

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université ABDERRAHMANE MIRA - Béjaïa  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires  
Laboratoire de Biomathématiques, Biochimie, Biophysique et de Scientométrie  
*L3BS*

# Mémoire de Magister

*En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Contrôle de Qualité*

**Option :**

**Contrôle de Qualité des Aliments, Certification et Méthodes de  
Validation**

*Thème*

**Propriétés antioxydantes de deux variétés de  
grenade (*Punica granatum* L.) de la région de  
Béjaïa**

Réalisé par :  
M<sup>r</sup> BOUSSALAH Nouredine

**Membres du Jury :**

**Président :** Dr MADANI Khodir (maître conférence à l'UAMB)

**Directeur de Thèse :** Pr CHIBANE Mohamed (Professeur à l'UAMB)

**Examineur :** Dr MOULAI Riadh (maître conférence à l'UAMB)

Dr TOUATI Abdelaziz (maître conférence à l'UAMB)

**Invitée :** MERZOUK Hafida (Maître Assistante A à l'UAMB)

*Année universitaire 2009-2010*

*Ce mémoire est le fruit de  
personnes qui me sont très  
chères. Je le dédie à toute  
ma famille et à Saida.*

# Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers tous ceux qui m'ont soutenu, encouragé tout au long de cette traversée du désert et m'ont permis de redoubler d'effort et de persévérance.

Je témoigne ma plus grande gratitude à ma famille qui est toujours présente dans les moments difficiles et surtout à mon frère Mourad qui a su m'encourager et redonner confiance dans un moment de confusion et de solitude, me permettant ainsi de prendre les bonnes décisions.

J'adresse mes sincères remerciements à monsieur le Professeur CHIBANE M. et madame MERZOUK H. pour leur encadrement enrichissant, leurs conseils pertinents et surtout leur disponibilité tout au long de cette initiation à la recherche scientifique.

Je remercie profondément monsieur le D<sup>f</sup> MADANI K., Directeur du laboratoire 3BS, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de la soutenance.

Mes sincères considérations vont également à monsieur le D<sup>f</sup> MOULAI R. et monsieur le D<sup>f</sup> TOUATI A. qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire qui m'ont beaucoup aidé : AKKOUCHE Z., BACHIR BEY M., BOUDRIAS H., BOUKHALEFA F., BOUSSAIDE S., CHENNIT B., LADJOUZI R., LAHOUCHE R., SLIMANI S., BADER W. ainsi que tous les ingénieurs d'application de la faculté des sciences de la nature et de la vie et tout spécialement M<sup>elle</sup> AKLIL N. et M<sup>elle</sup> DIB S.

Je n'oublierai surtout pas de remercier mes amis et collègues : Ramadan, Mahmoud, Zahir, Malik, Mourad, Hadi et toute l'équipe « B ».

## Liste des abréviations

**ACE** : Angiotensin-Converting Enzyme.

**Ac.Asc** : Acide Ascorbique.

**Ac.G** : Acide Gallique.

**ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique.

**AOAC** : Associate of Official Analytical Chemists.

**AT** : Acidité Titrable.

**ARN** : Acide Ribo Nucléique.

**BSA** : Bovine Sérum Albumine.

**Cy-3-Glu** : Cyanidine-3-Glucoside.

**DPPH** : 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**ERO** : Espèces Réactives Oxygénées.

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography.

**IC<sub>50</sub>** : Concentration à 50 % d'Inhibition.

**LDL** : Low Density Lipoprotein.

**mgEAA** : milligramme Equivalent Acide Ascorbique.

**mgEAT** : milligramme Equivalent Acide Tannique.

**mgEQ** : milligramme Equivalent Quercétine.

**mgEAG** : milligramme Equivalent Acide Gallique.

**MS** : Matière Sèche.

**PSA** : Prostate Spécifique Antigène.

**PC-3** : Prostate Cancer-3 (lignée cellulaire du cancer de la prostate).

**SDS** : Dodécyl Sulfate de Sodium (Sodium Dodecyl Sulfate).

**TEA** : TriEthanolAmine.

**tpm** : tours par minute.

## Liste des figures

Fig. N°1 : Image des fleurs et feuilles d'un grenadier .....	4
Fig. N°2 : Images de quelques cultivars de grenade .....	6
Fig. N°3 : Structure de composés spécifique à la grenade .....	12
Fig. N°4 : Maladies traitées par <i>Punica granatum</i> L. ....	16
Fig. N°5 : Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques .....	22
Fig. N°6 : Structure des acides benzoïques .....	23
Fig. N°7 : Structures de quelques acides cinnamiques .....	24
Fig. N°8 : Quelques exemples de coumarines .....	24
Fig. N°9 : Structure de quelques stilbènes .....	25
Fig. N°10 : Structure de base des tannins hydrolysable .....	26
Fig. N°11 : Dérivation de l'ellagitannin par accouplement oxydatif .....	26
Fig. N°12 : Structures de base des flavonoïdes .....	27
Fig. N°13 : Structures de base des principaux flavonoïdes .....	28
Fig. N°14 : Structures de quelques flavonoïdes .....	29
Fig. N°15 : Structure des anthocyanidines les plus rencontrées dans la nature .....	31
Fig. N°16 : Structure des tannins condensés .....	31
Fig. N°17 : Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes .....	33

Fig. N°18 : Sites de chélation des métaux par les flavonoïdes .....	33
Fig. N° 19 : Coupe longitudinale d'une grenade .....	36
Fig. N°20 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par l'eau distillée .....	41
Fig. N°21 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par solvants hydroalcooliques .....	42
Fig. N°23 : Forme libre et réduite du DPPH .....	45
Fig. N°24 : Teneur en eau et matière sèche des graines et écorces de deux variétés de grenade	48
Fig. N°25 : Hauteur axiale / Diamètre équatorial des fruits des deux variétés de grenade .....	50
Fig. N°26 : Teneur en anthocyanines du jus de deux variétés de grenade .....	53
Fig. N°27 : Teneur en polyphénols totaux des extraits des graines de grenades par rapport au solvant d'extraction .....	57
Fig. N°28 : Teneur en polyphénols totaux des extraits des écorces de grenades par rapport au solvant d'extraction .....	58
Fig. N°29 : Teneur en polyphénols totaux des extraits acétoniques (20, 50 et 80%) des graines de grenade .....	59
Fig. N°30 : Teneur en polyphénols totaux des extraits acétoniques (20, 50 et 80%) des écorces de grenade .....	60
Fig. N°31 : Teneur en polyphénols totaux des extraits acétonique de deux variétés de grenade .....	61
Fig. N°32 : Teneur en flavonoïdes des graines et écorces de deux variétés de grenade .....	63
Fig. N°33: Teneur en tannins des écorces de deux variétés de grenade .....	64
Fig. N°34 : Pouvoir réducteur des extraits de graines de deux variétés de grenade .....	65

Fig. N°35 : Pouvoir réducteur des extraits d'écorces de deux variétés de grenade .....	66
Fig. N°36 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et l'acide gallique .....	67
Fig. N°37: Concentrations d'extraits et standards ayant une absorbance de 0,7 à 700 nm .....	67
Fig. N°38 : Activité antiradicalaire des extraits de graines de grenade .....	68
Fig. N°39 : Activité antiradicalaire des extraits d'écorces de grenade .....	69
Fig. N°40 : Activité antiradicalaire de l'acide gallique et l'acide ascorbique .....	69
Fig. N°41 : IC <sub>50</sub> des extraits de deux variétés de grenade et de deux standards .....	70
Fig. N°42 : Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate des extraits acétonique de deux variétés de grenade .....	72



## Liste des tableaux

Tableau I : Classification de la grenade .....	5
Tableau II : Cultivars décrits dans la littérature et leurs caractéristiques .....	7
Tableau III : Quelques composés phytochimiques de <i>Punica granatum</i> L. ....	11
Tableau IV : Composition en éléments nutritionnels des graines de grenade .....	15
Tableau V : Structures de quelques acides benzoïques .....	22
Tableau VI : Caractéristiques des grenades de la variété <i>Lahlou</i> et <i>Quares</i> .....	34
Tableau VII : Polarités des solvants d'extraction .....	39
Tableau VIII : Caractéristiques morphologiques des fruits de deux variétés de grenade .....	49
Tableau IX : Caractéristiques physico-chimiques du jus de deux variétés de grenade .....	50

# Sommaire

Introduction .....	1
--------------------	---

---

## Synthèse bibliographique

---

### CHAPITRE I : La grenade : généralités, composition et effets thérapeutiques

1. Historique de la grenade .....	3
1.1. Origine du nom .....	3
2. Description botanique .....	3
2.1. Taxonomie et classification .....	4
2.2. Cultivars .....	4
3. Facteurs écologiques liés à la culture du grenadier .....	9
3.1. Climat .....	9
3.2. Sol .....	9
3.3. Irrigation .....	9
3.4. Pestes et ravageurs .....	9
4. Composition phytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier .....	10
4.1. Graine .....	10
4.2. Ecorce du fruit .....	12
4.3. Feuille .....	12
4.4. Fleur .....	12
4.5. Racine et écorce de l'arbre .....	12
5. Les différentes utilisations de la grenade .....	13
5.1. Utilisation alimentaire .....	13

5.2. Utilisation industrielle .....	13
5.3. Utilisation médicinale .....	13
5.4. Autres utilisations .....	14
6. Etudes récentes et effets thérapeutiques .....	14
6.1. Maladie cardiovasculaire .....	14
6.2. Effet anticancéreux .....	17
6.3. Effet sur la qualité du sperme .....	18
6.4. Effet protecteur neurologique .....	18
6.5. Effet antimicrobien .....	19
6.6. Effet antvieillessement .....	19
7. Toxicité de la grenade .....	19

## CHAPITRE II : Les composés phénoliques, structures, classification et propriétés

1. Les composés phénoliques .....	20
2. Biosynthèse des composés phénoliques .....	21
3. Structures et classifications des composés phénoliques .....	21
3.1. Les non-flavonoïdes .....	23
3.2. Les flavonoïdes .....	26
4. Propriétés des composés phénoliques .....	32
4.1. Propriétés physicochimiques .....	32
4.2. Propriétés biologiques .....	32

---

## Partie pratique

---

### Matériel et méthodes

1. Récolte des échantillons .....	34
2. Traitement des échantillons .....	34
3. Caractéristiques morphologiques des fruits .....	35
4. Test d'humidité .....	35
5. Caractéristiques physico-chimiques du jus de grenade .....	37
5.1 Calcul du rendement en jus .....	37
5.2 Détermination du pH, acidité titrable et de la teneur totale en solides solubles .....	37
6. Dosage des anthocyanines du jus .....	37
7. Extraction des composés phénoliques .....	38
8. Dosage des composés phénoliques totaux .....	40
8.1 Dosage des phénols totaux .....	40
8.2 Dosage des flavonoïdes .....	43
8.3 Dosage des tannins .....	43
9. Détermination de l'activité antioxydante .....	44
9.1 Pouvoir réducteur .....	44
9.2 Activité antiradicalaire par la méthode du DPPH .....	45
9.3 Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate .....	46
10 Analyses statistiques .....	47

## Résultats et discussion

1. Taux d'humidité .....	48
2. Etude morphologique des fruits .....	48
3. Caractéristiques physico-chimiques du jus de grenade .....	50
4. Les anthocyanines du jus de grenade .....	52
5. Extraction des composés phénoliques.....	54
5.1. Taille des particules .....	54
5.2. Temps d'extraction .....	55
5.3. Nombre d'extractions .....	55
5.4. Choix du solvant d'extraction .....	55
6. Dosage des composés phénoliques de l'extrait final .....	61
6.1. Les phénols totaux .....	61
6.2. Les flavonoïdes .....	63
6.3. Les tannins .....	64
7. Activité antioxydante .....	65
7.1. Le pouvoir réducteur .....	65
7.2. Activité antiradicalaire par la méthode du DPPH .....	68
7.3. Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate .....	71
Conclusion .....	73

## Références bibliographiques

## Annexes

---

# INTRODUCTION

---

L'humanité a connu en ces derniers siècles des progrès si révolutionnaires qu'ils paraissent surpasser tous ceux accomplis au cours des millénaires précédents. L'éradication de plusieurs maladies infectieuses et l'abondance des denrées alimentaires tout au long de l'année a permis d'augmenter l'espérance de vie des êtres humains.

Après une longue période d'euphorie, une prise de conscience a eu lieu durant ces dernières décennies, les anciens fléaux maîtrisés sont remplacés par un grand nombre de cancers, de maladies cardiovasculaires, de diabète, d'obésité, d'allergie, de maladies virales (VIH), ... etc. Les scientifiques et chercheurs explorent de nouvelles pistes à la recherche de nouvelles molécules économiques et aux vertus curatives.

C'est dans ce contexte actuel que nous nous sommes tournés vers l'étude de l'un des plus anciens fruits comestibles (Seeram *et al.*, 2006 ; Çam *et al.*, 2009), vénéré, sacralisé puis oublié. La grenade (*Punica granatum* L.) est considérée comme un symbole de beauté, de fertilité, d'immortalité et de divinité. Originnaire du moyen orient, elle s'est propagée à travers la Méditerranée vers l'extrême orient en Chine et en Inde et dans le nouveau monde en Californie et au Mexique (Lansky et Newman, 2007).

L'histoire de la grenade est liée au développement de l'humanité d'une manière impressionnante. La grenade a une place importante dans le Judaïsme, le Christianisme, l'Islam, ... (Lansky et Newman, 2007).

La grenade a une grande valeur nutritionnelle, c'est une source importante en minéraux, vitamines et en composés bioactifs. Elle a été employée dans la médecine traditionnelle, historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. La plupart des parties du fruit sont connues pour leur important potentiel antioxydant, il ya une liste impressionnante de cibles potentielles de maladies comme les

maladies coronariennes, des cancers (peau, sein, prostate et du colon), l'inflammation, l'hyperlipidémie, le diabète, les troubles cardiaques, les troubles hormonaux, l'hypoxie, l'ischémie, le vieillissement, les troubles neurologiques et le SIDA, où les effets thérapeutiques de la grenade ont été démontrés par des études *in vitro* ou *in vivo* (Seeram *et al.*, 2006 ; Lansky et Newman, 2007).

L'analyse chimique (l'isolement, l'identification, et l'élucidation structurale) de ses composés est d'une grande importance pour l'évaluation de leurs effets potentiels sur la santé humaine (Seeram *et al.*, 2006 ; Naveena *et al.*, 2008).

