ces dernières années en raison de ses risques potentiels

pour la santé humaine. De plus, il existe une prise de conscience de la part des consommateurs concernant une certaine sécurité pour les additifs alimentaires.

Le fort pourcentage d'inhibition du radical DPPH obtenu peut être expliqué par la teneur élevée en composés phénoliques de l'extrait.

GIL et al [13] ont attribué cette inhibition radicalaire à la présence des polyphénols, comme les tanins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique. Le pouvoir antioxydant est déterminé lorsqu'une concentration de l'extrait permet de neutraliser 50% du radical DPPH.

La figure 5.35 donne la Concentration Inhibitrice IC_{50} du radical DPPH de l'extrait testé, du BHT et de l'acide ascorbique.

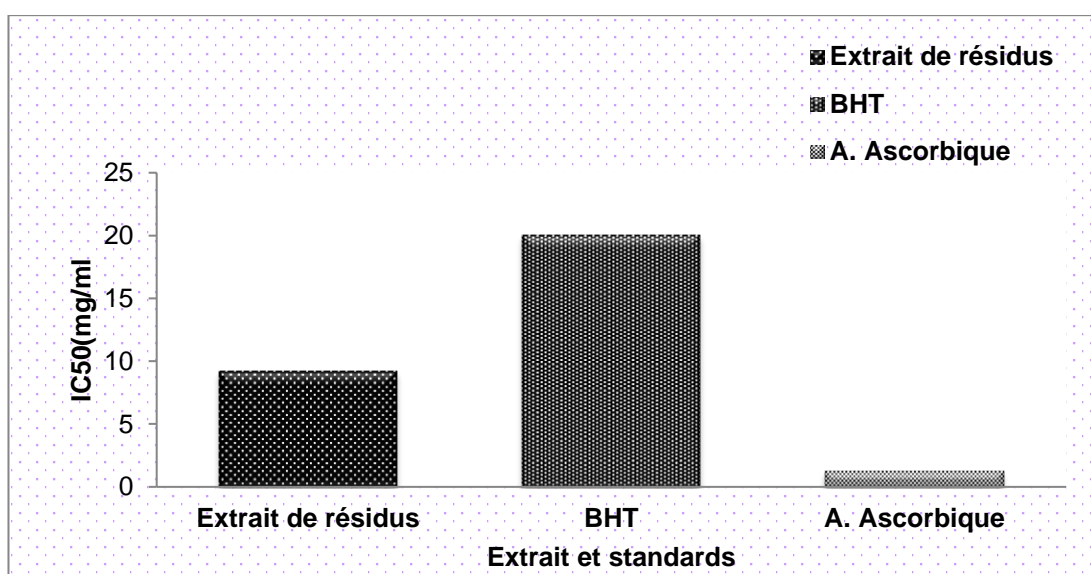


Figure 5.35: Concentration inhibitrice IC_{50} du radical DPPH de l'extrait testé et des standards

De ce fait, une courbe ayant une allure exponentielle a été tracée à partir des valeurs exprimant les pourcentages d'inhibition du DPPH. La phase stationnaire désigne la réduction presque totale du DPPH-en sa forme non radicalaire.

Ces courbes nous ont permis de calculer la valeur dite IC_{50} (Concentration d'inhibition) qui est déterminée graphiquement et qui est représenté en fonction de la concentration de l'extrait testé.

Les courbes révélant l'effet antioxydant de l'extrait du BHT et de l'acide ascorbique sont représentées **Appendice F, figure F3**.

Exprimant le pourcentage d'inhibition de l'extrait de bagasse et du BHT, ces courbes prennent la même allure qui s'accroît à partir de 50mg/g jusqu'à 100 mg/ml.

Une augmentation modérée de l'activité de balayage radicalaire a été observée lorsque la concentration de l'extrait testé a été augmentée. Le BHT a montré une activité radicalaire plus élevée à toutes les concentrations.

Ainsi, l'extrait de grenade inhibe le radical DPPH à un pouvoir plus élevé que l'antioxydant synthétique BHT, ceci est confirmé par leurs IC_{50} ($9,20 \pm 0,12$ et $20 \pm 0,14$) respectivement. Plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante est élevée.

Le standard d'acide ascorbique a révélé une IC_{50} plus faible ($1,20 \text{ mg/g}$) que ceux enregistrée par l'extrait et le BHT. Il est caractérisé par un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus élevé. Sa courbe prend une allure différente de l'extrait testé et du standard BHT qui s'accroît juste pour la concentration 2 et 5 puis prend une allure constante jusqu'à 100 mg/ml .

ORAK et al [240] ont étudié l'activité antioxydante dans trois parties de la grenade l'écorce, le jus et les pépins et ont rapportés que la valeur d' IC_{50} des écorces est 23,4 fois plus élevée que celle des autres parties. Le pouvoir réducteur des écorces est plus élevé 4,7 fois supérieur que celui des pépins.

Les sous-produits de la grenade (écorces et graines) ont une quantité substantielle de composés phénoliques et une importante activité de balayage des radicaux libres [14].

Notre extrait testé présente une IC_{50} plus faible que celle du standard BHT, qui s'explique par une forte inhibition des radicaux libres.

Par conséquent, et d'après ce résultat, l'extrait de de grenade testé peut avoir un grand intérêt dans la prévention de maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués et servir de source économique d'antioxydants naturels.

Ayant la capacité à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes, il peut aussi être un agent thérapeutique utile pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux.

En Alimentaire, cet extrait peut servir dans la conservation des produits alimentaires où les réactions en chaîne de radicaux libres ont comme conséquence l'oxydation des lipides et la détérioration ultérieures des produits alimentaires.

Les antioxydants peuvent agir dans le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques [14].

5.6.5. Activité biologique in vivo : Effet anti- inflammatoire

Les maladies auto-immunes, les infections microbiennes, l'obésité et autres sont des sources d'inflammation qui sont devenu très répandues ces dernières années [248].

Qu'elle soit aigue ou chronique, leurs éliminations peuvent représenter une stratégie pour la prévention et le traitement du cancer. Les AINS utilisés pour le traitement de ces inflammations mais en conséquence d'une irritation gastro-intestinale, sont donc bons pour les remplacer avec des extraits à effets anti-inflammatoires sans effets secondaires.

Des travaux antérieurs ont rapporté que la grenade et ses différents extraits écorce et arilles sont des composés essentiels dans la production de composés phénoliques avec une forte activité antioxydante et anti-inflammatoire et une inhibition des marqueurs inflammatoires [77]. Ces extraits présentent une activité anti-tumorale et anti-inflammatoire.

De plus, tous les flavonoïdes contenus dans la grenade présentent une activité antioxydante avec inhibition indirecte de marqueurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α).

Par ailleurs, dans l'objectif de la réintégration de l'un de ces sous-produits de la grenade dans le domaine thérapeutique/ pharmaceutique et pour un double impact environnementale et santé, nous avons cherché à étudier l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de poudre de résidus de grenade sur l'œdème inflammatoire de la patte droite postérieur des souris induit par la carragénine selon la méthode de WINTER et al [262].

Cette inflammation de la carragénine est biphasique. En effet, dans une première phase, il est connu que chez l'animal vivant, la carragénine dans une première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation.

Dans une seconde phase, cette molécule de référence induit la synthèse de prostaglandines principalement, de protéases et de lysosomes. Cette dernière étape est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines et aux anti-inflammatoires naturels ou de synthèses telles que les glucocorticoïdes [91].

5.6.5.1. Evolution de la circonférence de la patte de l'œdème (patte arrière) induit par la carragénine

La figure 5.36 représente les effets de l'extrait éthanolique de pépins de *Punica granatum* L. sur l'évolution en fonction du temps, de la circonférence de l'œdème induit par la carragénine sur la patte du rat (n = 5).

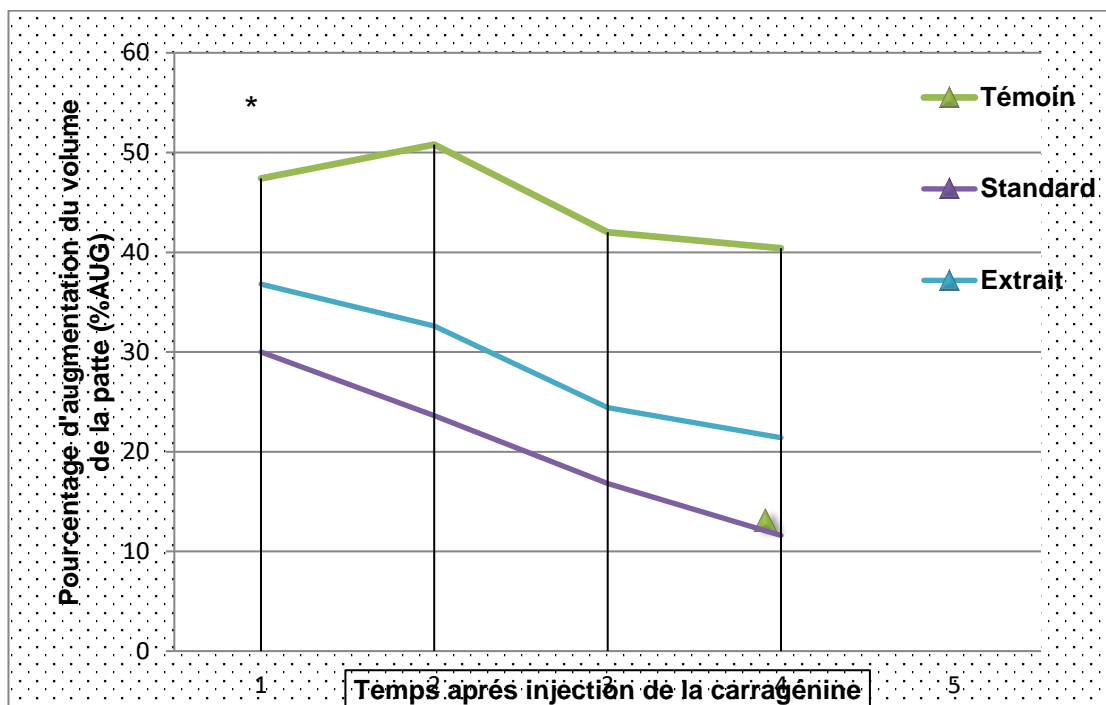


Figure 5.36 : Evolution du de la circonférence des pattes (%AUG) chez les trois lots souris pendant 4h

- Lot témoin

Après administration de la carragénine et selon les résultats de la figure 5.36, une augmentation hautement significative ($p < 0,05$) a été enregistré de la circonférence des pattes des souris témoins à partir de la première heure de l'expérimentation. Elle est passée de $47,40 \pm 1,52$ mm à $40,40 \pm 0,55$ mm à la quatrième heure.

De plus, une augmentation significative du volume de la patte est observée à la deuxième heure avec $50,80 \pm 1,79$ mm, par rapport à celles enregistrées pour toutes les heures de l'expérimentation $42 \pm 1,23$ mm à la troisième heure et $40,4 \pm 0,55$ mm à la quatrième heure.

A partir de la troisième heure, l'évolution du pourcentage du volume des pattes des rats témoins commence à se réduire progressivement.

Après quatre heures d'expérimentation, cette augmentation du volume des pattes des souris témoins est diminuée comparée à celle de la première, deuxième et 3ème heure. La figure montre l'évolution du de la circonférence de la patte (mm) des souris du groupe témoin pendant 4h.

En effet, une libération de plusieurs médiateurs chimiques est réalisée après l'injection de la carragénine. Ces facteurs sont responsables du processus inflammatoire. Comme il a été annoncé, cette réponse inflammatoire est biphasique, dont la phase initiale dure environ une heure, est provoqué par la libération de l'histamine et de la sérotonine. Au cours de la deuxième phase, c'est la bradykinine qui est libérée après 1,5 - 3 heures, et enfin une biosynthèse des prostaglandines intervient après une durée qui dépasse la troisième heure. La cause de l'œdème qui provoque l'inflammation sont ces médiateurs responsable de l'augmentation de la perméabilité des capillaires de la région et alors il y'aurait en conséquence, l'exsudat qui s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur [262].

- Lot standard :

L'administration de l'anti-inflammatoire " Diclofénac" à une dose de 100mg/Kg chez les souris de ce lot, provoque une réduction hautement significative ($p < 0,05$) de la circonférence de l'œdème de la patte arrière droite des souris au groupe témoin en passant d'une augmentation de $47,4 \pm 1,52$ mm.

En effet, cette réduction significative est observée à partir de la deuxième heure et continue jusqu'à la fin de l'expérimentation. A la fin de l'expérimentation (quatrième heure), la variation du volume des pattes des souris standards est 3 fois moins important que celui de la 1^{ère} heure. La figure 2 montre l'évolution de la circonférence de patte des souris du groupe standard pendant 4h (Appendice L, tableau 1).

- Lot testé

Le traitement des souris par l'extrait testé de grenade à une dose de 100ml/Kg induit une diminution très significative ($p < 0,05$) de l'inflammation par rapport aux souris des deux lots témoin et standard.