La présente étude a pour objectif principal le dosage des antioxydants de deux variétés de grenade de la région de Bejaia *Lahlou* et *Quares* et l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

Notre travail est scindé en deux parties : la première partie est une synthèse bibliographique donnant des généralités sur la grenade, sa composition phytochimique et ses utilisations thérapeutiques, ainsi qu'un aperçu sur les composés phénoliques, leur classification et leurs propriétés. La deuxième partie regroupe les différents aspects pratiques de notre étude, les résultats obtenus et leurs discussions.



---

**PARTIE**  
**THEORIQUE**

---

# **CHAPITRE I**

**La grenade : généralités,  
composition et effets thérapeutiques**

## 1. Historique de la grenade

La grenade est l'un des plus anciens fruits comestibles, qui n'a pas trop évolué, depuis la découverte de l'agriculture il y a plus de 1000 ans (Seeram *et al.*, 2006 ; Çam *et al.*, 2009).

Originaire du moyen orient, il s'est propagé à travers la mer méditerranéenne, vers l'extrême orient en Chine et en Inde et dans le nouveau monde en Californie et Mexique (Lansky et Newman, 2007).

L'histoire de la grenade est liée au développement de l'humanité d'une manière impressionnante. La grenade a une place importante dans le Judaïsme, le Christianisme, l'islam, le Bouddhisme et le Zoroastrianism (Lansky et Newman, 2007). Il est dit qu'elle avait 613 graines qui représentent les 613 commandements de la Torah, même si cela n'a pas été confirmé dans les temps modernes (Hebert, 2006).

Aimé des caravaniers et navigateurs, sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permet d'étancher la soif durant les longues traversées (Vanier, 2005). Elle est le symbole de la vie, fertilité, longévité, immortalité et divinité (Amjad, 2005 ; Lansky et Newman, 2007).

### 1.1. Origine du nom

La grenade était connue chez les romains sous l'appellation *Malum punicum* par allusion à l'ancienne Phénicie et qui signifie pomme de Carthage, d'où est tiré l'actuel nom latin « *Punica granatum* » (Goor, 1967 ; Hubbard et Clay, 1977).

Le terme grenade a fait son apparition dans la langue française en 1314. Il vient du latin « *Malum granatum* » dont la signification est « fruit à petits grains » (Hubbard et Clay, 1977).

Elle porte aussi l'appellation *rimon*, *ruman*, *romana* et *roma*, en Hébreux, Arabe, Espagnol et Portugais respectivement (Goor, 1967).

## 2. Description botanique

La grenade est le fruit du grenadier qui est un petit arbre ou un grand arbuste (2 à 7 m de hauteur). Le tronc est recouvert d'une mince écorce grise ; se ramifie irrégulièrement en branches plus ou moins épineuses et hérissées, portant des feuilles caduques et lancéolées en spires (figure N°1) (Boullard, 1997 ; Iserin, 2001).

Les fleurs écarlates rouges, pourpres ou grenats sont solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de 2 ou 3. Le calice est formé de 4 à 8 sépales, la corolle comprend 4 à



**Fig. N°1 : Image des fleurs et feuilles d'un grenadier.**

8 pétales, les étamines sont nombreuses et le gynécé est formé de 8 à 9 carpelles soudées au tube du calice (Sheets *et al.*, 1994).

Le grenadier est considéré comme une espèce monoïque et développe (sur le même arbre) deux sortes de fleurs : des fleurs mâles (stérile) en « cloche », et des fleurs hermaphrodites (fertile) en forme de « vase » (Derin et Eti, 2001). La dominance revient généralement aux fleurs mâles avec un taux de 60 à 70 % (Oukabli, 2004).

Le fruit, globuleux à peau épaisse, de 15 à 20 cm de diamètre, d'une couleur jaune à un rouge grenat, avec un calice persistant (figure N°2) (Sheets *et al.*, 1994). C'est une baie renfermant de nombreuses graines recouvertes de pulpe rouge acidulée et sucrée, constitue la partie comestible de la Grenade (Iserin, 2001 ; Fabre et Ermosilla, 2008)

## 2.1. Taxonomie et classification

*Punica granatum* partage sa famille botanique, *Punicaceae*, avec *Punica protopunica*, une espèce endémique de l'île Yéménite de Socotra (Lansky et Newman, 2007). Cependant les récentes études moléculaires, recommande la classification de ce genre dans la famille des *Lythraceae* (tableau I) (Spichiger *et al.*, 2002 ; Walter *et al.*, 2002 ; Stover et Mercure, 2007).

## 2.2. Variétés

IL existe plus de 1000 varétés de *Punica granatum* (Lansky et Newman, 2007). Les critères les plus utilisés pour les distinguer sont la taille du fruit, la couleur de l'écorce, la couleur des graines, la dureté des pépins, la teneur en jus, acidité et astringence et la période de maturation (Stover et Mercure, 2007).

Le cultivar « *Wonderful* » est le plus commercialisé aux Etats Unis. Découvert en Floride en 1896, il est largement cultivé en Californie (Lansky et Newman, 2007 ; Stover et

Mercure, 2007). Caractérisé par une couleur rouge intense de l'écorce et des graines (Morton, 1987).

**Tableau I : Classification de la grenade (Anonyme, 2010)**

Règne	<i>Plantae</i> – Plantes
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i> – Plantes vasculaires
Super-division	<i>Spermatophyta</i> – Plantes à graines
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Plantes à Fleurs
Classe	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotylédones
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Lythraceae</i>
Genre	<i>Punica</i> L.
Espèce	<i>Punica granatum</i> L.

*Gordo de Jativa*, d'origine espagnole, elle arrive à maturité en fin septembre (figure N°2). Son rendement est moyen. Ses fruits ont un calibre moyen à gros (325 g) avec une couleur jaune orange de l'épiderme. Elle se caractérise par une peau très fine (2 mm). Les graines sont tendres, de poids moyen de 0.5 g, roses et sucrées (°Brix de 14 et acidité de 0,32 g/100 g de jus) (Oukabli, 2004).

En Inde *Bedana* et *Kandhari* sont très appréciés. Le fruit de « *Bedana* » moyen à grand avec une écorce marron. Des graines grenat ou rose claire, sucrée, et des pépins tendres. « *Kandhari* » donne un fruit large avec une couleur rouge foncée, des grains d'un rose intense ou rouge sang, un peu acidulé avec de pépins durs (Morton, 1987).

*Zhéri* est une variété qui fleurit en fin avril et arrive à maturité entre fin septembre et mi-octobre. Cette variété est constituée de deux clones: *Zhéri précoce* et *Zhéri tardif* qui ont un décalage de maturité d'environ deux semaines. Les baies de couleur jaune-orange et

calibre moyen de 300 à 350 g. Les graines sont tendres et de poids moyen de 0,4 à 0,5 g. Leur couleur est rose pour *Zhéri* précoce et blanche pour *Zhéri* d'automne. Elles sont juteuses et très sucrées (Oukabli, 2004).

La floraison de *Sefri* débute la première semaine de mai et s'étale sur un mois. Sa maturité se situe en début octobre et donne des fruits de gros calibre (500 g) de couleur jaune avec une pulpe assez épaisse (6 mm). Les graines sont de couleur rose-claire, demi-tendres, juteuses et très sucrées avec un degré Brix de 14 et une acidité de 0,24 g/100g de jus. Ce génotype semble être polyclonal.

*Djeibi*, cette variété fleurit début mai et mûrit à partir de la mi-octobre. Le calibre des baies est moyen à gros (350 g) avec un épiderme de couleur jaunâtre. Les graines ont un poids de 0,4 g, demi-tendres, rose-claires et très sucrées (16 °Brix, acidité: 0,2 g/100 g de jus) (Oukabli, 2004).

Il existe peu d'information concernant les variétés cultivées en dehors de l'Europe et des Etats Unis. Telles que « *Ahmar* », « *Aswad* » et « *Holwa* » cultivées en Irak, « *Loufani* » et « *Ras el Baghl* » de Palestine et Israël (Stover et Mercure, 2007).



Fig. N°2 : Images de quelques cultivars de grenade (Oukabli, 2004)

Tableau II: Variétés décrits dans la littérature et leurs caractéristiques (Stover et Mercure, 2007).

Variétés	Poids du fruit	Caractéristiques	Origine
<i>Agridulce de Ojós</i>	524	Graines rouges, pépins durs, amers/sucrées, acidité moyenne	Espagne
<i>Alandi (or Vadki)</i>	/	Graines avec un roses intense, pépins très durs, aigres/sucrées	Inde
<i>Asinar</i>	505	Fruit grand, graines rouges, pépins tendre, sucrées/aigres	Turquie
<i>Bedana</i>	/	Fruit moyen à grand, marron, graines rose-blanches, pépins tendre, sucrées	Inde
<i>Borde de Albaterra</i>	370	Graines rouges intense avec pépins durs, aigres, acidité élevée	Espagne
<i>Dholka</i>	/	Grand fruit, écorce rouge-jaune, graines blanche avec pépins durs, sucrées	Inde
<i>Djeibi*</i>	350	Ecorce jaunâtre, graines rose-claires, pépins demi-tendres, très sucrées	Maroc
<i>Early Foothill</i>	/	Graines rouges intense, pépins moyen/très durs, sucrées/aigres	USA, 2-4 semaines plus tôt que « Wonderful »
<i>Early Wonderful</i>	/	Graines rouges intense, pépins moyen/très durs, sucrées/aigres	USA, 2-4 semaines plus tôt que « Wonderful »
<i>Eksilik</i>	/	Graines rouges et aigres (5% AT)	Turquie
<i>Emar</i>	/	Ecorce rouge sombre, graines rouges, sucrées à faible acidité	Turquie
<i>Eversweet</i>	/	Fruit rouge à rose, graines roses, pépins tendres, sucrées même immature	USA
<i>Fellahyemez</i>	/	Graines roses et grandes, sucrées à faible AT, pépins tendres	Turquie

<i>Ganesh</i>	/	Ecorce jaune-rose, graines rouge-roses, pépins très tendres, sucrées/aigres	Inde
<i>Golden Globe</i>	Poids très élevé	Fruit Vert doré avec rougeur rose, graines roses à rouges, pépins dur et petits, sucrées	USA
<i>Gordo de Jativa*</i>	325	Fruit jaune orange, graines roses, pépins tendres, sucrées	Espagne
<i>Granada</i>	/	Graines rouges intenses, pépins moyens/ durs, sucrées/aigres	USA, rouge, 1 mois avant « Wonderful »
<i>Hicaznar</i>	/	Ecorce rouge sombre, graines rouges, sucrées/aigres	Turquie
<i>Kandhari (also called Arakta)</i>	/	Fruit grand rouge intense, graines roses foncées à rouges sang pépins moyens / durs, sucrées/aigres	Inde
<i>Katirbasi</i>	517	Fruit grand, grande graines rouges, sucrées/aigres	Turquie
<i>Mollar de Elche 15</i>	272	graines rouges foncées, sucrées, à faible AT, pépins tendres	Espagne
<i>Mollar de Orihuela</i>	414	graines roses rouges, sucrées, à faible AT, pépins tendres	Espagne
<i>Piñón Tierno de Ojós 9</i>	405	graines roses rouges, sucrées, à faible AT, pépins tendres	Espagne
<i>Sefri*</i>	500	Ecorce jaune, graines rose-claires, pépins demi-tendres, juteuses et très sucrées	Maroc
<i>Valenciana</i>	/	Fruit petit, précoce, mais de mauvaise qualité	Espagne
<i>Wonderful</i>	/	Graines rouges foncées, pépins moyennement dur (ou moyennement tender), sucrées/aigres	USA
<i>Zhéri*</i>	300 à 350	Fruit moyen, couleur jaune-orange, graines roses à blanches, pépins tendres, sucrées.	Maroc

\*Oukabli, 2004.



Les grenades sont aussi classées en trois groupes variétaux selon leurs caractéristiques sensorielles et leur teneur en sucre et acide : sucrées, aigres-sucrées et aigres (Martinez *et al.*, 2006)

### **3. Facteurs écologiques liés à la culture du grenadier**

#### **3.1. Climat**

La culture du grenadier est essentiellement limitée à un climat semi-aride, légèrement tempéré et subtropical. Il s'adapte naturellement à des régions avec des étés chauds et des hivers froids, comme les pays méditerranéens, l'Afghanistan, l'Iran et les Etats Unis (Californie) (Ozgen *et al.*, 2008). Cette espèce peut supporter des températures extrêmes allant de -10 et + 40°C (Oukabli, 2004). Le fruit est récolté en automne, à maturation (Iserin, 2001).

#### **3.2. Sol**

Le grenadier s'adapte à plusieurs types de sol allant du sable pure à l'argile lourde. Il donne de meilleurs résultats en sol d'alluvions profond avec des disponibilités en eaux satisfaisantes ainsi que sur du limon lourd bien irrigué (Oukabli, 2004). Sa croissance optimale est obtenue sur des sols assez lourds et humides à pH de 5,5-7,0. Les sols alcalins donnent de faibles rendements (Sheets *et al.*, 1994).

#### **3.3. Irrigation**

Les besoins en eau du grenadier sont pratiquement les mêmes que pour les agrumes - 125 à 150 cm par an. Les arbres doivent être irrigués tous les 7-10 jours en l'absence de précipitations significatives. Le maintien d'une humidité suffisante du sol, en fin d'été et début d'automne est nécessaire pour réduire le fractionnement potentiel des fruits (Sheets *et al.*, 1994).

#### **3.4. Pestes et ravageurs**

La maladie la plus destructrice observée sur les arbres en Floride provoque des taches sur les feuilles et les fruits. Les feuilles infectées sont d'un vert pâle et tombent prématurément. Les fruits infectés sont petits, avec des taches brunes foncées. Au moins trois pulvérisations de fongicides de cuivre neutre par an sont nécessaires (Sheets *et al.*, 1994).

*Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) : ce microlépidoptère est considéré comme le plus grand ennemi des grenades et arrive à causer des dégâts considérables pouvant affecter 90% des fruits. Les traitements chimiques n'ont pas donné grande satisfaction. L'ensachage localisé des fruits s'est montré assez efficace mais peu pratique.

*Zeuzère (Zeuzera pyrina L.)* : à l'état de larve, cet insecte creuse des galeries sur le tronc et les grosses branches pouvant provoquer leur cassure (Mars, 1995).

Le papillon de grenade, *Virachola isocrates*, pond ses œufs sur les fleurs et sur le calice des fruits en développement ; après quelques jours, les chenilles pénètrent les fruits en passant par le calice. Ces foreurs de fruits peuvent causer la perte d'une récolte entière.

Des moisissures et champignons infectent les fruits et les dégradent, surtout lors de pluies abondantes au cours de la maturation du fruit, tels que : *Pleuroplaconema*, *Ceuthospora Phyllosticta* et *Aspergillus castaneus*. Les fruits fissurés ou éclatés sont les plus touchés (Morton, 1987).

#### **4. Composition phytochimique du fruit, feuille, fleur, racine et écorce du grenadier**

##### **4.1. Graine**

###### **4.1.1. Pépin**

Les pépins de grenade contiennent 12 à 20% de matière grasse par rapport au poids de la graine, avec une prédominance des acides gras insaturés conjugués avec une teneur de 31,8–86,6 % d'un acide gras très rare l'acide punique (cis 9, trans 11, cis 13) qui est un isomère de l'acide linoléique (figure N°3), 0,7–24,4 % acide linoléique, 0,4–17,7 % oléique, 2,8–16,7 % stéarique et 0,3–9,9 % palmitique. 95 % des acides gras sont sous forme estérifié, dont 99 % de triacylglycérols (Meerts *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2002). Ils contiennent des constituants mineurs de l'huile incluent les stérols et les stéroïdes sexuels (Lansky et Newman, 2007) dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels) du règne végétal (Kim *et al.*, 2002).

###### **4.1.2. Pulpe (Jus)**

Le jus de grenade a un pouvoir antioxydant trois fois supérieur au thé vert et vin rouge. Il est riche en vitamine : vitamine C, vitamine E et  $\beta$ -carotène, et en polyphénols : catéchine, acide éllagique, acide gallique et éllagitannins (Okonogi *et al.*, 2007 ; Çam *et al.*, 2009) ; c'est une source importante en anthocyanines : 3-glucoside et 3,5-diglucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine (annexe 2), antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui confèrent sa couleur éclatante, qui augmente en intensité au cours de la maturation (Gil *et al.*, 2000 ; Lansky et Newman, 2007). Ainsi que de l'acide citrique et malique et l'acide ascorbique (Gil *et al.*, 2000).

Le jus contient des minéraux tels que Fe qui est relativement fréquent, Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Sc, Se, Sn, Sr, et Zn (Lansky et Newman, 2007).

**Tableau III : Quelques composés phytochimiques de *Punica granatum* L.  
(Lansky *et al.*, 2005 ; Lansky et Newman, 2007).**

Nom du composé	Classe chimique	Localisation dans la plante
Acide citrique	Acide organique	Pulpe (jus)
Acide malique	Acide organique	Pulpe (jus)
Acide tartrique	Acide organique	Pulpe (jus)
Acide gallique	Acide hydroxybenzoïque	Pulpe, écorce, fleur
Acide caféique	Acide hydroxybenzoïque	Pulpe, écorce
Acide quinique	Acide cyclitol carboxylique	Pulpe, écorce
Acide <i>p</i> -coumarique	Acide hydroxycoumarique	Pulpe, écorce
Catéchine	Flavan-3-ols	Pulpe, écorce
Epicatéchiné	Flavan-3-ols	Pulpe, écorce
Quercétine	Flavonol	Pulpe, écorce
Kaempferol	Flavonol	Écorce
Rutine	Flavonol	Pulpe, écorce
Luteoline	Flavone	Ecorce
Apigénine	Flavone	Feuille
Naringine	Flavanone	Écorce
Delphinidine	Anthocyanidine	Écorce
Cyanidine	Anthocyanidine	Écorce
Pelargonidine	Anthocyanidine	Écorce
Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Cyanidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Delphinidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Pelargonidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	Pulpe
Acide éllagique	Ellagitannin	Pulpe, écorce, Feuille
<b>Punicalagin</b>	Ellagitannin	Écorce, Feuille, tronc,
<b>Punicalin</b>	Ellagitannin	racine
<b>Acide punicoïque</b>	Acide gras insaturé conjugué	Pépin
Acide linoléique	Acide gras insaturé non-conjugué	Pépin
Acide oléique	Acide gras insaturé non-conjugué	Pépin
Acide palmitique	Acide gras saturé	Pépin
Acide stéarique	Acide gras saturé	Pépin
Cholestérol	Stérol	Pépin
Campestérol	Stérol	Pépin
Stigmastérol	Stérol	Pépin
$\beta$ -sitostérol	Stérol	Pépin
<b>17- <math>\alpha</math>-estradiol</b>	Stéroïde sexuel	Pépin
<b>Estriol</b>	Stéroïde sexuel	Pépin
<b>Estrone</b>	Stéroïde sexuel	Pépin
Testostérone	Stéroïde sexuel	Pépin
$\gamma$ -tocophérol	Tocophérol	Pépin
Coumestrol	Coumestan	Pépin
Pelletiérine	alcaloïde	Tronc, racine

## 4.2. Ecorce du fruit

L'écorce du fruit est très riche en flavonoïdes et en tanins (Lansky et Newman, 2007). Il contient environ 25 % d'ellagitanins (Fabre et Ermosilla, 2008) et des flavonoïdes tels que : lutéoline, quercétine, et kaempferol. Punicalagin et punicalin (figure N°3) sont des ellagitanins spécifiques à la grenade (Seeram *et al.*, 2006). L'écorce contient aussi des polysaccharides complexes partiellement caractérisés (Jahfar *et al.*, 2003). La présence d'alcaloïdes (par exemple, Pelletierine : annexe 2) dans l'écorce est équivoque, positive par le test Dragendorff, mais négative par le test Mayer (Vidal *et al.*, 2003).

## 4.3. Feuille

Les Feuilles contiennent les mêmes polyphénols que l'écorce. Elles contiennent aussi des glycosides de l'apigénine, une flavone avec des propriétés progestiniques et anxiolytiques.

## 4.4. Fleur

La composition chimique des fleurs est identique à celle de l'écorce, mais elle n'est pas complètement élucidée. Des études sont en cours afin de déterminer leur effet thérapeutique (Lansky et Newman, 2007).

## 4.5. Racine et écorce de l'arbre

Les extraits préparés à partir des racines et écorce de l'arbre ont de puissants effets physiologiques. Leur composition chimique se distingue des autres parties de l'arbre par de forte concentration en alcaloïdes (Lansky et Newman, 2007).

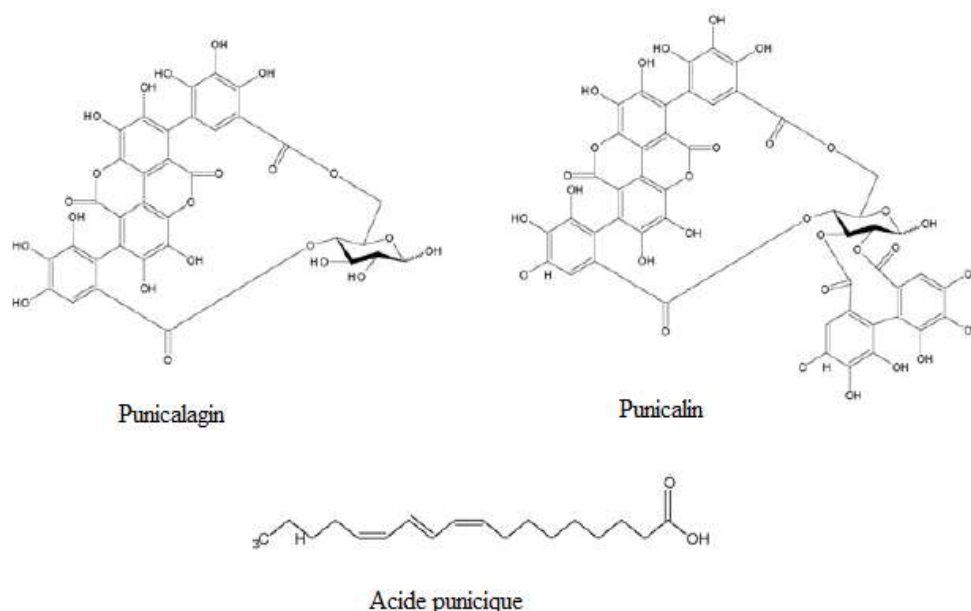


Fig. N°3 : Structure de composés spécifique à la grenade (Lansky et Newman, 2007)

## **5. Les différentes utilisations de la grenade**

### **5.1. Utilisation alimentaire**

La partie comestible de la grenade constitue environ 52% du poids du fruit (Abbasi *et al.*, 2008). Les grenades sont consommées de préférence fraîches ou en jus de grenadine rafraîchissant (Oukabli, 2004). La teneur en jus se situe autour de 35 à 50 ml/100 g de graines. C'est un fruit riche en vitamine C et en éléments minéraux (tableau IV) (Oukabli, 2004). Dans certains pays, comme l'Iran, le jus de grenade est une boisson très populaire (Morton, 1987).

### **5.2. Utilisation industrielle**

#### **5.2.1. Tannage du cuir**

Toutes les parties de l'arbre ont été utilisées comme sources de tannins lors du tannage des peaux. L'écorce du tronc contient 10 à 25% de tanins et était autrefois très utilisée dans la production du cuir au Maroc. L'écorce des racines contient 28% de tanins, les feuilles 11%, et l'écorce du fruit 26%. (Lloyd, 1897 ; Morton, 1987).

#### **5.2.2. Teinture et colorant**

L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile. L'écorce de la grenade, a été utilisée en Inde comme une teinture depuis les temps les plus anciens (Lloyd, 1897 ; Morton, 1987). De l'encre a été produit à partir des feuilles en les macérant dans du vinaigre (Morton, 1987).

### **5.3. Utilisation médicinale**

Le grenadier, qui dit-on a fleuri dans le Jardin d'Eden, a été largement utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures (Lansky *et al.*, 2000). La grenade est considérée comme un fruit complet dans le Coran. L'ancienne science médicinale indienne Ayurveda la identifiée comme une plante médicinale. (Kulkarni *et al.*, 2004)

Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge ou agent ténicide, tueur et expulseur des vers intestinaux. Les alcaloïdes contenus dans les racines, l'écorce de l'arbre et l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion (Lansky *et al.*, 2000).

L'écorce de grenade, les racines et les feuilles ont été utilisées en décoction pour traiter les diarrhées, les troubles digestifs et stopper les hémorragies. Les fleurs séchées sont utilisées pour guérir les bronchites et les inflammations buccales (Stover et Mercure, 2007).

D'autres utilisations ont été mentionnées dans la littérature : empêcher la fécondation et avorter, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et des brûlures (Lansky *et al.*, 2000).

#### **5.4. Autres utilisations**

Au Japon, un insecticide est dérivé de l'écorce de l'arbre.

Le bois de couleur jaune pâle est très dur. Cependant, étant disponible uniquement en petits morceaux, il est utilisé pour la confection de cannes (Morton, 1987).

Les études récentes ont démontrées l'effet thérapeutique de quelques unes de ces utilisations (Stover et Mercure, 2007).

### **6. Etudes récentes et effets thérapeutiques**

#### **6.1. Maladie cardiovasculaire**

L'athérosclérose est la cause majeure de mortalité dans le monde occidental. Sa pathogénécité est due à plusieurs interactions complexes entre les cellules des parois artérielles, les cellules sanguines et les lipoprotéines du plasma. Elle est le résultat de multiples facteurs de risques interactifs, y compris l'hypertension, l'activation des plaquettes sanguines, augmentation des concentrations de cholestérol LDL, et des modifications oxydatives des LDL. La consommation de grenade affecte ces facteurs et agit sur la maladie (Fuhrman *et Aviram*, 2006).

##### **6.1.1. Effet hypotenseur**

La grenade est très connue pour l'abaissement de la tension artérielle (Ranade *et al.*, 2009). Certains antioxydants comme la vitamine C, vitamine E,  $\beta$ -carotène et le coenzyme Q possèdent des propriétés hypotenseur. Comme le jus de grenade possède de très fortes propriétés antioxydantes, une étude a examiné l'effet de la consommation quotidienne de 50 ml de jus de grenade chez des patients souffrant d'hypertension. Au bout de deux semaines, la pression systolique avait baissé de 5 % et l'activité sérique de l'angiotensin-converting enzyme (ACE) était réduite de 36 %. Une réduction de l'activité sérique de l'ACE semble atténuer l'athérosclérose (Seraam *et al.*, 2006).