La figure 5.36 montre l'augmentation de la circonférence de la patte des souris du groupe traité par l'extrait testé pendant 4h. L'œdème de la patte postérieure droite est de $36,80 \pm 1,30$ mm, $32,6 \pm 1,14$ mm, $24,4 \pm 1,14$ mm, $21,40 \pm 1,67$ mm durant les quatre heures de l'expérience respectivement.

Ces résultats indiquent que l'extrait ethanologique de bagasse de grenade à un effet antinflammatoire qui pourrait être due à la richesse de cet extrait en composés bioactifs, principalement les polyphénols et les flavonoïdes.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'OUACHRIF et al [263] obtenus avec un extrait de pépins de grenade. Ils suggèrent que cet extrait possède une activité anti-inflammatoire hautement significative en comparaison avec le diclofenac.

Par ailleurs, ils ont montré que les polyphénols de la grenade source justificative de son usage phytothérapeutique. La richesse en flavonoïdes et tannins de la grenade est capable d'inhiber l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations par la formation des prostaglandines.

Dans une autre étude, AVIRAM et al [9] ont prouvé la présence du Potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et antibactérien chez la grenade.

Selon les travaux de NAINWANI et al [255], la présence de tanins dans le fruit de *punica granatum* est en partie responsable de cet effet anti-inflammatoire.

Les flavonoides sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par l'inhibition de l'activité des enzymes, ils peuvent être responsables des inflammations. Ils ont souligné aussi que cet extrait de la graine de *Punica granatum* est très efficace pour inhiber la production de carragénine (formation d'œdèmes chez les rats).

5.6.6. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH) est présenté par la figure 5.37

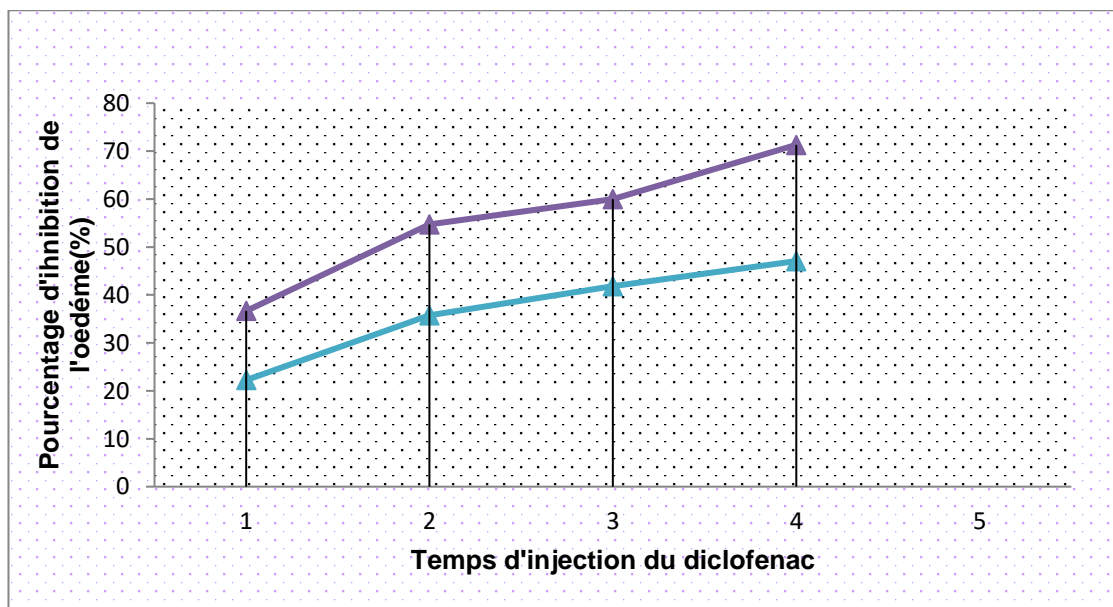


Figure 5.37: Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH) chez le groupe standard et le groupe traité.

- Lot standard :

L'administration du Diclofénac à une dose de 100 mg/kg présente une inhibition significative de l'œdème de la patte de souris de la première heure à la quatrième heure ($p < 0,51$) pour le groupe standard. Cette inhibition a atteint son maximum ($71,30 \pm 2,56$ %) à la quatrième heure de l'expérimentation.

- Lot testé

L'administration de l'extrait testé à la dose de 100 mg/kg présente une activité inhibitrice significative ($p < 0,05$) de l'œdème de la patte des souris qui augmente progressivement jusqu'à la quatrième heure. A ce stade, sa valeur est 2 fois plus élevée que celle notée à la première heure. De plus, à la deuxième heure et à la quatrième, cette activité est 1,31 et 1,12 fois plus importante que celle observée à la quatrième heure, respectivement. Le traitement local des souris par l'extrait alcoolique des fruits (100mg/kg) conduit à une réduction significative de la taille de l'œdème par rapport à celle obtenue par le diclofénac.

D'après les résultats de la figure 5.37, l'extrait testé de grenade a inhibé l'œdème de manière dose-dépendante et à toutes les heures. Ainsi, cet extrait pourrait avoir une action antagoniste à l'histamine, à la bradykinine, à la sérotonine et à la biosynthèse des prostaglandines [29].

Par ailleurs, cette confirmation est corroborée par les résultats de LEE et al [122] qui ont démontré que les extraits standardisés de grenade possédaient des effets dépendant de la dose des anti-inflammatoires, des analgésiques et des cartilages sur l'œdème de la patte du rat.

La forte inhibition de l'œdème a été observée à la quatrième heure pour l'extrait. Cela suggère que l'action inhibitrice de l'extrait s'exercerait davantage sur les cyclo-oxygénases qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines [262].

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet anti-inflammatoire observé par cet extrait. La présence de tanins dans les résidus de fruit de grenades est en partie responsable de cet effet.

Cette capacité des tanins d'inhiber la phospholipase A2 est déjà établie, ce qui va participer à l'inhibition de prostaglandines et des leucotriènes [29].

Cela pourrait être suggéré par les travaux de RIAHI et al [260] qui expliquent que les effets anti-inflammatoires et analgésiques de l'extrait de grenade pourraient

être attribués à sa teneur élevée en flavonoïdes qui ont la capacité d'inhiber la perception de la douleur. Ces composés peuvent aussi exercer des propriétés anti-inflammatoires en raison de leurs effets inhibiteurs sur les enzymes participant à la production du médiateur chimique de l'inflammation.

Dans ce même contexte, les travaux de Garcia *et al* [59] ont rapporté que les restes des pépins présents dans les résidus d'extraction de jus « bagasses » ont un effet anti-inflammatoire qui est dû à leur richesse en phytostérols (stérols naturels) présentant une action cicatrisante et réparatrice et réduisent également les inflammations.

Autre raison importante pour leur aptitude comme ingrédient alimentaire est leur origine naturelle, ce que le consommateur trouve réconfortant et bénéfique pour son environnement.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les fruits sont essentiels dans notre alimentation, ils participent à la couverture de nos besoins nutritionnels en vitamine C, fibres, éléments minéraux et antioxydants. De même, leurs dérivés suscitent un grand rôle protecteur contre de grandes pathologies chroniques : maladies cardiovasculaires, cancers et diabètes.

Par leurs richesses, ils sont devenus une préoccupation majeure de santé publique et on leur attribue un potentiel incontestable dans les stratégies de prévention de ces maladies.

Le thème du développement durable, qui repose sur un équilibre entre les volets économique, environnemental et social, met en exergue la nécessité de la protection de nos ressources végétales autochtones.

Notre travail est justement une investigation à la valorisation du fruit du grenadier. Cette culture a un fort potentiel dans le monde. Son fruit ainsi que ses graines, écorces et fleurs sont connus depuis des milliards d'années.

Plusieurs cultivars sont cultivés au niveau de la région de la Mitidja, la majorité de la production est consommée à l'état frais par absence totale d'une transformation industrielle.

La quantité très élevée de sous-produits générés par consommation est estimée à 50%, qui est une source incontournable de biomolécules à haute valeur ajoutée.

Notre choix s'est porté sur deux cultivars de grenade « Doux de Koléa » et « Doux de Messaad » et une variété clone Bordj Mira n°11.

Suite à notre étude bibliographique, il ressort plusieurs points qui nécessitent des études plus approfondies sur la grenade cultivée en Algérie:

- Une enquête ethnopharmacologique pour recueillir des informations concernant les usages thérapeutiques.
- Une caractérisation morphologique et physicochimique de ces cultivars et leurs dérivés n'a jamais été faite.
- Les producteurs et les consommateurs ont généralement une préférence pour ce fruit, l'étude des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des composés

phénoliques de son jus et des extraits de ses sous-produits fournit des informations utiles pour l'aptitude à la transformation et à la vente en frais.

-La comparaison des différents traitements d'extraction pour l'amélioration du rendement en composés phénolique à partir des écorces de grenade n'a pas été réalisée.

C'est à partir de l'ensemble de ces petites inquiétudes que notre travail a tenté d'apporter des solutions.

L'enquête ethnopharmacologique réalisée auprès des consommateurs et des herboristes de la région de la Mitidja nous a dévoilé une large répartition de la médecine traditionnelle chez la population locale qui, avec l'aide des herboristes, a pris confiance pour l'utilisation des écorces de grenades.

Cette enquête a permis de déterminer que 70% des consommateurs interrogés utilisent une dose moyenne de l'écorce de grenade (9gr/verre d'eau) et un nombre de prise moyen (2 prise /jour) et que les 22 herboristes qui constituent 84% de notre échantillon vendent l'écorce de grenade à un prix moyen de 613Da /kg et prescrivent une dose moyenne d'utilisation (environ 16 gr/verre d'eau).

D'une façon générale, l'usage de l'infusion avec des doses non précises a été révélé comme fréquence d'utilisation. La diarrhée et les affections digestives sont les indications thérapeutiques majeures.

En effet, à partir de ces données, il est important de sauvegarder ces connaissances phytothérapeutiques et d'essayer de les considérer comme une source d'information pour la recherche scientifique dans le domaine de la phytochimie et la pharmacologie en vue de rechercher des nouveaux principes actifs à base de ces écorces.

Après avoir récolté le matériel végétal, deux cultivars « Doux de Koléa » et « Doux de Messaad » et la variété clone « Bordj Mira n°11 » de collection de la station Expérimentale de l'ITAFV, nous nous sommes intéressés à la caractérisation morphologique et physicochimique.

L'évaluation de toutes les données morphologiques présentées a montré une variabilité significative ($p < 0,05$) pour l'ensemble des paramètres entre les cultivars étudiés qui sont dus à leurs variabilité génétique. Les fruits les plus gros, les plus lourds, à poids d'arilles et de pépins plus faibles présentent un rendement en jus plus élevé.

Par ailleurs et d'après les résultats, les cultivars « Doux de Messaad » et « bordj Mira » peuvent intéresser l'agriculteur et la transformation industrielle ou elle s'installe.

Aussi, la qualité physicochimique des jus des grenades a un effet sur la qualité gustative du consommateur. «Doux de Messaad, avec des arilles à pépins tendres et semi sucrée, à saveur plus ou moins acide, à rendement élevé en jus sont destinés vers la consommation et la transformation industrielle.

Bordj Mira et Doux de Koléa, à saveur très sucrée, sont destinés à une consommation fraîche.

A la suite des analyses physico- chimiques des jus, les résultats ont révélé que les grenades les moins acides présentent un degré de Brix plus élevé ($p < 0,05$). Bordj Mira 11 est plus douce que celle de Doux de Messaad et Doux de koléa. En revanche, Doux de Messaad, présente une légère acidité qui le classe dans la catégorie des cultivars aigre doux avec un rendement en jus plus élevé.

Le jus de Doux de Messaad présente une forte teneur en vitamine C alors qu'elle est plus faible dans les écorces et les bagasses.

L'écorce du cultivar de Doux de Koléa présente une teneur élevée en humidité alors que la bagasse est plus riche chez Doux de Messaad et Bordj Mira.

La discrimination physico chimique de ces trois cultivars a révélé une variabilité significative entre eux ($p < 0,05$) et que Doux de Koléa est plus riche en sucres. Les bagasses de Doux de Messaad renferment plus de protéines.

L'étude quantitative réalisée par un dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins et des anthocyanines a montré une variabilité interspécifique pour chacun des dérivés, jus, extrait d'écorce et de bagasses.

Le jus du cultivar Bordj Mira 11 a enregistré la teneur la plus élevée avec pour les polyphénols totaux ($956 \pm 0,42$ mg /ml de jus), les flavonoïdes ($90,39 \pm 0,29$ mg/ml de jus), les tanins ($142,34 \pm 0,34$ mg /ml de jus) et les anthocyanines ($95,12 \pm 0,19$ mg /ml de jus).