##### **6.1.2. Effet sur les plaquettes sanguines**

La formation de thrombose est importante dans les maladies cardio-vasculaires. Les plaquettes sont des fragments de cellules sanguines qui proviennent du cytoplasme des mégacaryocytes dans la moelle osseuse et circulent dans le sang. Elles jouent un rôle majeur

Tableau IV : Composition en éléments nutritionnels des graines de grenade (Souci *et al.*, 1994)

Constituants	Unité	Moyenne
Constituants majeurs :		
Eau	g	79,06
Protéines	g	0,70
Matière grasse	g	0,60
Sucres exploitables	g	16,10
Fibres alimentaires	g	2,24
Acides organiques	g	0,60
Cendres	g	0,70
Minéraux :		
Sodium	mg	7,00
Potassium	mg	290,00
Magnésium	mg	3,00
Calcium	mg	8,00
Manganèse	µg	130,00
Fer	µg	500,00
Cuivre	µg	120,00
Zinc	µg	230,00
Phosphores	mg	17,00
Vitamines :		
Equivalents rétinol	µg	6,67
Caroténoïdes totaux	µg	40,00
β-carotène	µg	40,00
B1	µg	50,00
B2	µg	20,00
Nicotinamide	µg	300,00
Vitamine C	mg	7,00
Acides organiques :		
Acide malique	mg	100,00
Acide citrique	mg	500,00
Acide salicylique	µg	70,00
Glucides importants :		
Glucose	g	7,20
Fructose	g	7,90
Sucrose	g	1,00
Stérols :		
Stérols totaux	mg	17,00
Campestérols	-	Traces
Beta-sitostérol	mg	16,00
Fibres alimentaires :		
Hydrosolubles	mg	260,00
Non hydrosolubles	g	1,98

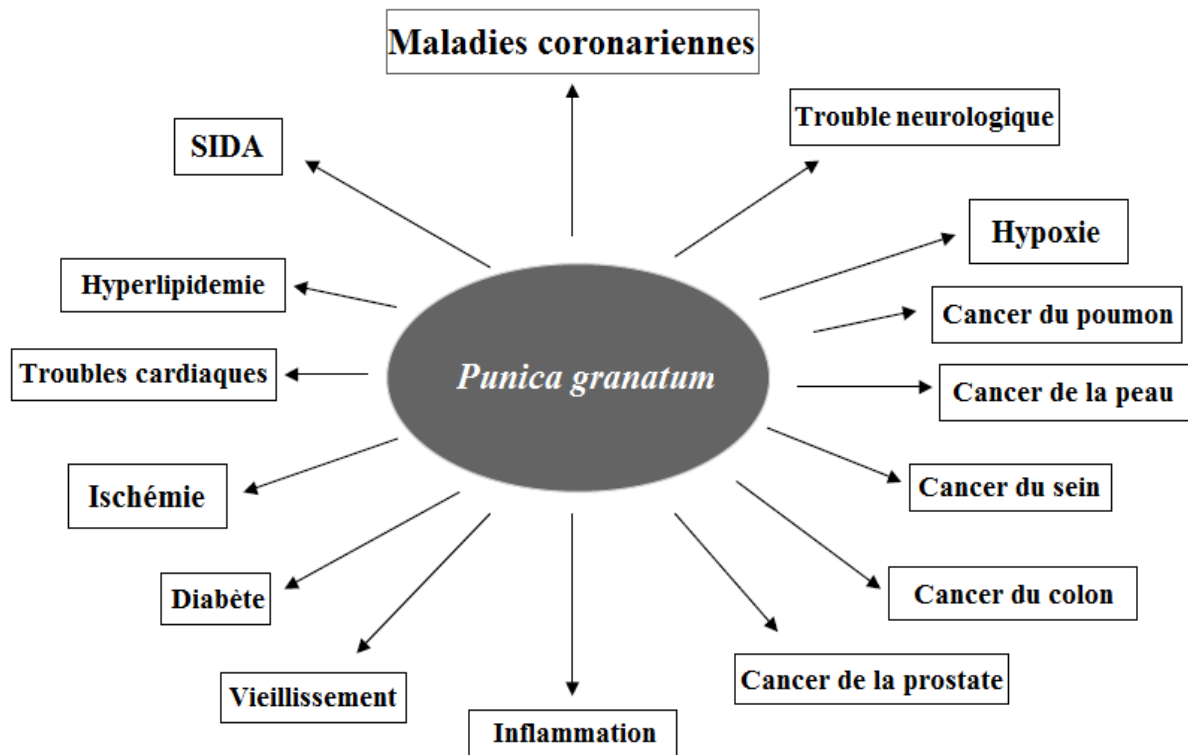


Fig. N°4 : Maladies traitées par *Punica granatum* (Seeram *et al.*, 2006).

dans le processus hémostatique et dans la formation de thrombus après une lésion endothéliale.

Les plaquettes jouent également un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, et l'augmentation de l'agrégation plaquettaire est associée à l'athérogénicité. Des études récentes ont permis de mieux comprendre leurs fonctions. L'activation plaquettaire est attribuable à des Espèces Réactives Oxygénées (ERO) ainsi les antioxydants diminuent l'agrégation plaquettaire. Il est prouvé que le jus de grenade diminue l'agrégation plaquettaire *in vivo* et *in vitro* (Fuhrman et Aviram, 2006).

### 6.1.3. Effet sur les lipides sanguins et leur peroxydation

Il est considéré que les acides gras insaturés jouent un rôle de prévention naturelle des maladies cardiovasculaires et la réduction du cholestérol total, LDL et HDL (Fadavi *et al.*, 2006). Le plasma humain, obtenu chez des patients en bonne santé après 2 semaines de consommation du concentré de jus de grenade, a démontré une baisse de la peroxydation lipidique des LDL, par rapport au plasma obtenu avant la consommation du jus (Fuhrman et Aviram, 2006).



## 6.2. Effet anticancéreux

L'objectif des recherches sur le cancer est le développement de nouveaux agents chimiopréventifs inhibiteur du développement des tumeurs et sans toxicité systémique.

### 6.2.1. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus répandus chez les hommes. Une étude *in vivo* sur une lignée de cellules du cancer de prostate PC-3 hautement agressive, a démontré que des extraits acétoniques du fruit de grenade inhibent la prolifération cellulaire et induit l'apoptose.

L'administration par voie orale d'un extrait de grenade à des souris auxquelles des cellules cancéreuses de la prostate avaient été implantées, a induit une inhibition significative de la croissance de la tumeur. De plus, le taux sérique de la PSA (antigène spécifique de la prostate) était réduit (Malik *et al.*, 2005 ; Syed *et al.*, 2007).

### 6.2.2. Cancer du sein

Le cancer du sein est l'un des cancers les plus courants qui menace la femme ménopausée. L'œstrogène le plus puissant de l'organisme, le 17-bêta-œstradiol, joue un rôle important dans la genèse et le développement de cancers hormonaux dépendants à leur premier stade. Les composants polyphénoliques de la grenade inhibent la prolifération de cellules d'une lignée cancéreuse du sein et la 17-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type I, enzyme qui convertit l'œstrogène, l'œstrone, en son métabolite le plus actif, le 17-bêta-œstradiol. Une forte expression de cette enzyme peut être un indicateur de mauvais pronostic chez des femmes ayant des tumeurs du sein avec des récepteurs œstrogènes positifs (Kim *et al.*, 2002).

### 6.2.3. Cancer du poumon

Le cancer du poumon reste l'un des cancers les plus mortels en dépit des avancées scientifiques et médicales dans la radiothérapie et la chimiothérapie de ces dernières années. Des extraits du fruit de grenade ont diminué la viabilité des cellules cancéreuses humaines du poumon sans affecter les cellules bronchiales saines et diminue la progression de la tumeur (Syed *et al.*, 2007).

### 6.2.4. Cancer du colon

Les composés phytochimiques de la grenade ont démontré un effet inhibiteur de la prolifération de cellules cancéreuses du colon et l'apoptose à travers la modulation de facteurs

de transcriptions cellulaires et protéiques.

Le jus de grenade inhibe la prolifération des cellules cancéreuses humaines de la lignée HT-29, et il est plus efficace que l'ellagitannin purifié de la grenade. Cela est dû à l'effet synergique des constituants du jus de grenade (Seeram *et al.*, 2005).

### **6.2.5. Cancer de la peau**

L'exposition excessive aux ultraviolets (UV-B) a des effets néfastes sur la santé telle que l'érythème, l'hyperplasia, l'hyperpigmentation, l'immunosuppression, le photo-vieillessement, et le cancer de la peau.

Des extraits de grenade ont un effet photochimio-préventif et protecteur des kératinocytes, cellules épidermales humaines, contre les radiations UV-B et UV-A ; ainsi que des effets chimio-préventifs et curatifs des lésions cutanées chez le rat (Syed *et al.*, 2007).

### **6.3. Effet sur la qualité du sperme**

Une étude menée sur des rats a démontré une relation positive entre la consommation de jus de grenade et les paramètres de qualité du sperme. Une augmentation significative de la concentration du sperme épидidymaire, de la mobilité des spermatozoïdes, de la densité des cellules spermatogéniques, du diamètre des tubules séminifères, et de l'épaisseur de la couche des cellules germinales ; ainsi qu'une diminution du taux de spermatozoïdes anormaux.

Cette amélioration de la qualité du sperme est due à la capacité antioxydante accrue du jus de grenade à protéger les spermatozoïdes sains contre les dommages de la peroxydation (Turk *et al.*, 2008).

### **6.4. Effet protecteur neurologique**

L'Alzheimer est la cause la plus courante de démence. Elle touche plus de 10% des adultes de plus de 65 ans. Des études suggèrent que l'alimentation affecte le développement de cette maladie.

Une étude menée sur des souris transgéniques, alimentées par du jus de grenade, a démontré des effets bénéfiques sur les comportements et les signes neurologiques liés à la maladie d'Alzheimer. La consommation de jus de grenade pendant la gestation de la souris permet de protéger le cerveau du fœtus des lésions potentielles causées par un manque d'oxygène à la naissance (Hartman *et al.*, 2006).

### 6.5. Effet antimicrobien

Les épidémies d'influenza causent de nombreux décès et hospitalisations chaque année. Cette situation devient alarmante avec l'émergence de souches résistantes aux médicaments anti-influenza. Il y'a un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules pour le traitement de cette maladie. Haidari *et al.* (2009) ont mené une étude dans ce sens en utilisant des extraits polyphénoliques de grenade. Ils ont démontré que ces extraits ont une action anti-influenza et que le punicalagin (tannin hydrolysable spécifique de la grenade) a un effet virucide et inhibiteur de la réplication de l'ARN viral (Haidari *et al.*, 2009).

Neurath *et al.* (2004) ont démontré que le jus de grenade contient un inhibiteur de l'entrée du virus VIH-1 en bloquant la fixation du virus au CD4. Ces résultats suggèrent la possibilité de développement d'un anti-VIH pas trop coûteux et disponible.

### 6.6. Effet antiviellissement

Un nombre croissant de preuves indiquent que les dommages causés aux macromolécules dus au métabolisme de l'oxygène et au stress oxydatif augmentent progressivement avec le vieillissement. Les protéines sont les macromolécules les plus affectées par le stress oxydatif en induisant l'inactivation des enzymes et l'induction de leur protéolyse. Les modifications les plus connues sont la formation de dérivés carbonyle sur les résidus de lysine, d'arginine, de proline, d'histidine, de cystéine et de thréonine. Il est constaté que la consommation journalière du jus de grenade diminue significativement le contenu sérique en composé carbonyles chez des sujets âgés alors que la consommation du jus de pomme n'affecte pas la teneur sérique en carbonyles. Cela démontre l'effet protecteur du jus de grenade contre le vieillissement (Guo *et al.*, 2008).

## 7. Toxicité de la grenade

La partie comestible de la grenade n'est pas toxique, par contre l'écorce riche en tannins peut être nuisible pour l'organisme. Beaucoup d'études ont prouvé que lorsque le contenu en tannins de la ration alimentaire dépassant 0,25% est cancérogène (Morton, 1987).

Afin de mieux comprendre l'effet de la consommation de grenade ou des extraits de grenade sur l'organisme et leur rôle dans le traitement de certaines maladies, il est nécessaire de connaître les substances bioactives et leurs propriétés. Nous allons nous intéresser aux composés phénoliques, leur classification et à certaines de leurs propriétés.

# **CHAPITRE II**

**Les composés phénoliques, structures,  
classification et propriétés**

## 1. Les composés phénoliques

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à synthétiser diverses substances naturelles secondaires, par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides, dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables pour l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

La notion de métabolites secondaires résultait de trois groupes d'observation :

- Difficulté à attribuer à ces substances une fonction précise dans la physiologie même de la plante ;
- Une répartition très inégale selon les végétaux ;
- Une certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés : alcaloïdes, terpénoïdes, composés phénoliques, ... etc (Macheix *et al.*, 2005).

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, présentant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (OH) (Hennebelle, 2004 ; Edeas, 2007).

Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par : la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées), par le degré de modification de ce dernier (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation,...), et en dernier lieu par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ...)

Cette définition purement chimique des composés phénoliques est toutefois insuffisante, car elle inclurait même des métabolites secondaires, tels que les alcaloïdes et les huiles essentielles qui possèdent dans leur structure de base le noyau benzénique. Il est donc nécessaire de faire intervenir le critère biosynthétique pour mieux cerner les limites de ce groupe de composés (Bruneton, 1993)

## 2. Biosynthèse des composés phénoliques

Dans la nature, la synthèse du noyau benzoïque est exclusivement le fait des végétaux et micro-organismes. Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- **La voie de l'acide shikimique**

La voie la plus courante est celle de l'acide shikimique, qui conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) (Guignard, 1996).

La première réaction de cette voie est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former un composé en C7, le 3-désoxy-D-arabino-heptulosanate-7-phosphate. Après élimination du phosphore, déshydratation et réduction de ce dernier, il se forme le shikimate qui subit une phosphorylation et une condensation avec une nouvelle molécule de PEP pour former au bout de plusieurs réactions enzymatiques l'acide chorismique, ce dernier se transforme en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) qui, par désamination, mènent aux acides cinnamiques, précurseurs de la majorité des acides phénoliques (Martin *et al.*, 2002).

- **Voie de polyacétates**

Une seconde voie de biosynthèse consiste à réaliser un ensemble de noyaux aromatiques par condensation répétée d'unités acétate et former ainsi un acide polycétonique. Ce dernier subit une cyclisation formant un noyau benzénique portant une chaîne latérale (Richter, 1993). Cette seconde voie intervient pour accomplir un second noyau benzénique chez les végétaux supérieurs pour de nombreux composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie du shikimate : ce sont les composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes (Bruneton, 1993 ; Guignard, 1996).

## 3. Structures et classifications des composés phénoliques

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire. Ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques (Chira *et al.*, 2008).

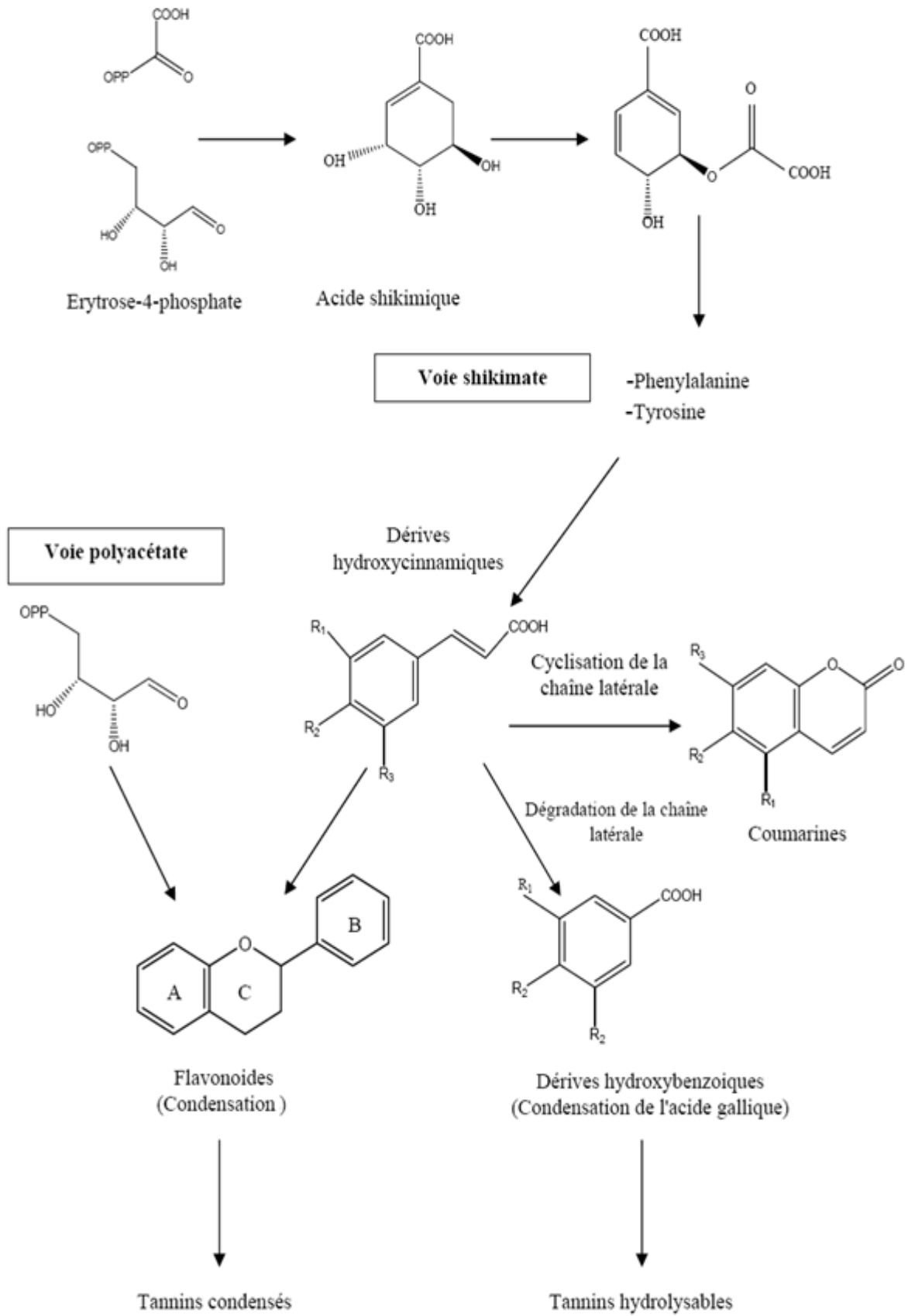


Fig. N°5 : Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques (Boukerouis, 2008)

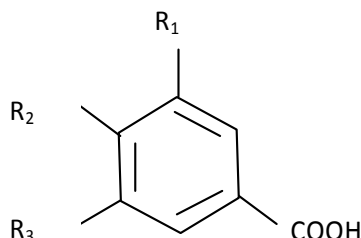
Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les non-flavonoïdes (acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les stilbènes et les tannins hydrolysables) et les flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008 ; Peti *et al.*, 2009).

### 3.1. Les non-flavonoïdes

Ils sont dans la plupart du temps des molécules simples, tels que les acides phénoliques, les stilbènes, les coumarines, incluant également leurs dérivés de molécules complexes (oligomères de stilbène, gallotannins, ellagitannins et lignines)

#### 3.1.1. Les acides phénoliques

La dénomination générale d'acides phénoliques englobe, d'une part les acides benzoïques en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> et d'autre part les acides cinnamiques en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Les principaux acides benzoïques sont : l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique (Richter, 1993 ; Guignard, 1996) et l'acide gallique. Ce dernier est largement répandu comme constituant des tannins hydrolysables. Les structures des principaux acides benzoïques sont données dans la figure N°6 et tableau V (Guignard, 1996).



**Fig. N°6 : Structure des acides benzoïques (Ribereau-Gayon, 1968)**

**Tableau V: Structures de quelques acides benzoïques (Ribereau-Gayon, 1968).**

Les dérivés de l'acide benzoïque	Substitutions		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Acide p-hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH
Acide vanillique	CH <sub>3</sub> O	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide syringique	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O

Les principaux acides benzoïques sont : l'acide hydrocaféique, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide trans-cinnamique. Aux acides cinnamiques se rattachent les



coumarines, constituées également par un élément en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, dans lequel la chaîne en C<sub>3</sub> est sous forme d'un hétérocycle oxygéné (figure N°7).

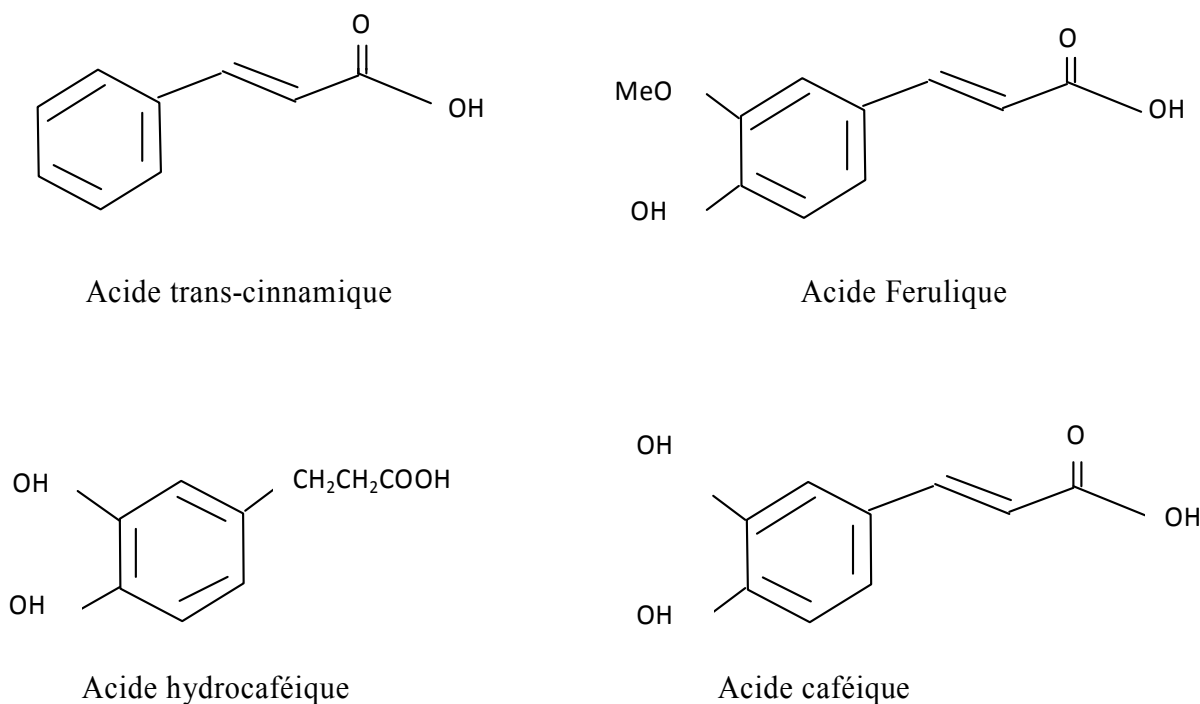


Fig. N°7 : Structures de quelques acides cinnamiques (Ribereau-Gayon, 1968)

### 3.1.2. Les coumarines

L'expression de coumarines (Figure N°8) a été introduite en 1820 par Vogel pour désigner tout hétérocyclique ayant un atome d'oxygène. Ce sont des substances phénoliques obtenues par fusion de benzène avec le  $\alpha$ -pyrone, aboutissant à la formation d'un noyau benzopyrane. Les coumarines sont fréquemment hydroxylées en position 7 et ces hydroxyles peuvent être méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique (Bruneton, 1999).

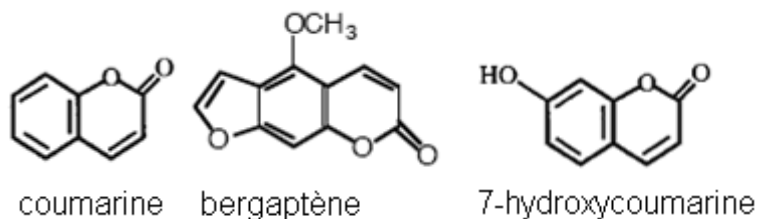


Fig. N°8 : Quelques exemples de coumarines (Havsteen, 2002).

### 3.1.3. Les stilbènes

Les stilbènes représentent une petite famille de métabolites secondaires des plantes, ce sont des composés phénoliques de structure C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> possédant deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par un pont éthylène (figure N°9). La plupart des stilbènes des plantes dérivent du trans-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbène) (Chira *et al.*, 2008 ; Chong *et al.*, 2009).

stilbene	R3	R5	R3'	R4'
<i>trans</i> -resveratrol	OH	OH	H	OH
<i>trans</i> -piceid	OGlu	OH	H	OH
pinosylvin	OH	OH	H	
piceatannol	OH	OH	OH	OH
pinosylvin monomethylether	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH
<i>trans</i> -pterostilbene	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH
astringin	OGlu	OH	OH	OH
rhapontin	OGlu	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

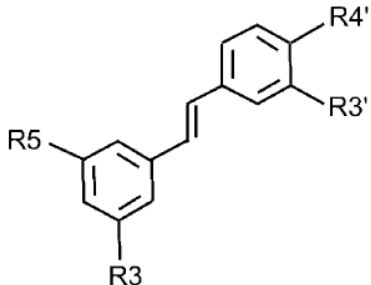


Fig. N°9 : Structure de quelques stilbènes (Chong *et al.*, 2009)

### 3.1.4. Les tannins hydrolysables, gallotannins et ellagitannins

Les tannins hydrolysables sont des polymères basés sur la structure fondamentale de l'acide gallique estérifié par du D-glucose (gallotannins) (figure N°10). Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être hydrolysés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. On suppose que l'ellagitannin dérive par liaison oxydatif de deux groupes esters galloyl adjacents d'un ester polygalloyl D-glucose (figure N°11). Plus de 1000 polymères décrit par Okuda (1993) et Nishioka (1990) au Japon. La distribution taxonomique des tannins hydrolysables est très restreinte, elle est associée principalement aux plantes herbacées dicotylédones et ils se retrouvent presque dans chaque partie de la plante (Haslam, 2007)

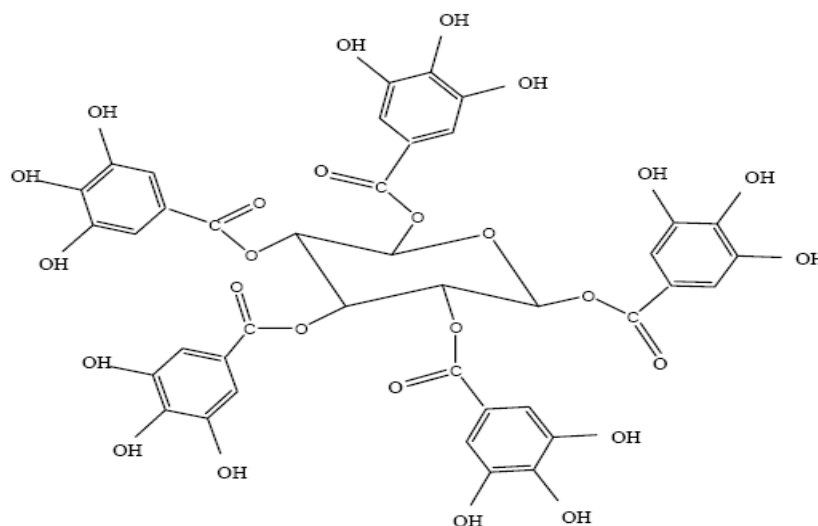


Fig. N°10 : Structure de base des tannins hydrolysable (Haslam, 2007)

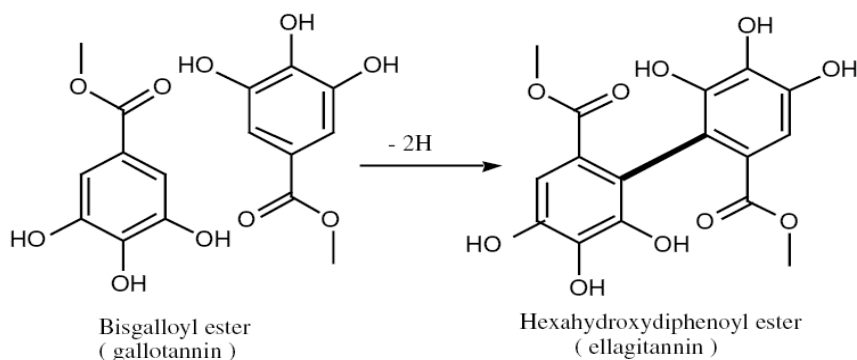


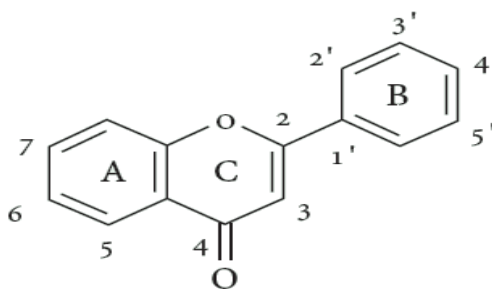
Fig. N°11 : Dérivation de l'ellagitannin par accouplement oxydatif (Haslam, 2007)

### 3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, pigments responsables des colorations jaunes, oranges et rouges de différents organes végétaux. Ils sont les représentants les plus nombreux des polyphénols (plus de 6 000 molécules isolées) et les plus connus (Ghedira, 2005).

Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones ( $C_6-C_3-C_6$ ), constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en  $C_6$  (A et B), reliés par une chaîne en  $C_3$  (figure N°12) (Bruneton, 1999).

Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes, dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (figure N°13 et 14) (Chira *et al.*, 2008 ; Petti *et al.*, 2009).



**Fig. N°12 : Structures de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005)**

### 3.2.1. Les flavonols

Les flavonols sont des composés flavonoïdes largement répandus. Les flavonols tels que la myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol sont la plupart du temps présents sous forme d'*O*-glycosides. La conjugaison est le plus souvent en position 3 du noyau aromatique C bien que des substitutions en positions 5,7,4',3' et 5' soient possibles (Robards et Antolovich, 1997 ; Chira *et al.*, 2008). Le flavonol le plus commun est la quercétine (figure N°14). Il est présent dans divers fruits et légumes, mais les concentrations les plus élevées sont trouvées dans l'oignon (Tapiero *et al.*, 2002 ; Erlund *et al.*, 2004).