En ayant une activité antioxydante élevée et qu'elle n'est pas systématiquement dépendant des teneurs élevés en composés phénolique, les jus des trois cultivars de grenades ont enregistré une activité antioxydante élevée avec les deux méthodes de piégeage du radical libre DPPH ($IC_{50} = 8,71 \pm 0,21$ mg

/ml de jus pour Doux de Koléa) et du pouvoir réducteur du fer ferrique (EC50 =25,00±0,41 mg/ml de jus pour Doux de Messaad).

L'identification chromatographique menée sur les jus des trois cultivars de grenade a permis de détecter une cinquantaine de composés phénoliques, mais seulement un acide phénolique (acide gallique) et de cinq flavonoïdes (resorcinol, catechine, berberine, rutine et myrcétine) ont été identifiés. La berbérine n'a été détecté que dans les jus de Doux de Koléa et Doux de Messaad. La myrcétine qui est un flavonoïde, n'a été détecté que dans les jus de Doux de Koléa et Bordj Mira. Une diversité génétique s'est caractérisée au sein de ces cultivars.

Une évaluation des extraits antioxydants des trois cultivars a été confirmée par une étude quantitative spectrophotométrique/UV permettant le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des tanins hydrolysables.

Pour cela et afin d'obtenir un extrait riche en composés d'intérêts, nous avons opté à une comparaison de trois méthodes d'extraction, deux conventionnelles, la macération et soxhlet et une innovante assistée par ultrasons.

L'extrait hydrométhanolique de l'écorce du cultivar de Doux de Messaad a révélé une forte teneur en composés phénoliques, polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins hydrolysables avec la méthode assistée par ultrason avec une différence significative ($p < 0,05$). Le cultivar Doux de Koléa présente un effet inhibiteur dépendant de la méthode d'extraction. Il est plus fort avec la méthode assistée par ultrason.

Une forte corrélation a été enregistrée entre l'activité antioxydante et ceux des polyphénols totaux et des tanins hydrolysables ($r=0,887$ et $r=0,999$) respectivement.

Ces résultats nous ont permis d'approfondir nos connaissances sur la variabilité des caractéristiques phytochimiques ainsi que sur l'activité antioxydante de la grenade, et de fournir des indices pour la sélection de la méthode d'extraction. Cette recherche nous a aidé à sélectionner le cultivar et les matières premières optimaux pour la mise au point de nouveaux compléments nutritionnels.

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet antimicrobien des extraits des écorces trois cultivars de grenade, une plante largement utilisée dans médecine

traditionnelle à travers le monde. *S.aureus* présente une sensibilité Doux de Koléa(CMI=0,125mg/ml) que chez *K.pneumoniae* Echerichai Coli (0,25 mg/ml).

L'antibiogramme de nos extraits phénoliques s'est avéré comportant un effet antibactérien contre toutes les souches testées avec un fort pouvoir inhibiteur proche des deux antibiotiques ($26,66\pm 1,52$ et $33\pm 2,65$ mm) pour Streptomycine et Gentamicine respectivement.

A travers ces résultats intéressants et dans un contexte de développement durable de méthodologie pour l'optimisation et afin de récupérer un extrait riche en polyphénol et une forte activité antioxydante. L'étude de l'optimisation par plan d'expérience du procédé d'extraction par macération a permis de mettre en évidence l'effet des facteurs sur les réponses par en déduire les paramètres optimums d'extraction.

La concentration de l'éthanol a eu un effet positif sur les polyphénols totaux, le temps et la température ont influencés significativement l'activité antioxydant de l'extrait de grenade.

Les conditions optimales permettant l'extraction et de maximiser la quantité de polyphénols totaux pour une concentration de 80% d'éthanol, à une température de 50°C pendant 130 mn .Par ailleurs une température de 90°C et un temps de 120mn peuvent donner un extrait de forte activité antioxydante.

Ainsi, au cours de cette étude, le résidu d'extraction du jus de grenade a suscité notre intérêt afin de mettre en évidence son effet pharmacologique par une évaluation de ses propriétés anti-inflammatoires.

Présentant des teneurs variables en composés phénoliques, plus élevés en tannins hydrolysables ($16,35\pm 0,08$ mg EAT/g MS), modérée pour les polyphénols totaux ($11,44\pm 4,83$ mg EAG/ g MS) et plus ou moins faible pour les flavonoïdes ($6,4\pm 0,53$ mg EQr/mg MS).L'extrait de la poudre de bagasses a témoigné d'activités biologiques *in vivo* et *in vitro*.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH a confirmé cette suggestion et a été établi l'évaluation de son IC50 à 9,20. Ces composés sont doués de propriétés antioxydantes. Par ailleurs, cet extrait a inhibé l'œdème de manière dose-dépendante et à toutes les heures et présente une activité anti-inflammatoire.

En raison de ces caractéristiques, la bagasse de grenade pourrait convenir aux applications dans le domaine de l'industrie alimentaire comme ingrédient

potentiel. C'est une source importante de composés bioactifs dont les propriétés antioxydantes pourraient être très appréciées dans un grand nombre d'aliments transformés pour éviter leur oxydation pendant le traitement mais aussi pendant la période de stockage.

En effet, et malgré les moyens acquis lors de la réalisation de cette étude, les résultats obtenus au cours de la caractérisation morphologique, physicochimique, le dosage de différentes familles de composés phénoliques et leurs activités biologique in vitro et in vivo, ont dégagé une corrélation entre la richesse du fruit du grenadier et son utilisation en médecine traditionnelle.

Cette étude nous a permis d'accroître nos connaissances sur les variations de la caractérisation morphologique et physico-chimiques et profils phénoliques, ainsi que les activités antioxydantes de trois cultivars locales et nous ont fourni des indices pour les efforts de sélection futurs. La recherche a facilité aussi la sélection des cultivars optimaux pour la consommation et la transformation industrielle d'une part et matières premières pour le développement de nouveaux compléments nutritionnels à l'échelle alimentaire pharmaceutique.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant :

- De réaliser une enquête variétale auprès des producteurs algériens.
- De caractériser et identifier le patrimoine du grenadier en Algérie par la création d'une banque de données.
- De faire une caractérisation génétique d'autres variétés de grenades algériennes à travers différentes régions
- Etudier d'autres activités biologiques in vivo et in vitro pour mieux évaluer l'activité antioxydante.
- Identifier d'autres molécules de composés phénoliques par des techniques plus performantes, telles que la CPG/SM

Les extraits de grenade peuvent être considérés comme un puissant antioxydant plus efficace que les jus et les graines et être entant que source potentielles d'antioxydants naturels améliorant la fonctionnalité des produits alimentaires

Ce travail ouvre un large champ pour l'étude approfondie de ces trois cultivars très dégustés au niveau de la Mitidja.

Une caractérisation approfondie de ces cultivars a besoin d'une extension dans le domaine de la recherche en ouvrant des perspectives.

Appendices

Appendice A : Taxonomie

Tableau A1 : Position taxonomique du genre *Punica* dans différents systèmes de classification [21, 22,23]

Bentham and	Engler's system	Takhtajan's	Dahlgren's	Cronquist's	Young's	Thorne's	APGII
Dicotyledones	Dicotyledoneae	Magnoliopsida	Dicotyledoneae	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Dicotyledonea	Magnoliopsida
Polypetalae	Archichlamydeae	Rosidea	Myrtiflorae	Rosidea	Rosidea	Myrtiflorae	Rosidea
Calyciflorae	Myrtiflorae	Myrtanae	Myrtales	Myrtales	Myrtanae	Myrtales	Myrtales
Myrtales	Myrtinae	Myrtales	Lythraceae	Punicaceae	Myrtales	Lythrineae	Lythraceae
Lythraceae	Punicaceae	Myrtineae	<i>Punica</i> L.	<i>Punica</i> L.	Lythraceae	Lythraceae	<i>Punica</i> L.
<i>Punica</i> L.	<i>Punica</i> L.	Punicaceae			<i>Punica</i> L.	<i>Punica</i> L.	
		<i>Punica</i> L.					

Appendice B : Constituants des parties de grenadier

Tableau B 1 : Principaux constituants de différentes parties du grenadier [8]

Partie du fruit	Composés
Ecorce de grenade	Luteoline, quercetine, kaempferole, Acide gallique, Acide ellagique, punicalagine,
Huile de pépins	Acide linoléique conjugué, Acide linoléique, Acide oleique, acide stearique acide punique, acide eleostearique
Jus de grenade	Anthocyanines, glucose, acide organique, Acide ascorbique acid, ellagique, acid gallique, acide cafeeique, catechine, quercetine, rutine, mineraux

Appendice C : Questionnaires

C1. Questionnaire pour le consommateur

- Date.....
- Commune.....
- Numéro de relevé.....
 - **Personne questionnée**
- Age :
- Profession :
- Sexe : Masculin Féminin
- Région :.....
 - **Matériel végétal :**
- Usage de la plante :
 - Thérapeutique Cosmétique Autres
- État d'utilisation de la plante : Fraîche Desséché Après traitement Si desséché, méthode de séchage :
- Forme d'emploi : Tisane Poudre Huiles essentielles
.....
- Mode de préparation : Infusion Décoction Cataplasme Cru Cuit
Autres :
- Dose utilisée :
 - Quantité en g / verre :
 - Quantité en g/ litre :
 - Autres :
- Mode d'administration : Oral Massage Rinçage Badigeonnage Autres :
- Posologie : nombre de prise par jour.
 - Pour les enfants :
 - Pour les personnes âgées :
 - Pour les Adultes :
- Durée d'utilisation (durée de traitement) :
 - Un jour Une semaine Un mois Jusqu'à la guérison
- Méthode de conservation :
 - A l'abri de la lumière Exposé à la lumière Autres :

- **Utilisation :**

- Type de maladie :
- Résultats (efficacité) : Guérison Amélioration Inefficace
- Effets secondaires :
- Toxicité :
- Précaution d'emploi :
- Le gout :
- Le prix :

Appendice C : Questionnaires

C.2. Questionnaire pour l'herboriste

- Date.....
- Commune.....
- Numéro de relevé.....
 - **Personne questionnée**
- Age :
- Sexe : Masculin Féminin
- Région :.....
 - **Matériel végétal**
- Usage de la plante :
 - Thérapeutique Cosmétique Autres
- État d'utilisation de la plante : Fraîche Desséché Après traitement
 - Si desséché, méthode de séchage :
- Mode de préparation : Infusion Décoction Cataplasme Cru Cuit
Autres :
- Dose utilisé
 - Quantité en g / verre :
 - Quantité en g/ litre :
 - Autres :
- Durée d'utilisation (durée de traitement) :
 - Un jour Une semaine Un mois Jusqu'à la guérison
- Méthode de conservation :
 - A l'abri de la lumière Exposé à la lumière Autres :
- Satisfaction ou mécontentement du consommateur :.....
- Le prix :
- Les ventes : /jour :/semaine/ :...../mois :.....
- Rupture/pénurie :
- La variété vendue :.....

Appendice D : Produits chimiques

Tableau D1 : Liste des réactifs, solvants et milieux de culture

<ul style="list-style-type: none">• Réactifs
<ul style="list-style-type: none">➤ Hydroxyde de sodium, Phénolphtaléine, sulfate de cuivre (CuSO₄), sulfate de potassium, anhydre (K₂SO₄), Acide oxalique à 1%, 2,6-DiChloroIndoPhénol (DCIP), réactif de Folin-ciocalteu, carbonate de sodium à 7,5 %, Acide gallique, Chlorure d'aluminium à 2% .➤ Iodate de Potassium (KIO₃), Chlorure de potassium, Acétate de sodium, acide tannique Quercétine, acétronitrile, BHT (hydroxytoluènebutylé), DPPH (2,2-diphényl-picrylhydrazyl).➤ Acide ascorbique, Tampon phosphate, Ferricyanure de potassium.➤ Acide trichloracétique, Chlorure ferrique (0,1%), bicarbonates de sodium (CaCO₃), coupeaux de magnésium, chlorure ferrique (FeCl₃, 1%), Réactif de Dragendorff, Réactif de Mayer
<ul style="list-style-type: none">• Solvants
<ul style="list-style-type: none">➤ Phénol à 5 %, méthanol, ethanol, Acide chlorhydrique, Alcool sulfurique à 10 %, Hydroxyde d'ammonium (NH₄OH), Chloroforme (CHCl₃)
<ul style="list-style-type: none">• Milieux de culture et autres
<ul style="list-style-type: none">➤ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Bouillon et gélose nutritive, Milieu Muller Hilton pour bactéries, et Sabouraud pour champignons, souches de bactéries (ATTC), antibiotiques.