### 3.2.2. Les flavanones

Les flavanones sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes. Elles sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et par la présence d'un centre de chiralité en C<sub>2</sub>. La plupart des flavanones rencontrées dans la nature ont le cycle B rattaché au cycle C en C<sub>2</sub> dans la configuration a (figure N°13). La structure des flavanones est très réactive et donne lieu à des réactions d'hydroxylations, de méthylations et de glycosylations. Elles sont représentées par la taxifoline, naringénine et l'héspéritine. Cette dernière est la plus abondante dans les agrumes (figure N°14) (Tapiero *et al.*, 2002).

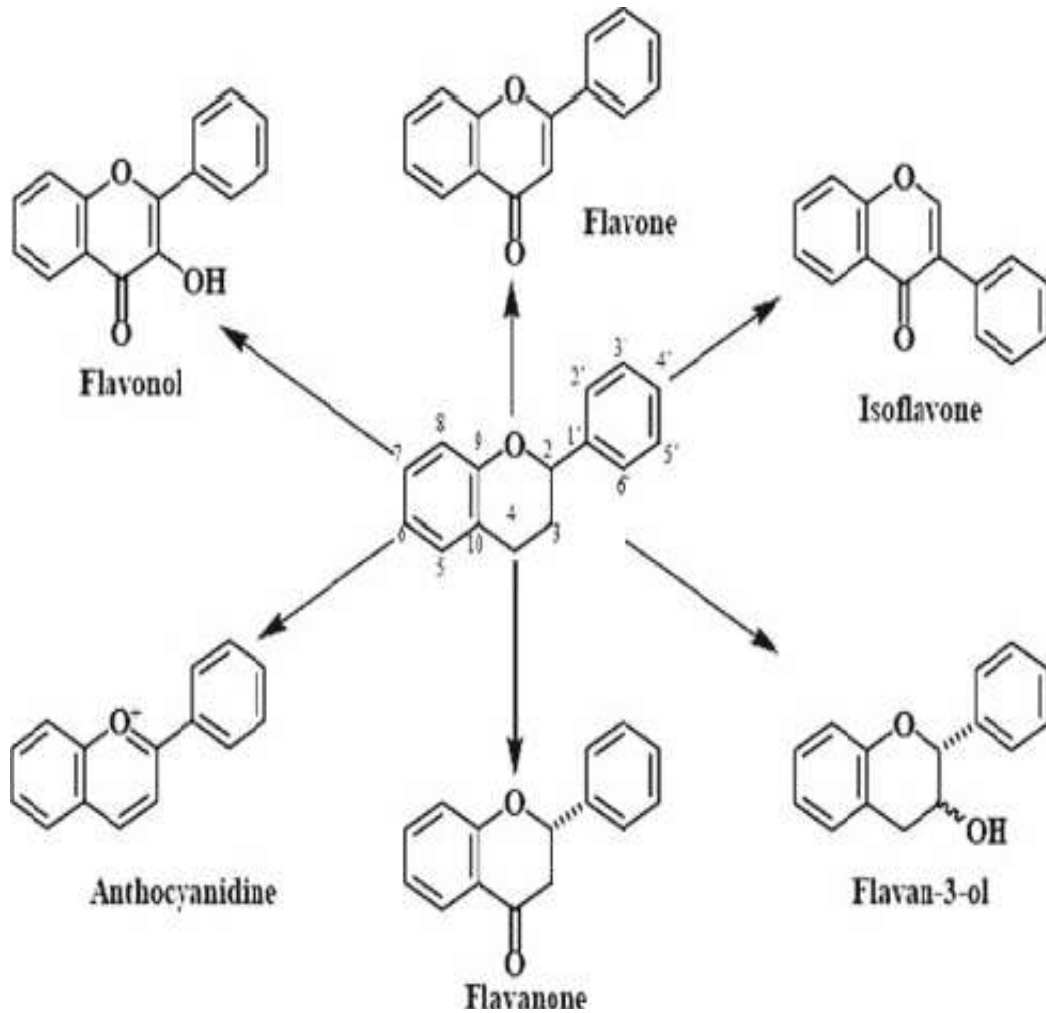
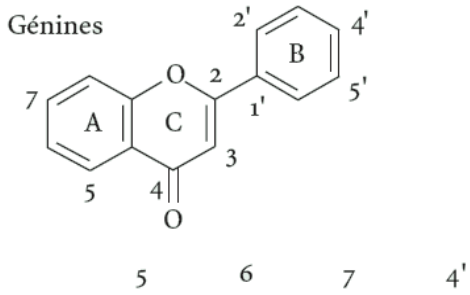


Fig. N°13 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008)

### 3.2.3. Les flavan-3-ols

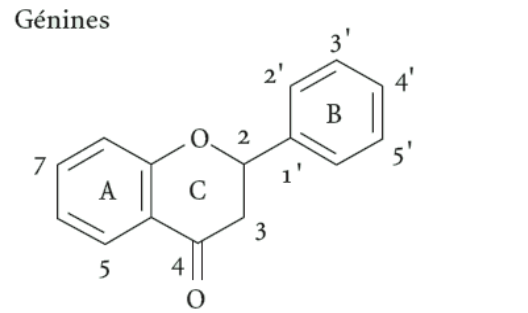
Les flavan-3-ols sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composées vont des simples monomères (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères de proanthocyanidines. Les proanthocyanidines sont formées de la catéchine et de l'épicatéchine avec des couplages oxydatifs entre les positions C<sub>4</sub> de l'hétérocycle et C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub> du monomère adjacent. Les oligomères de procyanidines sont formés de 2 à 5 unités de catéchines ou d'épicatéchines, les polymères étant formés de 6 unités ou plus. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés avec l'acide gallique ou bien hydroxylés pour former des gallocatéchines (épicatéchine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) et des gallotanins (Pietta, 2000 ; Tapiero *et al.*, 2002 ; Chira *et al.*, 2008).

**Flavones**



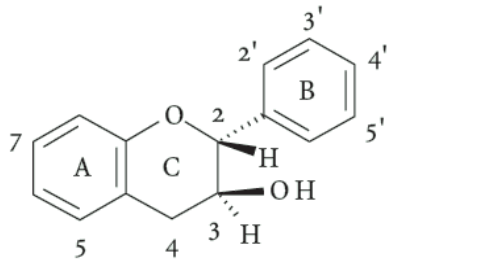
Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

**Flavanones**



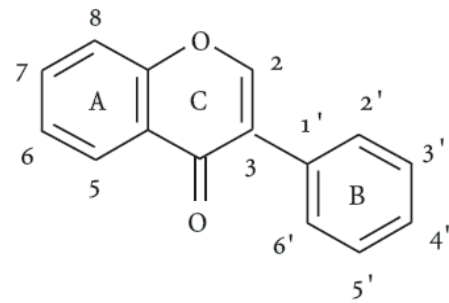
Naringénine				
	5	7	4'	
	OH	OH	OH	

**Flavanois**

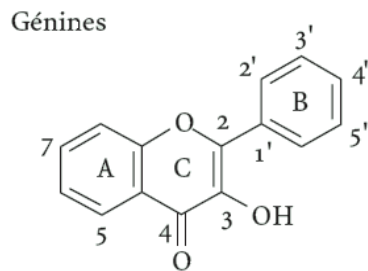


Catéchine	OH	OH	OH	OH
-----------	----	----	----	----

**Isoflavone**



**Flavonols**



	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

Fig. N°14 : Structures de quelques flavonoïdes (Ghedira, 2005)

### 3.2.4. Les flavones

Les flavones sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C<sub>3</sub>. Il existe aussi de très nombreuses substitutions des flavones, telles que l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C- alkylation et glycosylation. Les flavones étant principalement sous forme de glucosides, les plus connus sont, l'apigénine et la lutéoline (figure N°14) (Pietta, 2000 ; Tapiero *et al.*, 2002).

### 3.2.5. Les isoflavones

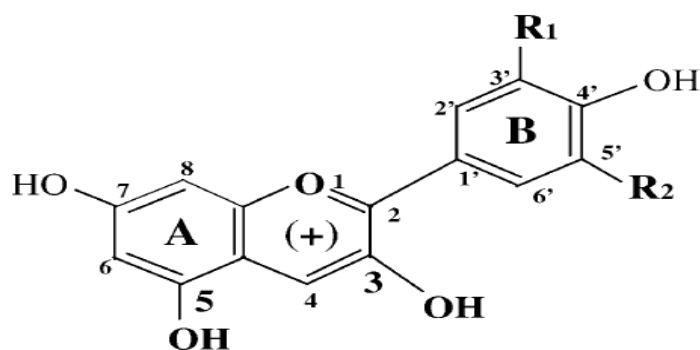
Les isoflavones sont des flavonoïdes dont le cycle B est lié à la position C3 du cycle C. Ceci exclut l'existence d'un groupe hydroxyle en position C3 et diminue la probabilité de ce groupe à contribuer de manière significative à l'activité antioxydante d'une isoflavone. La génistéine est la plus abondante chez les végétaux, le soja est une source importante en isoflavones (figure N°14) (Erlund, 2004 ; Prasain *et al.*, 2004)

### 3.2.6. Les anthocyanidines et les anthocyanines

Les anthocyanidines sont largement présentes dans le règne végétal, principalement sous formes de glycosides, où elles sont responsables des couleurs rouges, bleues et violettes en fonction du pH du milieu. Elles représentent 80% des pigments des feuillettes, 69% dans les fruits et 50% dans les fleurs. Ces composés sont impliqués dans la protection des plantes contre les excès de rayons solaires. 23 anthocyanidines ont été identifiées à ce jour, les plus courantes sont la pelargonidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine et la malvidine (figure N°15), mais ces composés ne sont présents que sous forme de conjugués glycosylés, les anthocyanines. Les anthocyanidines sont aussi capables de former des conjugués avec les acides hydroxycinnamiques et les acides organiques (acide malique et acide acétique) (Giusti *et al.*, 2003 ; Chira *et al.*, 2008 ; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

### 3.2.7. Tannins condensés ou tannins catéchiques

Les tannins condensés sont des oligomères de deux à dix ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (figure N°16). Ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader pour donner des polymères d'anthocyanidines correspondantes, les formes dimères et oligomères sont dénommées proanthocyanidines. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit par liaisons C-C ou par liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (Haslam, 2007).



Aglycon	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) visible / couleur
Pelargonidin	H	H	494 nm / orange
Cyanidin	OH	H	506 nm / orange-rouge
Peonidin	OMe	H	506 nm / orange-rouge
Delphinidin	OH	OH	508 nm / rouge
Petunidin	OMe	OH	508 nm / rouge
Malvidin	OMe	OMe	510 nm / bleuâtre-rouge

Fig. N°15 : Structure des anthocyanidines les plus rencontrées dans la nature  
(Giusti *et al.*, 2003)

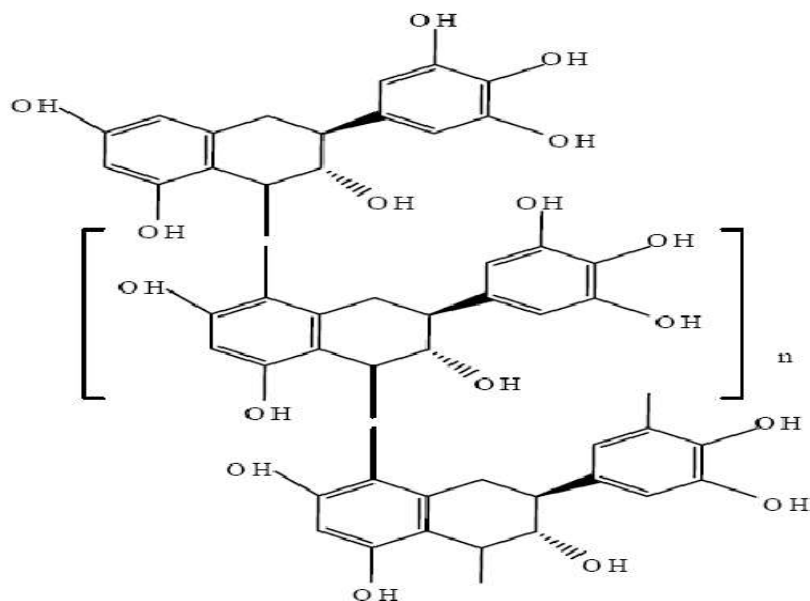


Fig. N°16 : Structure des tannins condensés (Haslam, 2007)



## 4. Propriétés des composés phénoliques

### 4.1. Propriétés physicochimiques

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal. Les polyphénols sont généralement extraits, selon leur solubilité, par les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Cependant, cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre dépendant des substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyls (Macheix *et al.*, 2005 ; Naczki et Shahidi, 2006).

La nature du solvant n'est pas le seul critère influençant sur le rendement d'extraction. Les autres paramètres influençant sont : la température, le temps d'extraction, la taille des particules, le pH et la ration (la masse du solide/ volume du solvant) (Naczki et Shahidi, 2004 ; Lapornik *et al.*, 2005 ; Chirinos *et al.*, 2007).

La plupart des phénols simples peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau. Les flavonoïdes sont connus comme étant des composés hydrosolubles vu la présence de la partie osidique, les solvants les plus polaires sont les mieux adaptés pour leur extraction. Les anthocyanines sont extraits par des mélanges méthanol/HCL. Cependant, certains flavonoïdes apolaires, par exemple ceux liés aux stérols, doivent être extraits avec des solvants apolaires, comme le chloroforme et l'hexane. Les tannins condensés et les tannins hydrolysables, sont de préférence extraits par l'acétone (Naczki et Shahidi, 2004 ; Chirinos *et al.*, 2007).

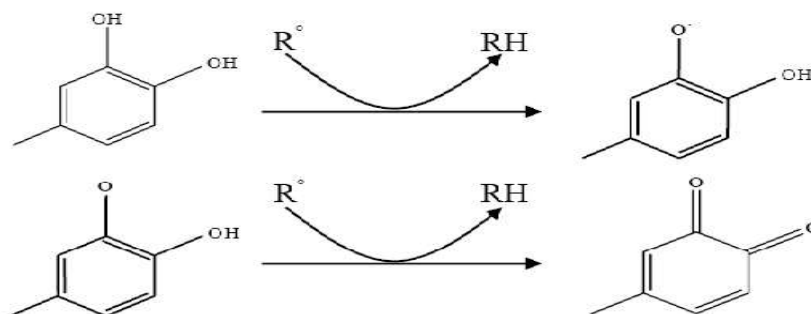
Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent dans l'UV et certains d'entre eux comme les anthocyanes, flavonols, chalcones et aurones absorbent dans le visible et participent alors à la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits...) (Macheix *et al.*, 2005).

### 4.2. Propriétés biologiques

Certaines plantes et épices font partie de la pharmacopée traditionnelle asiatique depuis des siècles, mais ce n'est que récemment que les études scientifiques ont permis de confirmer ces propriétés médicinales attribuées aux polyphénols. Il a été reconnu que les flavonoïdes possédaient des activités anti-inflammatoire, antiallergique, hépatoprotectrice, antithrombotique, antivirale et anticarcinogène.

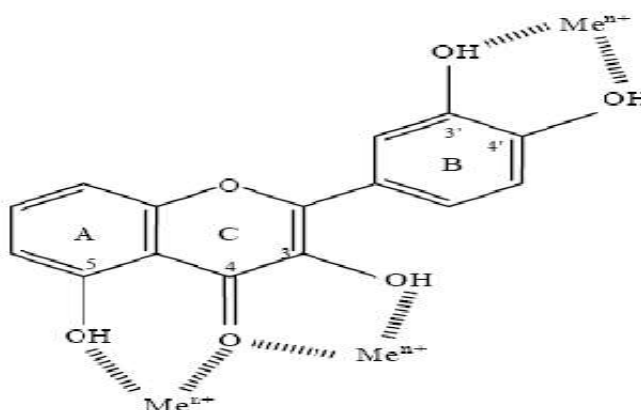
L'activité antioxydante des composés phénoliques est la mieux connue et provient de leur haute réactivité. Ils agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et piègent les

radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et radicaux peroxy lipidiques. De plus, les dérivés sont stables (figure N°17) (Ghedira, 2005).



**Fig. N°17 : Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes (Pietta, 2000).**

Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer les effets délétères des substances oxydantes (figure N°18) (Pietta, 2000).



**Fig. N°18 : Sites de chélation des métaux par les flavonoïdes (Pietta, 2000).**

Les flavonoïdes peuvent inhiber plusieurs enzymes telles que : les hydrolases, oxydoréductases, ADN synthétases, ARN polymérase, phosphatases, protéine phosphokinases, oxygénases, et aminoacide oxydases. Certaines enzymes sont impliquées dans le stress oxydant (enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase). Il a été démontré que certains flavonoïdes comme l'apigénine, la quercétine et la myricétine inhibent fortement la xanthine oxydase (Havsteen, 2002).

La grenade (*Punica granatum* L.) est utilisée localement, dans le traitement traditionnel de certaines maladies sans référence scientifique. Cette étude est entreprise afin de cerner les conditions opératoires pour une meilleure extraction et la détermination de l'activité antioxydante des composés phénoliques de deux variétés de grenade de la région de Bejaïa.

---

# **PARTIE PRATIQUE**

---

---

# **Matériel et méthodes**

---

## 1. Récolte des échantillons

Les grenades (*Punica granatum* L.) utilisées dans cette étude sont issues de deux variétés. Elles ont été récoltées au mois de novembre 2008 dans une ferme de la région de Gueldamene à quelques kilomètres de la ville d'Akbou et à 60 kilomètres du chef lieu de la wilaya de Bejaïa.

Il s'agit de la variété *Lahlou* et de la variété *Quares*. L'échantillonnage a été effectué de manière aléatoire sur une vingtaine d'arbres de hauteur de 2 à 3 m. Les grenades sélectionnées présentent les critères suivants :

- de poids équivalent,
- au même stade de maturité,
- récoltés sur la base de la couleur de l'écorce.

Les caractéristiques des variétés *Quares* et *Lahlou* sont illustrées dans le tableau VI

Le choix de ces variétés se justifie par leur qualité gustative. En effet les grenades de Gueldamene sont très connues et prisées par le consommateur pour leur qualité gustative et leur taille assez considérable.

**Tableau VI : Caractéristiques des grenades de la variété *Lahlou* et *Quares***

	Taille du fruit et couleur de l'écorce	Couleur des graines	Dureté des pépins	Gout et saveur
<i>Lahlou</i>	Grande Rouge	Rose-rouge	Tendres	Juteux et très sucré
<i>Quares</i>	Moyenne Jaune à rouge	Rouge foncé	Dures	Peu juteux acide et savoureux

## 2. Traitement des échantillons

Les fruits sains ont été soigneusement transportés au laboratoire de technologie alimentaire où ils ont été triés, étiquetés, pesés sur une balance analytique et leurs dimensions ont été déterminées par un palmer.

- **Conservation des graines et écorces**

Les grenades ont été épluchées délicatement pour ne pas abimer les graines. Ces dernières sont conservées dans des sacs en plastique à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Les écorces ont été séchées à une température de  $40^{\circ}\text{C}$  dans une étuve ventilée.

- **Broyage et tamisage**

Après séchage, les écorces sont réduites en poudre à l'aide d'un broyeur mécanique de laboratoire et tamisées par un tamiseur électrique contenant plusieurs tamis de diamètres allant de  $63\mu\text{m}$  à  $1\text{mm}$ . La fraction inférieure à  $63\mu\text{m}$  est récupérée et conservée dans des flacons fermés à l'abri de la lumière.

Concernant les graines, nous avons utilisé la méthode décrite par Ozgen et *al.* (2008) : Avant chaque extraction, elles sont décongelées, puis broyées dans un mixer jusqu'à obtention d'une mousse puis soumises immédiatement à l'extraction par solvants pour limiter les pertes en composés bioactifs.

## 3. Caractéristiques morphologiques des fruits

L'étude des caractéristiques morphologiques concerne la détermination du poids, la hauteur axiale, le diamètre axial des fruits, la hauteur et le diamètre du calice, et enfin le nombre de sépales (figure N°19).

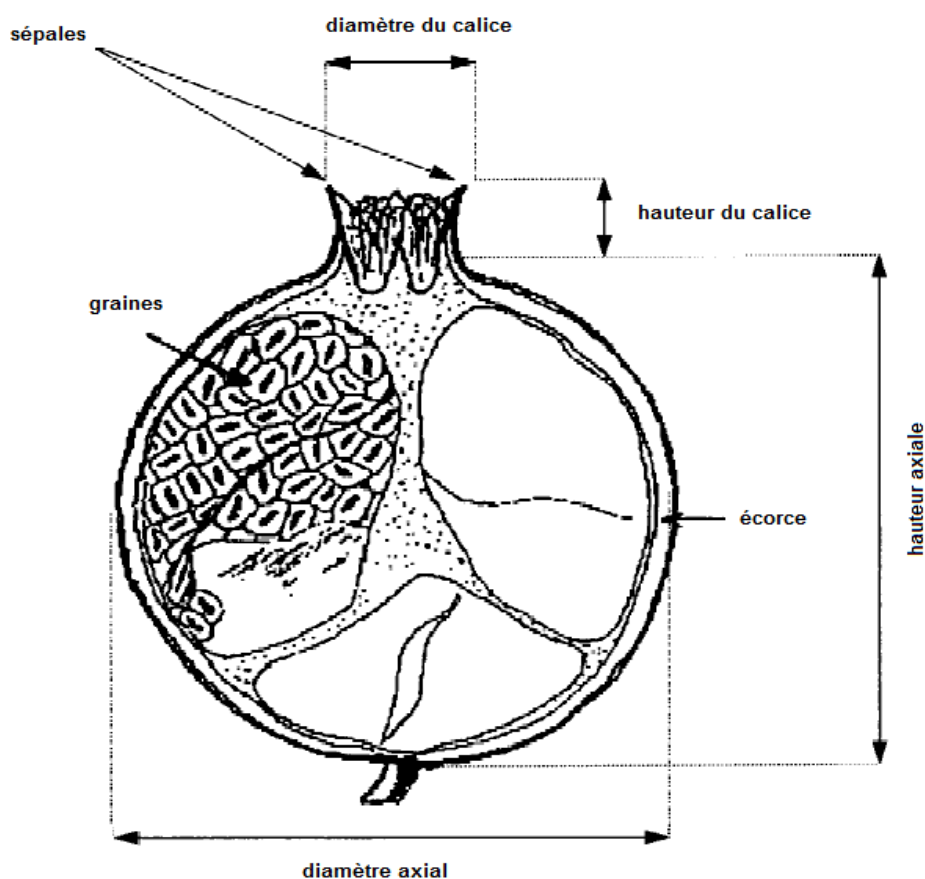


Fig. N° 19 : Coupe longitudinale d'une grenade (Mars *et* Marrakchi, 1999)

#### 4. Test d'humidité

L'humidité représente le rapport du poids perdu au cours du séchage et du poids frais de l'échantillon multiplié par cent.

2g d'échantillon ont été pesés dans un creuset puis portés à 105°C. Le poids des échantillons a été déterminé chaque heure jusqu'à stabilité de ce dernier.

Le taux d'humidité (H%) est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (P_1 / P_0) .100.$$

Avec :

$P_0$  : poids initial de l'échantillon avant séchage.

$P_1$  : poids final de l'échantillon après séchage (Bucic-Kojic *et al.*, 2007).

## 5. Caractéristiques physico-chimiques du jus

### 5.1 Calcul du rendement en jus

100 g de graines décongelées et broyées sont mises dans un tissu en mousseline pour être pressées et extraire la totalité du jus. Le jus obtenu est pesé pour déterminer le rendement d'extraction (Kulkarni *et al.* 2004 ; Naveena *et al.* 2008 ; Al-Said *et al.* 2009).

### 5.2 Détermination du pH, de l'acidité titrable et de la teneur totale en solides solubles

Le pH du jus est déterminé à l'aide d'un pH-mètre étalonné de marque Hanna.

L'acidité titrable est déterminée potentiométriquement selon la méthode AOAC de 1984 décrite par Shwartz *et al.* (2009) : 2 ml de jus sont dilués avec 10 ml d'eau distillée, puis titrer avec de la soude (0,1 N) jusqu'à atteindre un pH de 8,2. Le résultat est exprimé en % d'acide citrique.

$$\text{AT (\% acide citrique)} = \frac{V \times 0,0064 \times 100}{10}$$

La teneur en sucres solubles totale est déterminée à l'aide d'un refractomètre type Abbé AR 12 de Schmidt et Haensch, à une température de 20°C.

## 6. Dosage des anthocyanines du jus

- **Principe**

Le dosage des anthocyanines du jus est effectué selon la méthode du pH différentiel. Cette méthode utilise la propriété des anthocyanes à être sous une forme colorée et sous une forme incolore en fonction du pH du milieu. La fonction phénolique n'étant pas affectée par cette variation du pH, donc les autres composés phénoliques n'interfèrent pas, et par conséquent, la variation de la couleur est proportionnelle à la teneur en anthocyanines (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).



- **Mode opératoire**

Cette méthode utilise deux systèmes tampon : Le chlorure de potassium à 0,025M (pH 1,0) et l'acétate de sodium à 0,4 M (pH 4,5). 0,4 ml d'extrait est mélangé avec 3,6 ml de solutions tampon correspondantes. Les absorbances sont mesurées à 510 et 700 nm contre un essai à blanc.

L'absorbance qui correspond aux anthocyanines est calculées comme suit :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4}$$

La concentration en anthocyanines, exprimée en mg équivalent de cyanidine-3-glucoside pour 100 ml de jus de grenade, est calculée selon l'équation suivante :

$$[\text{anthocyanines}] = \frac{A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 100}{\text{AM}}$$

**A**: absorbance; **MM**: masse moléculaire de la cyanidine-3-glucoside (449.2 g/mol);

**FD**: facteur de dilution; **AM** : coefficient d'absorbance molaire (26900 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>l) (Çam *et al.*, 2009).

## 7. Extraction des composés phénoliques

Les données des publications actuelles sur les méthodes et conditions d'extraction des composés phénoliques de la grenade sont ambiguës et contradictoires. C'est pour cette raison qu'une extraction en deux étapes, à une température ambiante, est réalisée en utilisant plusieurs solvants:

- **1<sup>ère</sup> étape :**

Les composés phénoliques des écorces et des graines sont extraits avec 5 solvants : eau distillée et quatre solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone et acide acétique), à différentes concentrations (solvant/eau [50/50 ; v/v et 80/20 ; v/v]) selon la méthode

d'extraction liquide-solide en discontinue, décrite par Turkmen *et al.* (2006) avec quelques modifications.

Les solvants utilisés ont été choisis en fonction de leur polarité. Leurs différentes polarités sont illustrées dans le tableau VII ci-dessous.

**Tableau VII: Polarités des solvants d'extraction (Reichardt, 1989).**

Solvant	Formule chimique	polarité
acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	0.355
acide acétique	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0.648
éthanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	0.654
méthanol	CH <sub>4</sub> O	0.762
eau	H <sub>2</sub> O	1.000

➤ Extraction à l'eau :

0,5 g de poudre d'écorce ou 1 g de graines broyées sont ajoutés à 10 ml d'eau distillée, portés à ébullition pendant 10 mn, puis centrifugés à 5000 tpm / 10 min. Le culot obtenu subit deux autres extractions. Les trois surnageants sont mélangés, filtrés à 0,45 µm sous vide et séchés à 40°C (figure N°20).

➤ Extraction au solvant-eau :

0,5 g de poudre d'écorce ou 1 g de graines broyées sont macérés dans 25 ml du mélange solvant-eau pendant une heure, sous agitation à température ambiante, puis centrifugés à 5000 tpm / 10 mn. Le culot obtenu subit deux autres extractions. Les trois surnageants sont mélangés, filtrés à 0,45 µm sous vide et séchés à 40°C (figure N°21).

Les extraits séchés reconstitués dans du méthanol : eau (80 : 20) sont conservés dans des flacons ambrés. Trois essais ont été réalisés pour chaque extraction.

## 2<sup>ème</sup> étape :

D'après la première étape, il en ressort que l'acétone étant le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques de la grenade. En plus des deux concentrations testées (80 : 20 ; 50 : 50), on a testé une troisième concentration (20 : 80) afin de vérifier l'effet de la concentration en acétone sur l'extraction ; en utilisant les mêmes conditions d'extraction précédentes.