Appendice D : Produits chimiques

Tableau D2 : Liste des appareillages

Appareillage	Marque
Balance de précision	Sartorius group
Pied à coulisse	Comecta, 5900601
Spectrophotomètre UV-VIS	6850 Jenway
pH-mètre	Metrohm 744
Etuve	Memmert type-ONE 7, EN 60529-IP 20.Germany
appareil d'HPLC	Agilent (HP 1100 Knauer, Allemagne)
Appareil Soxhlet	SCI –Labwar ,6 - 200 ML EX5 series
Vortex	Toption, mx-f (fixe vitesse)
Dessicateur	290 Kio, type MIME
bain Marie	Buchi
Lyophilisateur	Genevac LTD IPS, série : DUCO9060077
Rotavapeur	BUCHI
Refractomètre	Atago (modèle N-20; Atago, Bellevue, Washington, États-Unis)

Appendice E :Pomologie de la grenade

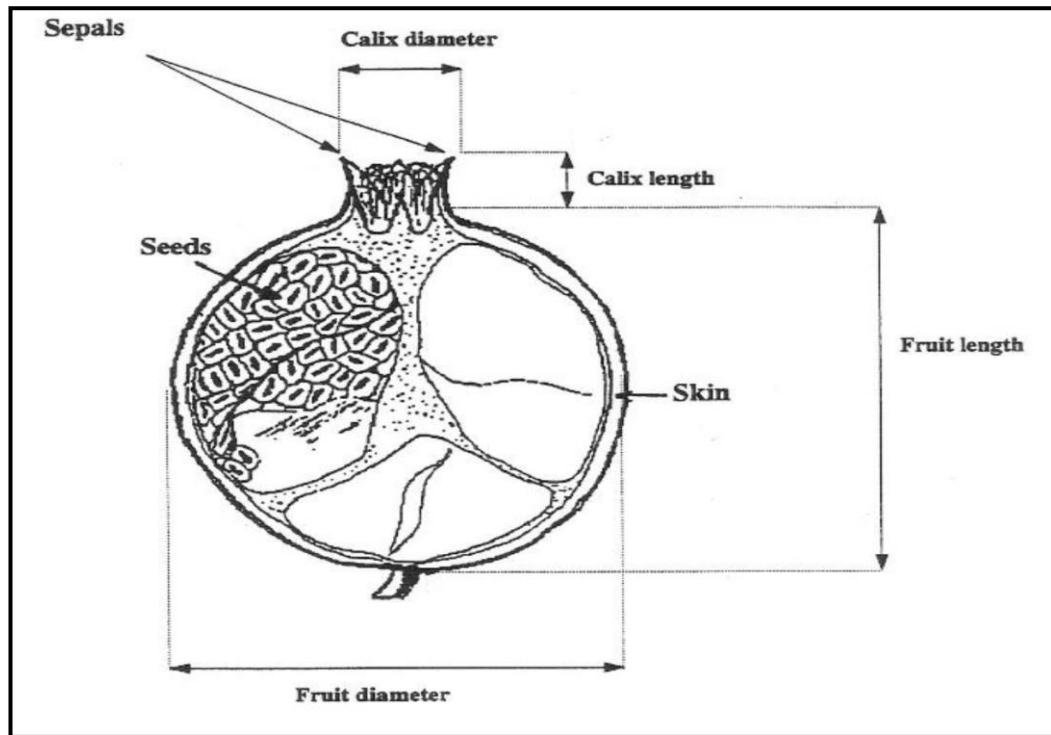


Figure E.1 : Caractéristiques pomologiques du fruit du grenadier [188].

Appendice F : Données quantitatives (ACP)

Tableau F1 : Coordonnées factorielles basés sur des corrélations

Consommateur	Facteur1	facteur2	facteur3
Consommateur 1	0,0446	0,41303	0,48394
consommateur 2	-0,92971	-0,07159	-0,00086
Consommateur 3	-3,3933	0,04982	-2,66111
Consommateur 4	-0,67224	-0,61691	0,84447
Consommateur 5	-1,21645	-0,48356	0,14335
Consommateur 6	0,0446	0,41303	0,48394
Consommateur 7	0,0446	0,41303	0,48394
Consommateur 8	0,99538	-0,29429	-1,5375
Consommateur 9	-0,52887	-0,41092	0,77236
Consommateur 10	-0,52887	-0,41092	0,77236
Consommateur 11	0,0446	0,41303	0,48394
Consommateur 12	0,76144	1,44297	0,12341
Consommateur 13	-0,24213	0,00105	0,62815
Consommateur 14	0,76144	1,44297	0,12341
Consommateur 15	-0,78635	0,1344	-0,07297
Consommateur 16	-0,21288	0,95835	-0,36139
Consommateur 17	-0,49961	0,54638	-0,21718
Consommateur 18	-1,50319	-0,89554	0,28757
Consommateur 19	-0,8156	-0,8229	0,91658
Consommateur 20	0,58882	0,27968	1,18506
Consommateur 21	1,25286	-0,83962	-0,69217
Consommateur 22	1,25286	-0,83962	-0,69217
Consommateur 23	1,25286	-0,83962	-0,69217
Consommateur 24	0,76144	1,44297	0,12341
Consommateur 25	-0,67224	-0,61691	0,84447
Consommateur 26	-0,95897	-1,02889	0,98868
Consommateur 27	-2,9632	0,66779	-2,87743
Consommateur 28	0,76144	1,44297	0,12341
Consommateur 29	0,76144	1,44297	0,12341

Suite tableau F1

Consommateur	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
Consommateur 30	1,9697	0,19032	-1,0527
Consommateur 31	1,25286	-0,83962	-0,69217
Consommateur 32	2,46112	-2,09226	-1,86828
Consommateur 33	-0,49961	0,54638	-0,21718
Consommateur 34	-0,3855	-0,20493	0,70026
Consommateur 35	0,93407	2,60626	-0,93824
Consommateur 36	0,87555	0,69166	1,04084
Consommateur 37	1,25286	-0,83962	-0,69217
Consommateur 38	-0,24213	0,00105	0,62815
Consommateur 39	0,27855	-1,32423	-1,17697
Consommateur 40	0,33134	0,82501	0,33973
Consommateur 41	-0,24213	0,00105	0,62815
Consommateur 42	-0,95897	-1,02889	0,98868
Consommateur 43	-0,49961	0,54638	-0,21718
Consommateur 44	-0,67224	-0,61691	0,84447

Appendice G : Données quantitatives

Tableau G1: Résultats de la dose utilisée, nombre de prise /jour et durée du traitement

Consommateur n°	Réponses		
	Dose utilisée (g/verre d'eau)	Nombre de prise/jour	Durée du traitement
1	10	2	2
2	7	2	3
3	5	2	7
4	5	2	2
5	5	2	3
6	10	2	2
7	10	2	2
8	12	1	3
9	6	2	2
10	6	2	2
11	10	2	2
12	15	2	2
13	8	2	2
14	15	2	2
15	8	2	3
16	12	2	3
17	10	2	3
18	3	2	3
19	4	2	2
20	10	2	1
21	10	1	2
22	10	1	2
23	10	1	2
24	15	2	2
25	5	2	2
26	3	2	2
27	8	2	7
28	15	2	2
29	15	2	2
30	15	1	2
31	10	1	2
32	10	0	2
33	10	2	3

Suite Tableau G1			
34	7	2	2
35	20	2	3
36	12	2	1
37	10	1	2
38	8	2	2
39	7	1	3
40	12	2	2
41	8	2	2
42	3	2	2
43	10	2	3
44	5	2	2
45	5	1	1
46	5	2	2
47	12	2	2

Appendice H : Droites d'étalonnages

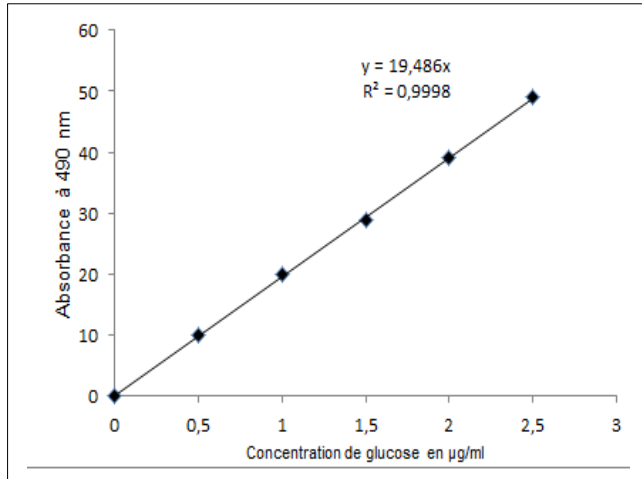


Figure H1 : Droite d'étalonnage de glucose µg/ml

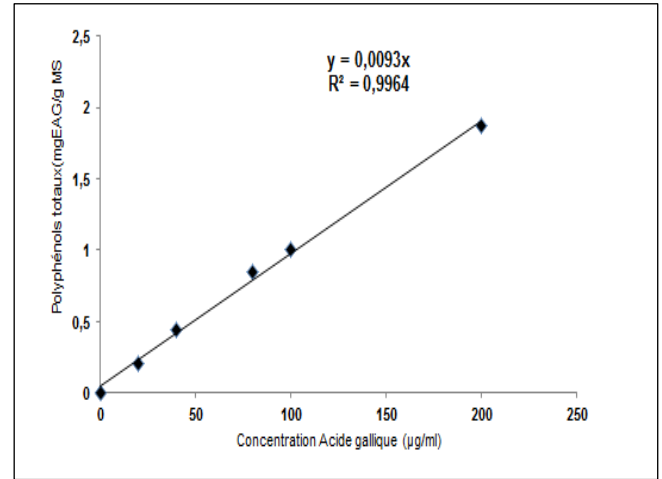


Figure H 2 : Droite d'étalonnage d'A. gallique

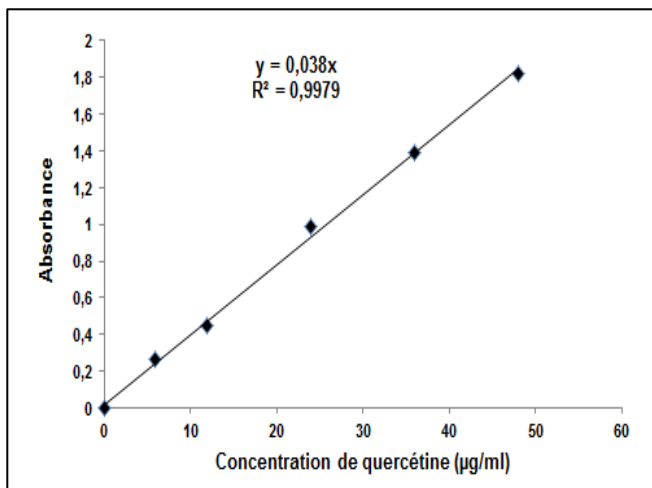


Figure H 3 : Droite d'étalonnage de quercétine µg/ml

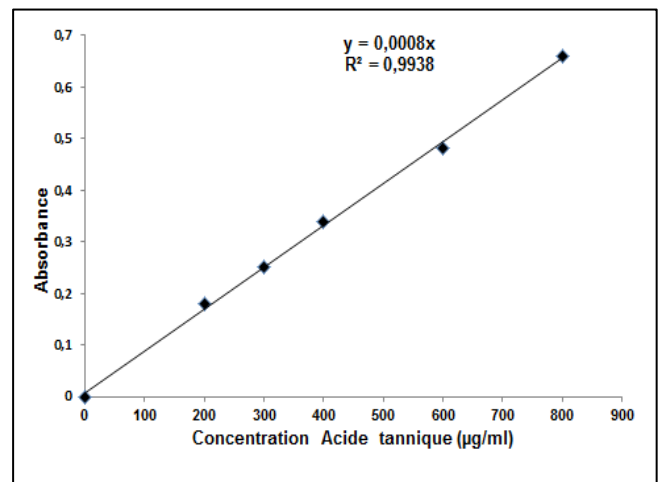


Figure H 4 : Droite d'étalonnage d'A. Tannique

APPENDICE I : Pourcentage d'inhibition des extraits hydromethanoliques des écorces de trois cultivars de grenade testés à différentes concentration ($\mu\text{g/ml}$) et des standards, BHT et acide ascorbique

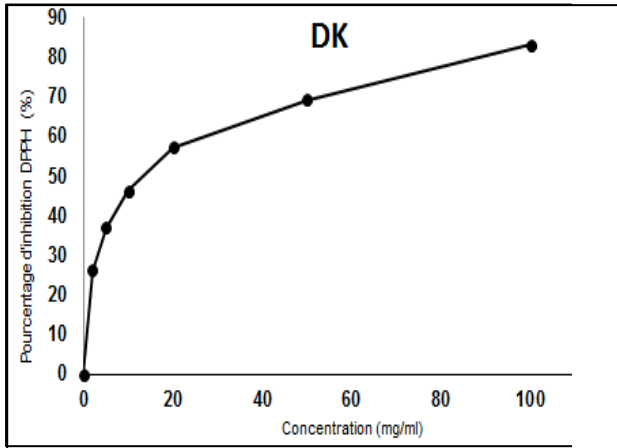


Figure I1 : Pourcentage d'inhibition DK

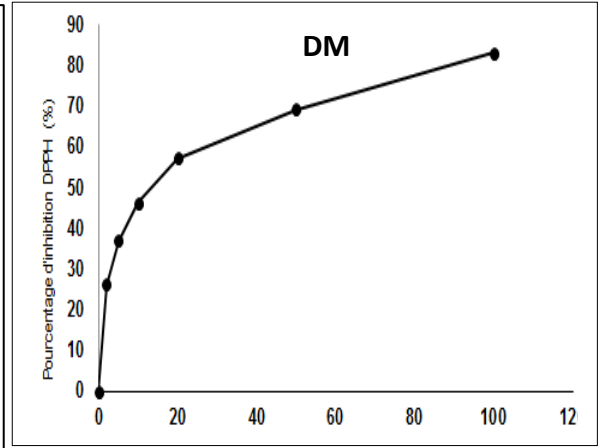


Figure I2 : Pourcentage d'inhibition DM

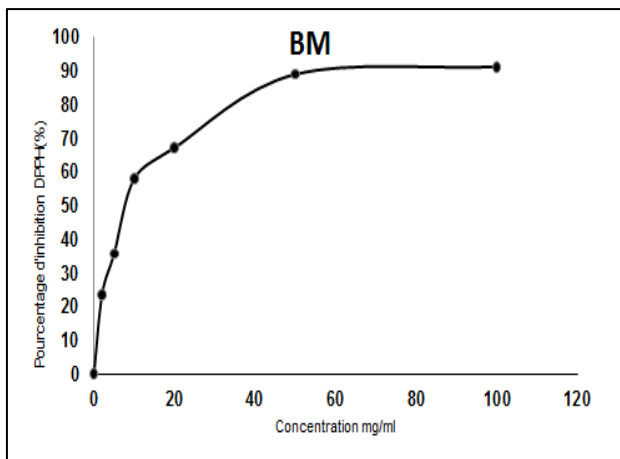


Figure I3 : Pourcentage d'inhibition BM

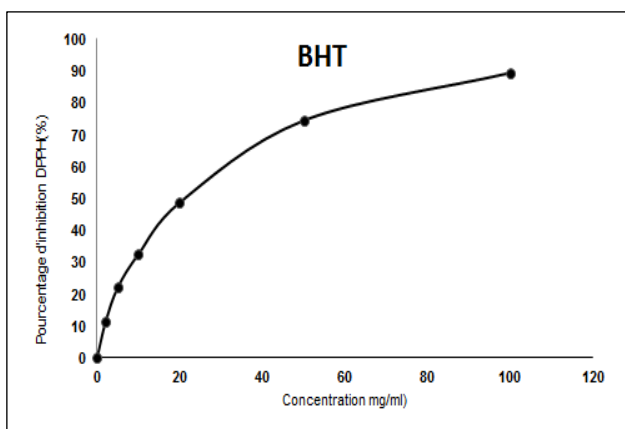


Figure I4: Pourcentage d'inhibition de BHT

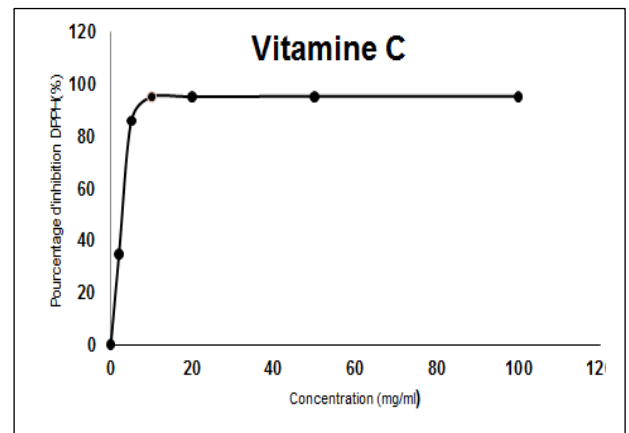


Figure I5 : Pourcentage d'inhibition de Vitc

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AA :	Activité antioxydante
A0 :	Densité optique du contrôle
ANO	Analyse de la variance
AUG	Pourcentage de l'augmentation de l'œdème.
AS :	Aensité optique de l'échantillon
Abs :	Absorbance
ACP	l'Analyse en Composantes Principales
AFN	Association française de normalisation
ATm	Acidité titrable moyenne
AINS	Médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens
APG	Groupe Phélogénétique des Angiospermes
APG	Deuxième Groupe Phylogénétique des Angiospermes
APG	Troisième Groupe Phylogénétique des Angiospermes
ASE	Extraction accélérée par solvant
AUG	Pourcentage d'augmentation de l'oedème du lot témoin.
AUG	Pourcentage d'augmentation du lot testé.
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
CAT	composition en anthocyanine totaux
CHCl	Chloroforme
CH3	Acide acétique
CMI :	concentration Minimale Inhibitrice
CRA	Centre Recherche et d'Analyses physico-chimique
CuS	Sulfate de cuivre
CYA	Cyanidine
Dmc	Diamètre moyen de Calice
Dmf :	Diamètre moyen du fruit
DCIP	2,6-DiChloroIndoPhénol
DmA	Diamètre moyen arille
Dmf :	Diamètre moyen du fruit
DmP	Diamètre moyen du pépin
DMS	Dimethyl sulfoxyde
Dn :	diamètre de l'oedème de la patte 1heure après l'injection de
D0 :	diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine
DO :	Densité optique
DPP	2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl
EVC	Equivalent vitamine C
EAG	Equivalent d'acide gallique
ECG	équivalent cyanidine 3-glucoside
EC50	Concentration inhibitrice à 50 %
EQ :	Equivalent catéchine
EmE	Epaisseur moyenne de l'écorce
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ET :	Equivalent d'Acide tannique
EQ :	Equivalent de quercétine
EtOH	Ethanol
FD :	Facteur de dilution

FRA	Ferric reducing/antioxidant power)
H2	Acide sulfurique
HPL	Chromatographie liquide haute performance
H3P	Acide phosphotungstique
H3P	acide phosphomolybdique
HT-	Cellules épithéliales
KIO3	d'iodate de potassium
ITAF	lInstitut Technique des arbres fruitiers et de la vigne
JC :	Jésus-Christ
K20 :	Potassuim
Kcal :	Kilocarie
KHZ	KiloHertz
KIO3	Iodate de potassium
kJ :	Kilojoule
K ₂ SO	Sulfate de potassuim anhydre
LmA	Longueur moyenne du pépin
Lmc :	Longueur moyenne de Calice
Lmtf :	Longueur moyenne totale du fruit
LPS :	lipopolysaccharidiques(
M :	Moyenne maximale du mois le plus chaud
M :	Moyenne minimale du mois le plus froid
M ₀ :	Masse de la capsule vide (
Mo8	Sels de molybdène
M ₁ :	Masse de la capsule et de la prise d'essai après
M ₂ :	Masse de la prise d'essai
M _{ext} :	Masse en gramme de l'extrait sec.
M _{ech} :	Masse en gramme de l'échantillon végétal
MS :	Matière sèche
MSR	la méthode de surface de réponse
N% :	pourcentage d'azote
NRC	Centre national de recherche sur la grenade
nm :	nanomètre
OMS	Organistion Mondiale de Santé
P :	Pluviométrie annuelle moyenne en mm
Pe :	Prise d'essai(
PmA	Poids moyen d'un arille
PmM	Poids moyen des membranes
Pf :	Poids moyen du fruit
PmE	Poids moyen de l'écorce
PM :	Poids moléculaire
P205	Phosphore
Q :	Quotient pluviométrique d'Emberger
PSA	Prostate Specific Antigen
Rdt :	Rendement
Rdtm	Rendement moyen en écorce
<i>Rdta</i>	<i>Rendement arille</i>
RP	Phase normale Colonne C18 ou inversée
RSM	Méthode des Surfaces de Réponse
SFE :	Extraction avec de fluide supercritique
AlCl ₃	trichlorure d'aluminium

TSS :	Total des solides solubles
VNR	Valeur Nutritionnelle de Référence
V ₀ :	volume en ml de la prise d'essai.
V ₁ :	volume, en ml de la solution d'hydroxyde de sodium (0,1N)
v/v :	Rapport volume/ volume %
v / v /	Rapport volume/ volume /volume%
UAE	Ultrasound assisted extraction
UV-	Ultraviolet-visible.
W80	sels de tungstène
ε:	Coeffic

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bazzano, L. A., Serdula, M. K. Liu S, "Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease", *Current atherosclerosis reports*, V.5, (2003),492-499.
2. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Kromhout, D. "Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk", *The Lancet*, (1997), 699p.
3. Grigoraș, C. G. "Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs", Thèse de Doctorat. Chimie Génie de l'Environnement, Université d'Orléans et de l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacău, (2012) , 197p.
4. Jones ME, Kossel A. 1953. A biographical sketch. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 26(1) ,(1953),80-97.
5. Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food chemistry*. 225p, (2017),10-22.
6. Hmid, I. *Contribution a la valorisation alimentaire de la Grenade Marocaine (Punica Granatum L.) : caracterisation physicochimique, biochimique et stabilite de leur jus frais* ,175 p, (2013). .
7. Curtay, J.P., Jacob, L., Jung, R.R., & Kaplan, M., "Jus de grenade fermenté, la grenade, "aliment-plus" un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l'arsenal de la nutrithérapie", *Macro pietteur (EDS)*, Paris , (2008)73p.
8. Spilmont, N. "Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose : rôle des fractions lipidiques et polypénoliques, approches physiologiques, cellulaires et moléculaires», Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand, (2015), 299p, 61-67.
9. Aviram, M., N. Volkova, et al. "Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein edeficient mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins." *J Agric Food Chem*, V.56 (3), (2008), 1148-1157.
10. Pedriali, C.A, Fernandes A.U, "Santos P.A, da Silva M.M, Severino D, and daSilva M.B."Antioxidant activity, cito- and phototoxicity of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed pulp extract», *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, V. 30 (2010), 1017-1021.
11. Anonyme. "Statistiques agricoles, série B", Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, (2018), 65p.
12. Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J and Pérez-Alvarez, J.A. "Po anate and its many functional components as related to human health: /iew". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, V.9, (2010), 654.

13. Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A, "Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing". *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(10), (2000),4581-4589.
14. Lansky, EP et Newman RA,"*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer", *J. Ethnopharmacol.*, V. 109(2), (2007), 177-206.
15. Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K,"Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models", *Journal of agricultural and food chemistry*, V.50 (1), (2002), 81-86.
16. Melgarejo P. and Martínez R.,"El granado.Mundi-Prensa", Madrid,(1992),163p.
17. APG III,An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants, *Bot. J. Linn. Soc.*, V161, (2009), 105–121.
18. 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.
19. Jurenka,J."Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review, *Alternative Medicine Review*", V.13 (2), (2008), 128 -144.
20. Levin, G.M. Pomegranate Roads: A Soviet Botanist's Exile from Eden, 1st Edn.Florent Press, Forestville, California, 2006, 15 -183.
21. Sánchez-Monge E.,"Fitogenética (mejora de plantas),Instituto Nacional de Investigaciones AgrariasMinisterio de Agricultura" ,Madrid,(1974), 456 pp.
22. Anarinco,"Pomegranatehistory",Availableat:www.anarainco.com/history.htm. (2006).
23. Kumar, G. N. M.,"Pomegranate. In S. Nagy, P. E. Shaw, and W. F. Wardowski (Eds.), *Fruits of tropical and subtropical origin* Auburndale, FL: Ag Sciences, Inc., 1990, 328-34.
24. Levin, G. M."Pomegranate (*Punica granatum*) plant genetic resources in Turkmenistan". *Bulletin des Ressources Phytogenetiques (IPGRI/FAO)*; *Noticiario de Recursos Fitogeneticos (IPGRI/FAO)*, (1994).
25. Rana, T.S., Narzary, D., Ranade, S.A. "Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica* L. In: Chandra, R. (Ed.), *Pomegranate. Fruit Veg. Sci. Biotechnol.*, vol. 4, Special Issue 2,(2010),19–25.
26. Chaudhari, S. M., & Desai, U. T,"Effect of plant growth-regulators on flower sex in pomegranate (*Punica granatum* L.",*Indian Journal of Agricultural Science*, V.63, (1993), 34-35.

27. Karp, D, "The pomegranate: For one and all". *Fruit Gardener*, V.38, (2006), 8 -12.
28. Dahlgren, R., Thorne, R.F., "The order Myrtales: circumscription, variation, and relationships", *Ann. Missouri Bot. Gard*, V.71, (1984).633–699.
29. Fadavi, A., Barzegar, M., & Azizi, M. H., Determination of fatty acids and total lipid content in oil seed of 25 pomegranates varieties grown in Iran, *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 19 (6-7), (2006),676-680.
30. Oukabli, A., Bellaji, M., Chahbar, A., Elkacemi, A., Lahlou, M., Allabou, M., Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum L.*) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama*, V.3, (2004),111p.
31. Calín A, Sánchez Ángel A., Barrachina C. Punicalagine, antioxydant naturel de la grenade - propriétés et bienfaits pour la santé.2009.
32. Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, J. J., Legua, P., Martínez, R., Hernández, F., & Melgarejo, P., "Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones". *Scientia Horticulturae*, VB.182, (2015), 65-72.
33. Stover, E. D., & Mercure, E. W. "The pomegranate: a new look at the fruit of paradise", *HortScience*, V .42(5), (2007), 1088-1092.
34. Dafny-Yalin M, Glazer I, Bar-Ilan I, Kerem Z, Holland D, Amir R., "Color, sugars and organic acids composition in aril juices and peel homogenates prepared from different pomegranate accessions", *J. Agric. Food Chem*, V.58, (2010), 4342-4352.
35. Evreinoff, VA., "Le grenadier". *Fruits Journal of Agriculture Sciences*, V.19, (1957), 320-336.7.
36. Martínez J.J., Melgarejo P., Hernández F., Salazar D.M. and Martínez R, "Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties", *Sci. Hortic*, V.110, (2006), 241-246.
37. Khadivi-Khub, A., Kameli, M., Moshfeghi, N., & Ebrahimi, A., "Phenotypic characterization and relatedness among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) accessions", *Trees*, 29(3), (2015) ,893-901.
38. Melgarejo, P., Salazar, D.M.S., 2003, "Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiaridas", Vol. 2, (2003), 416 p.
39. Fawole, O.A., Opara, U.L., & Theron, K.I, "Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa". *Food Bioprocess*,(2011).
40. Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., "Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Horticultural*", *Reviews*, V.35, (2009). 127 - 191.

41. Tarai, R. K., & Ghosh, S. N., "Flowering, Fruit Set, Fruit Drop, Fruit Retention, Fruit Maturity and Yield of Seven Cultivars of Pomegranate Grown in the Semi-Arid Region of West Bengal," *Environment and Ecology*, 29(4), (2011), 1823-1827.
42. El yatem, S.M.& Kader, A., "Post harvest physiology and storage behavior of pomegranate fruits", *Scientis Horticulturae*, V.24, (1984), 287-298.
43. Mars, M., "Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review" *Options Méditerranéennes, Sér A: Sémin Méditerranéennes*, V.42. (2002), 55–62.
44. Josan, J.S., Jawanda, J.S. and Uppal, D.K., "Studies on the floral biology of pomegranate. I. Sprouting of vegetative buds, flower bud development, flowering habit, time and duration of flowering and floral morphology", (1979).
45. Ben-arie, R., Zhou. H.W., Sonogo, L. & Zutkhi. Y., "Plant growth regulator effects on the storage and shelf-life of 'Triumph' persimmon", *Acta Hort*, 436, 1997, 243-250.
46. Defilippi, G., Whitaker, B., Hess-Pierce, B., & Kader, A., Development and control of scald on wonderful pomegranates during long-term storage, *Postharvest Biology and Technology*, 41, (2006), 234-243.
47. Cauchard, P., "La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement" *Mémoire de Fin d'Études, Agrocampus Ouest CFR Angers*, (2012), 34p.
48. Anonyme. »International Trade Published by the National Agricultural Marketing Council (NAMC) in cooperation with the department of Agriculture", *Fisheries et Fisheries, Republic of Africa, Chronica Horticulture*, V.48(3), 2012, 15p.
49. Salgado M. O, "Pomegranate, South Africa," BSc, Science, Agricultural Eng, Origin Fruit Direct, MBA, September (2017), 62p.
50. Anonyme, "Deuxième Rapport National sur l'état des ressources phytogénétiques". Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), (2006), 65p.
51. Génard, M., Bertin, N., Borel, C., "Towards a virtual fruit focusing quality: modelling features and potential uses", *J. Exp. Bot.* 58, (2007), 917–9
52. Afaq, F., A. Malik, et al. "Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochem Photobiol*, V.81 (1), (2005), 38-45.
53. Akpinar-Bayazit, A., Ozcan, T., & Yilmaz-Ersan, L., "The therapeutic potential of pomegranate and its products for prevention of cancer". In *Cancer Prevention- From Mechanisms to Translational Benefits*, InTech, (2012).

54. Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S, " Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction," *Food chemistry*, V.202, (2016). 59-69.
55. Nuncio-JÁuregul,N.,Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina,A., "Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage", *Scientia Horticulturae*, V.165, (2014) ,181-189.
56. Yilmaz, Y., Celik, I., & Isik, F., "Mineral composition and total phenolic content of pomegranate molasses",*Journal of food agriculture and environment*, V.5(3/4), (2007),.102.
57. Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Tripler, E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer, I., & Holland, D, "Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit, *Journal of Food Composition and Analysis*", V.22(3), (2009),189-195.
58. Orhan, E., Ercisli, S., Esitken, A., & Sengul, M,"Molecular and morphological characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes sampled from Coruh Valley in Turkey, *Genet Mol Res*, V.13 (3), (2014), 6375-6382.
59. El falleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., Ferchichi, A., "Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L) fruits",*Journal of Food Science*, V.76, (2011),707–713.
60. Legua, P.,Melgarejo, P., Martínez, J. J., Martínez, R., & Hernández, FE., "valuation of Spanish pomegranate juices: organic acids, sugars, and anthocyanins", *International journal of food properties*, 15(3), (2012),481-494.
61. Çam, M., Hışıl, Y., & Durmaz, G., "Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four metl ' ' " *Food chemistry*, 112(3), (2009),721-726.
62. Ferrara, G., Giancaspro, A., Mazzeo, A., Giove, S. L., Matarrese, A. M. S., Pacucci, C., & Gadaleta., "A Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy", *Scientia Horticulturae*, V. 178, (2014), 70-78.
63. Parmar C, Kaushal MK Wild fruits of sub-Himalayan region. Kalyani Publ, New Delhi, (1982), 74p.
64. Mir,M.M., Umar, I., Mir, S.A., & Rehman, M.U. , "Quality evaluation of pomegranate crop -a review". *International Journal of Agriculture and Biology*, V.14, (2012), 658 – 667.

65. Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M., "Seasonal changes of mineral nutrients and phenolic in pomegranate (*Punica granatum*L.) fruit",*Cinetia Horticulturae* V.111(2), (2007) ,120-127.
66. Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international*, (2015).
67. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S., "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food chemistry*, V.99(1), (2006),191-203.
68. Jaiswal, V., DerMarderosian, A., & Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, 118(1), 11-16.
69. Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 891(1), 183-188.
70. Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., & Artık, N., "Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey", *Journal of food composition and analysis*, V.15(5), (2002),567-575.
71. Sharma, J., et Maity, A., "Pomegranate phytochemicals: Nutraceutical and therapeutic values". *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, V.4(2), (2010), 56-76.
72. Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T., "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, V.579 (1), (2005), 200-213.
73. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N., "Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A rev *Food chemistry*,V. 261, (2018),75-86.
74. Jbir, R., Hasnaoui, N., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M., "Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis", *Sci. Hortic.*,V.115, (2008),231–237.
75. Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., & Del Rio, D., "Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn", *Molecules*, 17(12), (2012), 14821-14840.
76. Van Elswijk, D. A., Schobel, U. P., Lansky, E. P., Irth, H., & van der Greef, J., "Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry", *Phytochemistry*, V.65(2), (2004),233-241.

77. Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R., "Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn", *Food Chemistry* V.127, (2011), 807–821.
78. Khanbabaee, K., & van Ree, T., "Tannins: classification and definition", *Natural product reports*, V.18(6), (2001) ,641-649.
79. Ozgen, M., Durgaç, C., Serçe, S., & Kaya, C., "Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey", *Food Chemistry*, V.111(3), (2008) ,703 -706.
80. Radhika, S., Smila, K. H., & Muthezhilan, R. (2011)., "Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Punica granatum* linn on alloxan induced rats", *World Journal of Medical Sciences*, V.6(4), (2011), 178-182.
81. Olapour, S., & Najafzadeh, H. "Evaluation Analgesic, Anti-Inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro Alcoholic Peel Extract of" *Punica granatum* (pomegranate)". *Asian Journal of Medical Sciences*, V.2(6), (2010),266-270.
82. Sharma, J., & Maity, A., "Pomegranate phytochemicals: Nutraceutical and therapeutic values". *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, V.4(2), (2010), 56-76.
83. Moghaddam, G., Sharifzadeh, M., Hassanzadeh, G., Khanavi, M., & Hajimahmoodi, M. "Anti-ulcerogenic activity of the pomegranate peel (*Punica granatum*) methanol extract. *Food and Nutrition Sciences*, V.4(10), (2013), 43.
84. Akhavan, H., Barzegar, M., Weidlich, H., & Zimmermann, B. F., "Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction". *Journal of Chemistry*, (2015), 7 p.
85. Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M., "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants", *Food Chemistry* .102, (2007),938–953.
86. Wu, K., Feskanich, D., Fuchs, C. S., Willett, W. C., Hollis, B. W., & Giovannucci, E. L. "A nested case–control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer". *Journal of the National Cancer Institute*, 99(14), (2007),1120-1129.
87. Celik, I., Temur, A., & Isik, I. "Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats" . *Food and Chemical Toxicology*, V.47(1), (2009),145-149.
88. González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Zafrilla, P., Mulero, J & Espín, J. C. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: a crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after

consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, V.19, (2015),225-235.

89. Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C., "Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics", *Molecules*, V.14(5), (2009),1808-1817.
90. Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A., "Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products", *International journal of food science & technology*, V.45(2), (2010), 216-222.
91. Choudhury, S., Ghosh, S., Mukherjee, S., Gupta, P., Bhattacharya, S., Adhikary, A., & Chattopadhyay, S. "Pomegranate protects against arsenic-induced p53-dependent ROS-mediated inflammation and apoptosis in liver cells". *The Journal of nutritional biochemistry*, V.38, (2016), 25-40.
92. Devatkal, S. K., Narsaiah, K., & Borah, A. "Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties", *Meat Science*, V.85(1), (2010) ,155-159.
93. Akhavan, H., Barzegar, M., Weidlich, H., & Zimmermann, B. F., "Phenolic compounds and antioxidant activity of juices from ten Iranian pomegranate cultivars depend on extraction", *Journal of Chemistry*, (2015), 7 p.
94. Yoganandam, G. P., Ilango, K., & Sucharita, D. "Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of *Punica granatum* L.(Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*, V.2(2), (2010),1260-1263".
95. Banihani, S., Swedan, S., & Alguraan, Z., "Pomegranate and 2 diabetes", *Nutrition research*, 33(5), (2013), 341-348.
96. Radhika, S., Smila, K. H., & Mutheszilan, R. (2011)., "Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Punica granatum* linn on alloxan induced rats", *World Journal of Medical Sciences*, V.6(4), (2011), 178-182.
97. Qnais, E.Y.,Elokda, A.S ., Abu Ghalyun Y.Y& F.A., "Abdulla."Antidiarrheal Activityofthe Aqueous Extract of *Punica granatum*. (Pomegranate)Peels", *Pharmaceutical Biology*, V.45(9), (2007).
98. Chadli, R., Bouzid, A., Bouzid, K., & Nader, H. "Bactericidal effect of aqueous extracts of the bark of the pomegranate (*Punica granatum* L.) on bacteria". *European Journal of Molecular Biotechnology*, V(1), (2015), 4-11.
99. Al-Zoreky, N. S. "Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels". *International journal of food microbiology*, V.134 (3), (2009), 244-248.

100. Braga, L. C., Leite, A. A., Xavier, K. G., Takahashi, J. A., Bemquerer, M. P., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. "Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*". *Canadian journal of microbiology*, V.51(7), (2005), 541-547.
101. Haroun, B. M., Elghamry, A. A., Abdel-Shakour, E. H., Elmorsy, S. M., & Zahem, Y. H. "Determination of bioactive compounds of *Punica granatum* puniceae and studying its antimicrobial activities against bacteria isolated from El-Manzala water treatment plant". *World Rural Observation*, V.6(1), (2014),79-86.
102. Rouhani, M., Samih, M. A., Izadi, H., & Mohammadi, E. "Toxicity of new insecticides against pomegranate aphid, *Aphis punicae*". *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, V.4 (3), (2013), 496-501.
103. Dupaigne, P. "Les fruits et leurs produits peuvent-ils présenter un danger pour l'homme ?". *Fruits*, 29(1), (1974), 57-70.
104. Naczki, M., & Shahidi, F. "Extraction and analysis of phenolics in food", *Journal of Chromatography A*, V.1054 (1-2), (2004), 95-111.
105. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review". *Journal of Food Engineering*, V.117 (4), (2013), 426-436.
106. Normardhati, M, "Study on the effect of processing parameters on the extraction of stevioside using soxhlet extractor", (2012).
107. Poirot, R. "Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de sol artir de matière végétale" (Doctoral dissertation), (2007) ,114p .
108. Celhay, C. "Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques" (Doctoral dissertation), (2013),315p.
109. De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E., "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future", *Analytica chimica acta*, V.369 (1-2), (1998), 1-10.
110. Normardhati, M, "Study on the effect of processing parameters on the extraction of stevioside using soxhlet extractor", (2012).
111. Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., & Eskilsson, C. S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, V.33(3), (2005),223-233.
112. Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksourl, R. "Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*". *Journal of New Sciences*, V.28,(2016).

113. Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. "Ultrasound-assisted extraction in food analysis". *Handbook of food analysis instruments*, (2008), 85-103.
114. Wang, L., & Weller, C. L. "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants". *Trends in Food Science & Technology*, V.17(6), (2006) ,300-312.
115. Herrera, M. C., & De Castro, M. L. "Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection". *Journal of Chromatography A*, V.1100(1), (2005),1-7.
116. Bartzoka, E. D., Lange, H., & Crestini, C., "Ultrasound-Assisted Functionalization of Polyphenols", *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*, (2016),995-1020.
117. Penchev, P., Angelov, G., & Condoret, J. S., "Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.)", *Revue de génie industriel*, V.5, (2010),115-123.
118. El Darra, N. "*Les composés phénoliques des raisins: étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction*", (Doctoral dissertation, Compiègne), (2013), 344p.
119. Wang, B. Yang, X. Du, C.Yi, "Optimisation of Supercritical Extraction of Flavonoids from *Pueraria lobata*". *Food Chemistry* V.108, (2008).
120. Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. "Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.53 (6), (2005), 2111-2117.
121. Banik, R. M., & Pandey, D. K. "Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology". *Industrial crops and products*, V.27(3), (2008),241-248.
122. Gendre, L., Soulier, B., & Savary, A. "Les plans d'expérience". *Sciences de l'Ingénieur*,(2009).
123. Stafford, J., & Bodson, P., "*L'analyse multivariée avec SPSS*,Puq, (2006).
124. Cérézo, V. "Propriétés mécaniques, thermiques et acoustiques d'un matériau à base de particules végétales: approche expérimentale et modélisation théorique". *Institut National des Sciences Appliquées, Lyon*, (2005).
125. Goupy, J., & Creighton, L. "*Introduction aux plans d'expériences-3ème édition*"- Livre+ CD-Rom, Dunod, (2006).

126. Gillon, F. "*Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques*" (Doctoral dissertation, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I), (1997).
127. Brown, I. A. "Le modèle linéaire par l'exemple : Régression, Analyse de la variance et Plans d'expérience illustrés avec R, SAS et Splus". *Investigación Operacional*, V.30(1), (2009), 88-89.
128. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., & Dos Santos, W. N. L., "Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods", *Analytica chimica acta*, 597(2), (2007), 179-186.
129. Humbert, L. "Extraction en phase solide (SPE): théorie et applications". In *Annales de Toxicologie Analytique*, EDP Sciences, V. 22(2), (2010). 61-68.
130. Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G. "Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time". *J. Food Engineering*, V.71, (2005), 214-222.
131. Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., & de la Rosa, A. P. B. "Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.)". *Journal of Food Composition and Analysis*, V.23(6), (2010),525-532.
132. Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jaho L., & Opletal, L. "Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health". *Mini reviews in medicinal chemistry*, V.8(5), (2008),436-447.
133. Adamczyk, B., Adamczyk, S., Smolander, A., Kitunen, V., & Simon, J"Plant Secondary Metabolites—Missing Pieces in the Soil Organic Matter Puzzle of Boreal Forests". *Soil Systems*,V. 2(1), ,(2018),2p.
134. Dandachi, N., Kelly, N. J., Wood, J. P., Burton, C. L., Radder, J. E., Leme, A. S., ... & Shapiro, S. D. (2017). Macrophage elastase induces TRAIL-mediated tumor cell death through its carboxy-terminal domain. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 196(3), 353-363.
135. Sava, C., Sirbu, R., & Dumitrescu, C. "Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels". *Scientific Study & Research*, V.7, (2006),785-798.
136. Roggero JP, Coen S, Ragonnet B. "High-Performance Liquid-Chromatography Survey on Changes in Pigment Content in Ripening Grapes of Syrah - an Approach to Anthocyanin Metabolism". *American Journal of Enology and Viticulture*, .V37, (1986), 77-83.
137. Wollgast, J., & Anklam, E., Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for

- identification and quantification. *Food Research International*, V.33 (6),(2000). 423-447.
138. Zegarac, J. P., Valek, L., Stipcevic, T., & Martinez, S. Electrochemical Determination of Antioxidant Capacity of Fruit Tea Infusions. *Food Chem*, 121, (2010),820-825.
 139. Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. K., Perez, E. A., Puglisi, F., & Gianni, L. Treatment of HER2-positive breast cancer: status and future perspectives. *Nature reviews Clinical oncology*, 9(1) (2012), 16.
 140. Dridi, B., & 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". *Biotechnologie ; Agronomie ; Société et Environnement*, 16(2), (2012) ,193-201.
 141. Anonyme."Rubrique monographique wilaya.Wilaya d'Alger". Agence Nationale d'Intermédiation et de régulation Foncière, 2013, 8p.
 142. Meklati, A. "*La mise en place d'un plan d'intervention en cas de sécheresse pour la wilaya d'Alger*". Thèse de doctorat, 2009, 80p.
 143. Anonyme. "Relevés périodiques des principaux phénomènes climatiques de la station météo locale de la ferme de démonstration de Boufarik». Institut Technique de l'Arboriculture et de la Vigne, 2016.
 144. Laribi, M et Mokeddem, F.,"Impact de l'imperméabilisation artificielle des terres sur la perte de la ressource naturelle et agricole dans la plaine Mitidja". Mémoire de Master, 2018, 55p.
 145. Bagnouls, F., & Gaussen, H.,"Dry periods and vegetation. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*", V.236(10), (1953),1075-1077.
 146. Dajoz, R."Précis d'écologie". Paris, Dunod, (1971), 444p.
 147. Hartani, T., "La réutilisation des eaux usées en irrigation: cas de la Mitidja en Algérie", *Séminaire sur la modernisation de l'agriculture irriguée*, (2004),11p.
 148. Anonyme."Rubrique monographique wilaya.Wilaya de Blida ", Agence Nationale d'Intermédiation et de régulation Foncière, 2013, 8p.
 149. Thasi C.K., "Connaissances, attitudes et pratiques de la communauté sur la promotion des plantes médicinales dans les ménages de l'aire de santé Afia Keshero en RDC", Mémoire de Licence en santé et développement communautaires, Université libre des pays des grands lacs Goma, (2009).
 150. Alavoine F., Crochon M., Ady C., Fallot J., Moras P. et Pech J.C. "La Qualité gustative des fruits. Méthodes pratiques d'analyse". Méthode de présomption de la qualité gustative des pommes Golden délicious, NF V. 20, (1981).

151. U.P.O.V."Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales, Principes directeurs pour le grenadier", 2013, 3-29.
152. Mars, M., & Marrakchi, M. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, V.46(5), (1999),461-467.
153. AFNOR, "Recueil de normes françaises de produits dérivés de fruits et légumes, jus de fruits", AFNOR, (1982), 325p.
154. Audigie Cl et Dupont G, "Principes des méthodes d'analyses biochimiques". Ed.Dom. Paris, (1982), 4-7.
155. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, V.28 (3), (1956), 350-356.
156. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata, E., Fernández- López, J., Sendra, E & Pérez-Álvarez, J. A. "Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses powder co- product" *Journal of Food Engineering*, V.110()12). 220-224.
157. Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., & Chanda, S. V., "Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem", *Food Analytical Methods*, V.5(3), (2012),396-404.
158. Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y., "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay" ,*Nutrition research*, V.23(12), (2003),1719-1726.
159. Hasnaoui, N., Wathelet, B., & Jiménez-Araujo, A" Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties". *Food chemistry*, 160, (2014), 196-203.
160. Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., Akbar, J., "Efficiency of pomegranate peel extract in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions". *Food Research International*, V.41, 2008,194–200.
161. Ghasemian, A., Mehrabian, S., & Majd, A., "Peel extracts of two Iranian cultivars of pomegranate (*Punica granatum*) have antioxidant and antimutagenic activities", *Pak J Biol Sci*, 7, 2006),1402-405.
162. Zhenbin, W., Shuai, Z., Shuping, S., & Xi, W. (2014)., Effect of Ultrasound Treatment on the Double-Enzyme Hydrolysis of Starch and Its Mechanism, *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 5, 011.

163. Do Vale Morais, A.,(2017). *Intérêt de la lyophilisation pour améliorer la stabilité des microémulsions chargées en Amphotéricine B destinées au traitement de la leishmaniose*(Doctoral dissertation, Paris Saclay).
164. Falleh H ., Ksouri R., Chaieb K., Karray- Bouraoui N., Trabelsi., Boulaaba. M & Abdelly.C,"Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities", *C. R. Biologies*, V .331, (2008), 372-379.
165. Bhandary, S. K., Kumari, S., Bhat, V. S., Sharmila, K. P., & Bekal, M. P. (2012). Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *J Health Sci*, 2(4), 35-8.
166. Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217-225.
167. Singleton, V.L., & Rossi, J. A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents". *American journal of Enology and Viticulture*, V. 16(3), (1965), 144-158.
168. Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M. C., & Piatti, E, "Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants". *Food Chemistry*, V.97, (2005), 217- 222.
169. Willis, R.B.; Allen, P.R. Improved method for measuring hydrolysal inins using potassium iodate. *Analyst*, v.123(3), (1998) ,435 – 439.
170. Fischer, U.A., A.V. Jaksch, R. Carle, and D.R. Kammerer., "Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits and juices", *European Food Research Technology*, V. 237, (2013), 209-221.
171. Mansour, E., Ben Khaled, A., Lachiheb, B., Abid, M., Bachar, K., & Ferchichi, A, "Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from Tunisian pomegranate". *Journal of Agricultural Science and Technology*, V.15, (2013), 1393-1403.
172. Michel, T., "*Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides)*", (Doctoral dissertation, Université d'Orléans). (2011), 286p.
173. El Darra, N. Les composés phénoliques des raisins : *étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction* (Doctoral dissertation, Compiègne), (2013).
174. Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., & Athar, M, "Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers". *Journal of ethnopharmacology*, V.108 (3), 2006), 340-348.

175. Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., & Mehinagic, E "Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco". *Arabian Journal of Chemistry*, V. 10, (2017), 2675-2684.
176. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K,"Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of agricultural and food chemistry*, V.53 (10), (2005),4290-4302.
177. Reguieg Y A and Hammadi K, "Enhancement of the Bark of *Punica granatum* Fruit through the Phytochemical and Antimicrobial Activity Studies, *Med Aromat Plants*, V.6(1),(2017) 2-8.
178. Karapinar, M., & Sengun, I. Y," Antimicrobial effect of koruk (unripe grape—*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables". *Food Control*, 18(6), (2007),702-706.
179. Kanoun, K., Abbouni, B., Boudissa, S., Bouhafs, N., & Seddiki, M, "Etude de l'activité des extraits de feuilles de *Punica granatum* Linn sur *Candida albicans* et *Rhodotorula* spp", *Phytothérapie*, V. 14(1), (2016). 5-16.
180. Szumski, M., & Buszewski, B,"State of the art in miniaturized extraction techniques". *Critical reviews in analytical chemistry*, V.32 (1), (2002), 1–10.
181. Rossi, P. G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., & Bolla, J. M, "Antibacterial action of essential oils from Corsica". *Journal of Essential Oil Research*, V. 19 (2), (2007), 176-182.
182. Mashkor, A. L,"Phenolic content and antioxidant activity of fenugreek seeds extract". *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), (2014), 841-844.
183. Qu, W., Pan, Z., & Ma, H, "Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc" , *Journal of food engineering*, V.99(1), (2010), 16-23.
184. Yefsah-idres, A,"*Biodisponibilité et incidence physicochimique chez le rat*», (Doctoral dissertation, Thèse magister, INA. El-Harrach, Alger), (2007).
185. Adeyemi OO, Okpo SO, Oguni OO," Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill (*Lawraceae*)". *Fitoterapia*,V. 73 (2002),375–80.
186. Ndiaye M, SY Gy, Dièye AM, Touré MT, Faye B.,"Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annona reticulata* (annonaceae) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carragénine", *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, Vol.14, 200, 179-186.
187. Bakiri, N., Bezzi, M., Khelifi, L., & Khelifi-Slaoui, M,"Enquête ethnobotanique d'une plante médicinale *Peganum harmala* l.dans la région de M'sila". *Revue Agriculture*, V. 1, (2016). 38-42.

188. Aribi, A., Gery, S., Lee, D. H., Thoennissen, N. H., Thoennissen, G. B., Alvarez, R., & Toh, M(2013), "The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer". *International journal of cancer*, V.132(12), (2013),2730-2737.
189. El Hafian, M., Benlandini, N., Elyacoubi, H., Zidane, L.,& Rochdi, A"Étude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la préfectured'Agadir-Ida-Outanane(Maroc)".*Journal of Applied Bioscience*.V.81(1), (2014),7198-7213.
190. Alaoui, A.,&Laaribya, S, "Etude ethnobotanique et floristique dans les communes rurales Sehoul et Sidi-Abderrazak(cas de la Maamora-Maroc Septentrional)".*Nature & Technology*, V.17,(2017).
191. OMS, "Série de Rapports techniques", V.965, (2011),254p.
192. Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi, A., & Zidane, L."Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas orientale (région de Moulouya)". *Journal of applied biosciences*, V.78 (1), (2014), 6771-678
193. Benkhniq, O., Akka, F. B., Salhi, S., Fadli, M., Douira, A., & Zidane, L, "Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc)". *J Anim Plant Sci*, V.23, (2014) ,3539-68.
194. Santos, F, "Analyse en Composantes Principales (ACP) : Travaux Pratiques avec le logiciel R".CNRS, UMR 5199 PACEA, (2015).
195. El Yahyaoui, O., Ouaziz, N. A., Sammama, A., Kerroui, S., Bouabid, B., Lrhorfi, L. A.,& Bengueddour, R. (2015)"Etude ethnobotanique: Plantes médicinales commercialisées à la province de Laâyoune; identification et utilisation". *International Journal of Innovation and Applied Studies*, V.12(3), (2015), 533.
196. Jandi, M, "Plantes médicinales en dermatologie et en cosmétologie : Enquete auprès des herboristes de la région de Béni Mellal", thèse de doctorat ; Faculté de Médecine et de Pharmacie, 2017, 99p.
197. Adiletta, G., Liguori, L., Albanese, D., Russo, P., Di Matteo, M., & Crescitelli, A., "Soft-seeded pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties: preliminary characterization and quality changes of minimally processed arils during storage". *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), (2017), 1631-1641.
198. Zarei, M., Azizi, M., & Bashir-Sadr, Z. (2011). Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening. *Fruits*, 66(2), 121-129.
199. Fernandes, R., Berretta, A., Torres, E., Buszinski, A., Fernandes, G., Mendes-Gouvêa, C., ... & Barbosa, D. (2018)., Antimicrobial potential and cytotoxicity of

silver nanoparticles phytosynthesized by pomegranate peel extract. *Antibiotics*, 7(3), 51.

200. Amri, Z., Zaouay, F., Lazreg-Aref, H., Soltana, H., Mneri, A., Mars, M., & Hammami, M., Phytochemical content, Fatty acids composition and antioxidant potential of different pomegranate parts: Comparison between edible and non edible varieties grown in Tunisia. *International journal of biological macromolecules*, 104, (2017). 274-280.
201. Ben-Simhon, Z., Judeinstein, S., Trainin, T., Harel-Beja, R., Bar-Ya'akov, I., Borochoy-Neori, H., & Holland, DA" White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX; ANS) gene. *PLoS One*, 10(11), e0142777.
202. Todaro, A., Cavallaro, R., La Malfa, S., Continella, A., Gentile, A., Fischer, U., & Spagna, G,"Anthocyanin profile and antioxidant activity of freshly squeezed pomegranate (*Punica granatum* L.)juices of sicilian ar anish provenances". *Italian Journal of Food Science*, V.28(3), (2016),464-
203. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R, "Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars", *Scientia Horticulturae*, V. 126(2), (2010),180-185.
204. Radunić, M., Špika, M. J., Ban, S. G., Gadže, J., Díaz-Pérez, J. C., & MacLean, D. (2015). Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food chemistry*, 177, 53-60.
205. Alcaraz-Mármol, F., Nuncio-Jáuregui, N., García-Sánchez, F., Martínez-Nicolás, J. J., & Hernández, F. (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia horticulturae*, 219, 152-160.
206. Adiletta, G., Liguori, L., Albanese, D., Russo, P., Di Matteo, M., & Crescitelli, A., "Soft-seeded pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties: preliminary characterization and quality changes of minimally processed arils during storage". *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), (2017),1631-1641.
207. Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food chemistry*, 80(3), (2003),393-397.
208. Kalaycioğlu, Z., & Erim, F. B. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food chemistry*, 221, (2017), 496-507.
209. Gadže, J., Voća, S., Čmelik, Z., Mustačić, I., Ercisli, S., & Radunić, M. (2013). Physico-chemical characteristics of main pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Dalmatia region of Croatia. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85(2), 202.

210. Mphahlele, R. R., Caleb, O. J., Fawole, O. A., & Opara, U. L., "Effects of different maturity stages and growing locations on changes in chemical, biochemical and aroma volatile composition of 'Wonderful' pomegranate juice", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V. 96(3), (2016), 1002-1009.
211. Todaro, A., Cavallaro, R., La Malfa, S., Continella, A., Gentile, A., Fischer, U., & Spagna, G., "Anthocyanin profile and antioxidant activity of freshly squeezed pomegranate (*Punica granatum* L.) juices of sicilian and spanish provenances". *Italian Journal of Food Science*, V.28(3), (2016), 464-479.
212. Caleb, O.J., Opara, U.L. & Witthuhn, C.R., "Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils: a review", *Food and Bioprocess Technology*, V. 5, (2012), 15-30.
213. Mitchell, J. H., Fukai, S., & Cooper, M. (1996). Influence of phenology on grain yield variation among barley cultivars grown under terminal drought. *Italian Journal of Agricultural Research*, 47(5), 757-774.
214. Basaki, T., Tabatabaei, Z., Faraji, S., & MirEskandari, S. A., "Study and evaluation of floral morphology of the Saveh pomegranates collection", (2012).
215. Parmar C., Kaushal MK Wild fruits of sub-Himalayan region, Kalyani Publ, New Delhi, (1982), 74p.
216. Ismail, T., Akhtar, S., Riaz, M., & Ismail, A. (2014). Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(6), 661-666.
217. Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., & Khodaparast, M. H. H. "Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars". *Food chemistry*, V.115 (4), (2009), 1274-1278.
218. Mditshwa, A., Fawole, O. A., Al-Said, F., Al-Yahyai, R., & Opara, U. L. Phytochemical content, antioxidant capacity and physicochemical properties of pomegranate grown in different microclimates in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 30(2), 8(2013), 1-90.
219. Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., & Ahmad, I., "Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis", *Food chemistry*, V.175, (2015), 575-584.
220. Nuncio-JÁuregul, N., Calín-Sánchez, A., Carbonell-Barrachina, A., "Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage", *Scientia Horticulturae*, V.165, (2014), 181-189.

221. Mansour, E., Ben Khaled, A., Lachiheb, B., Abid, M., Bachar, K., & Ferchichi, A, "Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from Tunisian pomegranate". *Journal of Agricultural Science and Technology*, V.15, (2013),1393-1403.
222. Mashkor, A. L,"Phenolic content and antioxidant activity of fenugreek seeds extract". *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), (2014), 841-844.
223. Haghi, A., Azimi, H., & Rahimi, R. (2017). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of three phytochemicals, curcumin, quercetin, and allicin, in the treatment of gastric cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*, 48(4), 314-320.
224. Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S, " Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction". *Food chemistry*, V.202, (2016). 59-69.
225. Ben-Simhon, Z., Judeinstein, S., Trainin, T., Harel-Beja, R., Bar-Ya'akov, I., Borochoy-Neori, H., & Holland, D, " White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the Leucoanthocyanidin Dioxygenase (LDOX; ANS) gene.
226. Todaro, A., Cavallaro, R., La Malfa, S., Continella, A., Gentile, A., Fischer, U., & Spagna, G,"Anthocyanin profile and antioxidant activity of freshly squeezed pomegranate (*Punica granatum* L.)Juices of sicilian and spanish provenances". *Italian Journal of Food Science*, V.28(3), (2016),464-479
227. Labbe, M., Ulloa, P. A., Lopez, F., Saenz, C., Pena, A., & Salazar, F. N, "Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates ('Wonderful','Chaca'and'Codpa') at different maturity stages". *Chilean journal of agricultural research*, V.76(4), (2016). 479-486.
228. Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 179-185.
229. Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., & Khodaparast, M. H. H. "Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars". *Food chemistry*, V.115 (4), (2009),1274-1278.
230. Mutahar, S., Mutlag, M.S., Najeeb, S.A. et Al-Zoreky, N," Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels",*Food Nut. Sci*,V.3, 2012. 991-996.
231. Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, A. R., & Herceg, Z.,"Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice",*Food chemistry*, 190, (2016),317-323

232. Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., & Chanda, S. V., "Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem", *Food Analytical Methods*, V.5(3), (2012),396-404.
233. Humeida, M. A., & Hobani, A. I. Physical properties of pomegranate fruits. *J. King Saud Univ. Agric. Sci*, 5(2), (1993), 165-175.
234. Zaki, S. A., Abdelatif, S. H., Abdelmohsen, N. R., & Ismail, F. A," Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Pomegranate Peels," *International Journal of Food Engineering*, 1(2), (2015).
235. Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P. G., Glamočlija, J., Ćirić, A., Soković, M., ... & Proestos, C. (2015). Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *Rsc Advances*, 5(4), 2602-2614.
236. Medina, J. R., Underwood, B. S., & Mamlouk, M. Estimation of Asphalt Concrete Modulus Using the Ultrasonic Pulse Velocity Test. *Journal of Transportation Engineering, Part B: Pavements*, 144(2), . (2018)
237. Ardekani MR,S., Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, Gholam N, Moridi T.,"Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate(*Punica granatum* L.) Cultivars",*Iran J Pharm Res*, 10(3), (2011),519-24.
238. Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P., "Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques". *Journal of Food Engineering*, .V 100(1), (2010), 50-55.
239. Eghdami, A., Moghaddasi, M. S., & Sadeghi, F."Determination of antioxidant activity of juice and peel extract of three variety of pomegranate and clinical study". *Advances in Environmental Biology*, (2011),.2282-2288.
240. Orak, H.H., Yagar, H., 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. Biotechnol*,V.21, (2012),373–387.
241. Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayed, N, "Characterization of pomegranate peels tannin extractives", *Industrial crops and Products*, V.40, (2012),239-246.
242. Ali, U and Kumar,P.,"Effect of soxhlet and ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract". *International journal of food and nutritional sciences*, V.3(6), (2014), 265-270.
243. Al-Rawahi, A. S., Rahman, M. S., Guiza. ni, N., & Essa, M.M.,"Chemical composition, water sorption isotherm, and phenolic contents in fresh and dried pomegranate peels",*Drying technology*, V.31(3), (2013). 257-263.

244. Stintzing, F. C., & Carle, R.C., "Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses", *Molecular nutrition & food research*, V.49(2), (2005), 175-194.
245. Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of food science and technology*, 54(9), (2017), 2890-2901.
246. Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(1), V.(2009), 4988-4994.
247. Carniel, N., Filippi, D., Gullich, L. M. D., Bilibio, D., Bender, J. P., & Priamo, W. L., "Recovery of Total Polyphenols from Pomegranate and Butia: A Study of Ultrasound-assisted Extraction and Antioxidant Activity", *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, V.5(3), (2017), 112-117.
248. Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(34), (2016) 6584-6604.
249. Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food chemistry*, 80(3), (2003), 393-397.
250. Konsoula, Z., Comparative Efficacy of Pomegranate Juice, Peel and Seed Extract in the Stabilization of Corn Oil under Accelerated Conditions, *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 10(9), (2016), 556-563.
251. Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1), 143-148.
252. Choi, J. G., Kang, O. H., Lee, Y. S., Chae, H. S., Oh, Y. C., Brice, O. O., ... & Shin, D. W., "In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
253. Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., De Los Mozos-Pascual, M., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O., Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*, V.49, (2013). 150-159.

254. Tabaraki, R., Heidarizadi, E., & Benvidi, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, (2012),16-23.
255. Nainwani, R, "Anti-Inflammatory Activity of Various Fractions of Methanolic Extract of *Punica granatum* rind with its Phytochemical Evaluation", *American Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, V.1(1), (2014), 21-27.
256. Manukumar, H. M., & Thribhuvan, K. R. (2014). In-vitro Evaluation of physicochemical, antioxidant and anti-inflammatory activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and seed hydro extracts. *Int. J. Pharm. Biotech*, 5(1), 131-141.
257. Haroun, B. M., Elghamry, A. A., Abdel-Shakour, E. H., Elmorsy, S. M., & Zahem, Y. H., "Determination of bioactive compounds of *Punica granatum* puniceae and studying its antimicrobial activities against bacteria isolated from El-Manzala water treatment plant", *World Rural Observation*, V.6(1), (2014),79-86.
258. GHARA, Abdollah Ramzani et GHADI, Fereshteh Ezzati. Effect of Extraction Solvent/technique on the Antioxidant activity of Selected 10 herb native species south of Iran. *Advances in BioResearch*, (2016), vol. 7, no 4.
259. Garcia-Larrea, L., & Magnin, M,"Physiopathologie de la douleur neuropathique: revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés", *La Presse Medicale*, V.37(2), (2008),315-340.
260. Riahi, R. C., Tarhouni, S., & Kharrat, R,"Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée", *Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4), (2012),19-28.
261. Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W.,"Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs," *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), (1962), 544-547.
262. Olapour, S., & Najafzadeh, H. "Evaluation Analgesic, Anti-Inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro Alcoholic Peel Extract of" *Punica granatum* (pomegranate)". *Asian Journal of Medical Sciences*, V.2(6), (2010),266-270.
263. Ouachrif, A., Khalki, H., Chaib, S., Mountassir, M., Aboufatima, R., Farouk, L., & Chait, A.,"Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of *Punica granatum*". *Pharmaceutical biology*, V.50(4), (2012),429-438.
264. Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC.,"Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*", *Food Chem.*, V.118, (2010), 315-322.