## 8. Dosage des composés phénoliques

### 8.1 Dosage des phénols totaux

- **Principe de la méthode**

Les composés phénoliques réagissent avec le Folin-Ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ).

La coloration bleue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait (Ribereau-Gayon *et al.* 1982).

- **Mode opératoire**

Les phénols totaux sont déterminés par la méthode utilisant le Folin-Ciocalteu décrite par Tezcan *et al.* (2009) avec quelques modifications. 100  $\mu$ l d'extrait est mélangé avec 1,5 ml de Folin-Ciocalteu dilué dix fois et 1,4 ml de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est laissé 90 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante avant de mesurer son absorbance à 765 nm avec un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu UVmini-1240.

Les résultats sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type, exprimés en mg équivalent d'acide gallique par rapport à 1g de matière sèche à partir d'une courbe d'étalonnage.

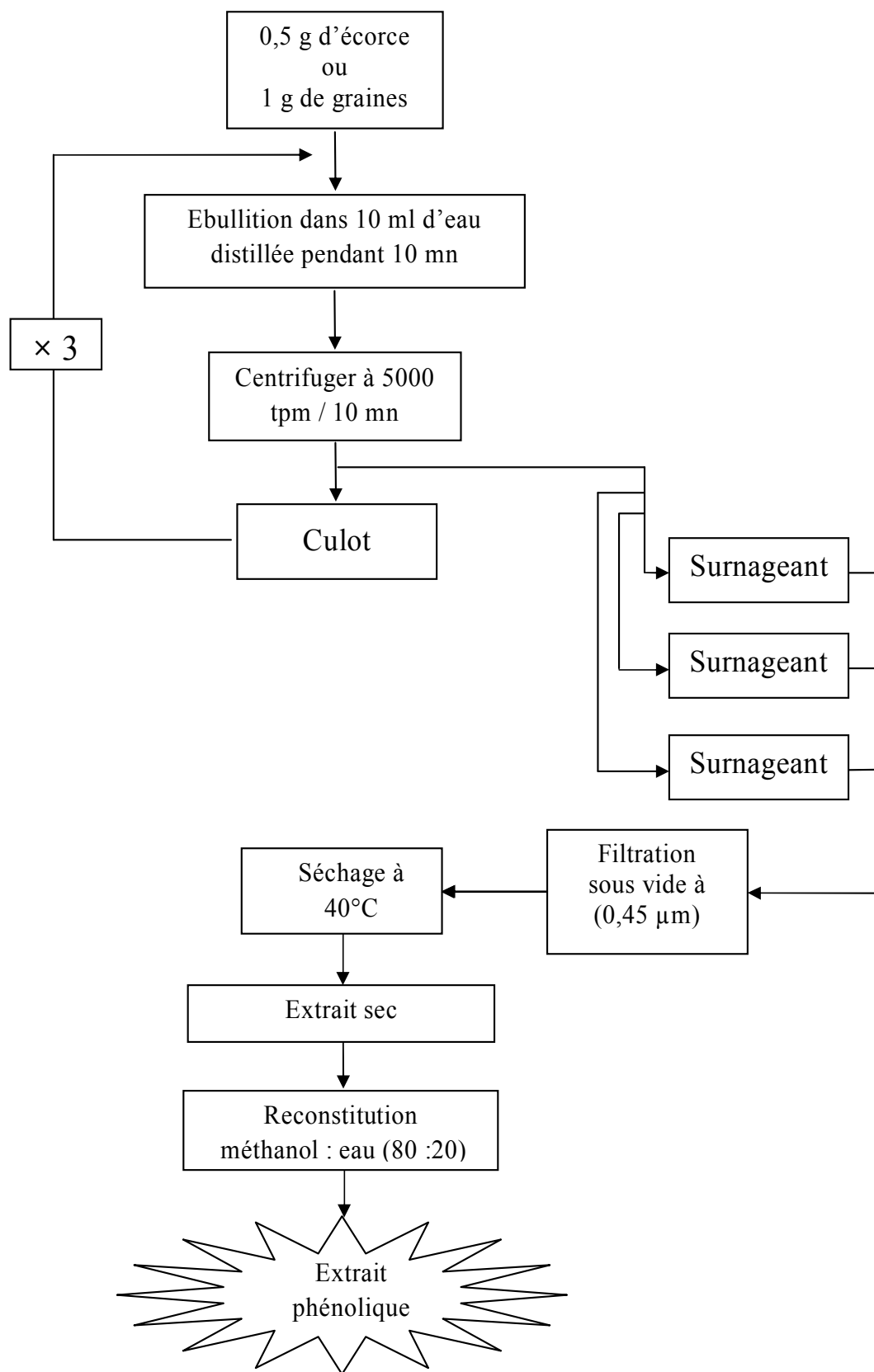
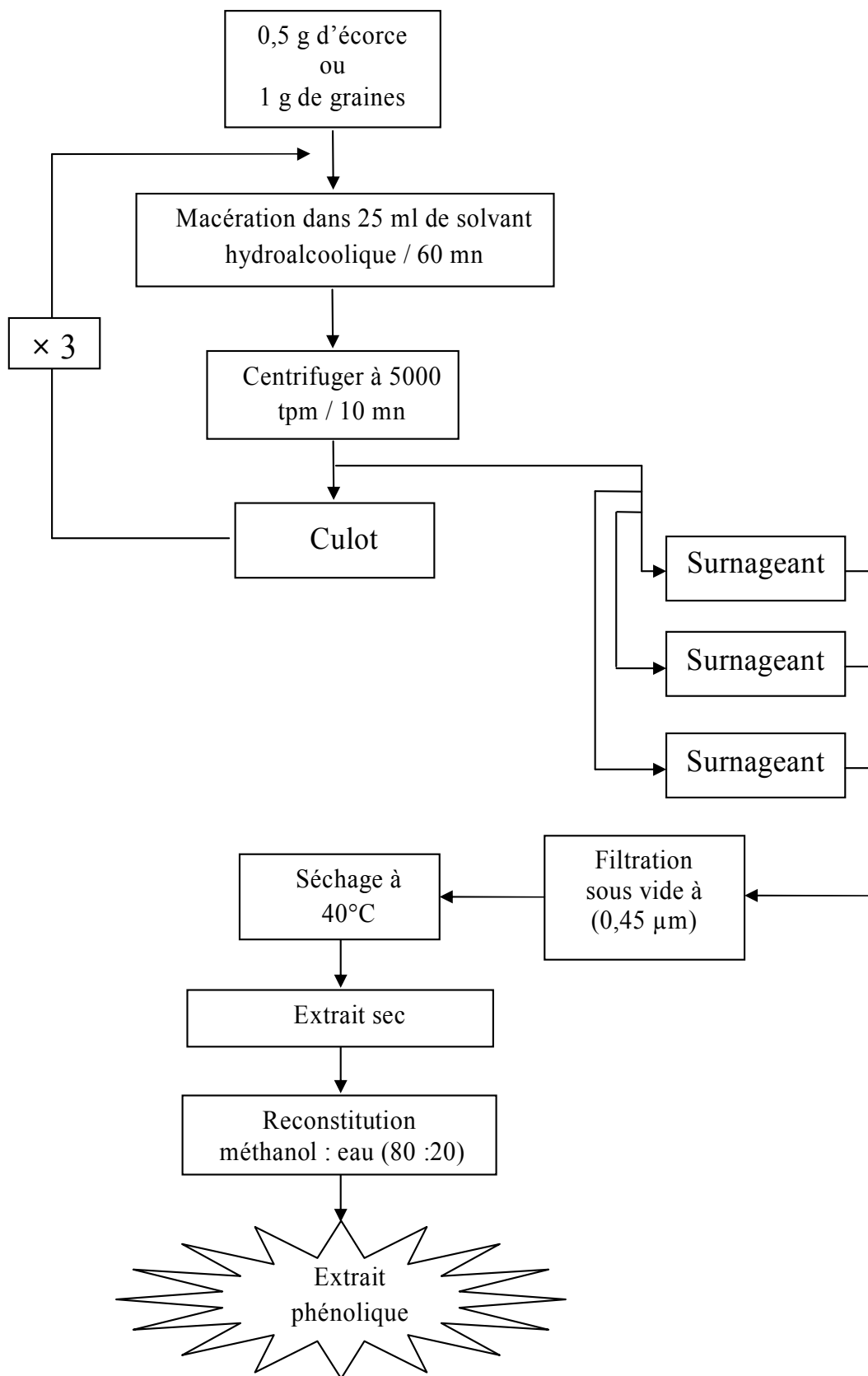


Figure N°20 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par l'eau distillée



**Figure N°21 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par solvants hydroalcooliques.**

## 8.2 Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les méthodes de dosage des flavonoïdes sont souvent colorimétriques ; elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ).

- **Mode opératoire**

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode de Zhishen *et al.* (1999), Dewanto *et al.* (2002) et Ardestani *et Yazdanparast* (2007) rapportée par Socha *et al.* (2009) et Karadeniz *et al.* (2005). 0,5 ml d'extrait sont mélangés avec 2 ml d'eau distillée et 0,15 ml de solution de  $\text{NaNO}_2$  à 15% (nitrite de sodium). Après 6 minutes, 0,15 ml d' $\text{AlCl}_3$  à 10% sont ajoutés et laissés pendant 6 minutes puis 2 ml de NaOH (soude) à 4% sont ajoutés. Le volume est ajusté à 5 ml. L'absorbance est mesurée après 15 minutes à 510 nm contre un blanc, les résultats sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type, exprimés en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche à partir d'une courbe d'étalonnage.

## 8.3 Dosage des tannins

- **Principe**

Les tanins sont connus par leur propriété principale qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait.

Le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) réagit avec les tannins (en milieu alcalin : SDS/TEA) pour former des chélates de couleur violette (Hagerman *et Butler*, 1989).

- **Mode opératoire**

La détermination quantitative des tannins est effectuée selon la méthode de Hagerman *et* Butler (1978). 1ml d'extrait et 2 ml de la solution de BSA (préparée dans le tampon acétate) ont été mélangés. Après 24h d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 3000 tpm pendant 20 mn.

Le précipité est dissout dans 4 ml de la solution tampon : SDS/TEA mis à l'obscurité pendant 15mn, suivi d'une première lecture de l'absorbance à 510 nm. 1 ml de la solution de chlorure ferrique est ajouté, après une incubation de 15 min ; une deuxième lecture de l'absorbance est effectuée à 510 nm.

La concentration en tannins de l'extrait est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique (mg équivalent d'acide tannique par g de matière sèche. Les résultats sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type.

## 9. Détermination de l'activité antioxydante

### 9.1 Pouvoir réducteur

- **Principe**

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait.

- **Mode opératoire**

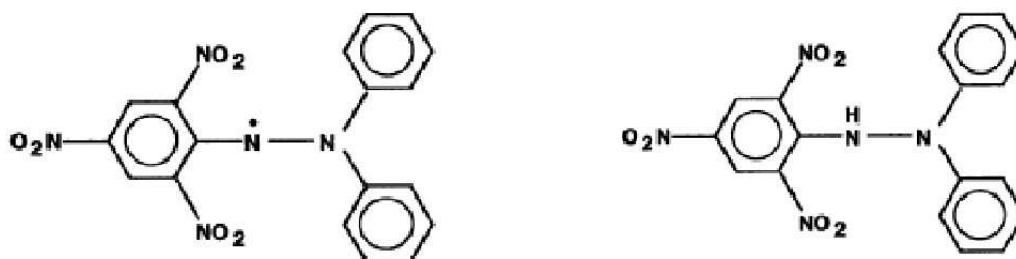
Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode d'Oyaizu (1986) décrite par Kaur *et al.* (2006). 1ml d'extrait est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1 %, m/v) ; 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %, m/v) sont ajoutés au mélange après incubation à 50 °C pendant 20 min puis centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. 2,5 ml du mélange sont additionnés de 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. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur.

## 9.2 Activité antiradicalaire par la méthode du DPPH

- **Principe**

Le radical 2-2-diphényl 1-picryl-hydrazil (DPPH<sup>•</sup>) est le plus stable radical connu ; il ne peut pas se dimériser, comme la plupart des radicaux libres, à cause de l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote porteur de l'électron célibataire (figure N°23). Toutefois, ce radical peut être réduit par un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel. La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur qui est mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (Molyneux, 2004).



**Diphenylpicrylhydrazyl (radical)**

**Diphenylpicrylhydrazyl (forme réduite)**

**Fig. N°23 : Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).**

Cette méthode tire profit de la décoloration de la solution méthanolique du radical DPPH. La différence de la densité optique, entre la solution de radical DPPH en absence et en présence de l'extrait reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire



le radical DPPH, et le taux réduit du radical DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage.

- **Mode opératoire**

L'activité antiradicalaire des extraits vis-à-vis du DPPH, est déterminée selon le protocole de Braca *et al.* (2001) rapporté par Kumaran *et karunakaran* (2006) avec quelques modifications. 100 µl d'extrait sont ajoutés à 3,9 ml de solution méthanolique de DPPH à (0,004%). L'absorbance est mesurée après 10 minutes à la longueur d'onde de 515 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'activité radicalaire du DPPH est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 (A_t - A_e)/A_t$$

$A_t$ : absorbance du témoin ;  $A_e$  : absorbance de l'échantillon

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type. La valeur  $IC_{50}$ , déterminée pour chaque extrait, est définie comme étant la concentration de l'échantillon correspondante à un pourcentage d'inhibition de 50%.

### 9.3 Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction du molybdate Mo (VI) vers le molybdate Mo (V) par les antioxydants des extraits et la formation d'un complexe vert de Mo (V) en milieu acide.

- **Mode opératoire**

On a utilisé la méthode de Negi *et al* (2003) et Abdel-Hameed (2009). 0,3 ml d'extrait sont mélangés avec 3 ml du mélange : 0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium. Le tout est incubé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, l'absorbance est

mesurée avec un spectrophotomètre UV-VIS à 695 nm contre un blanc. Les résultats sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  écart type, exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique.

## **10 Analyses statistiques**

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. Pour la comparaison des résultats, l'analyse de la variance, ANOVA (STATISTICA 5.5) est utilisée et le degré de signification de données est pris à la probabilité  $P \leq 0,05$ .

---

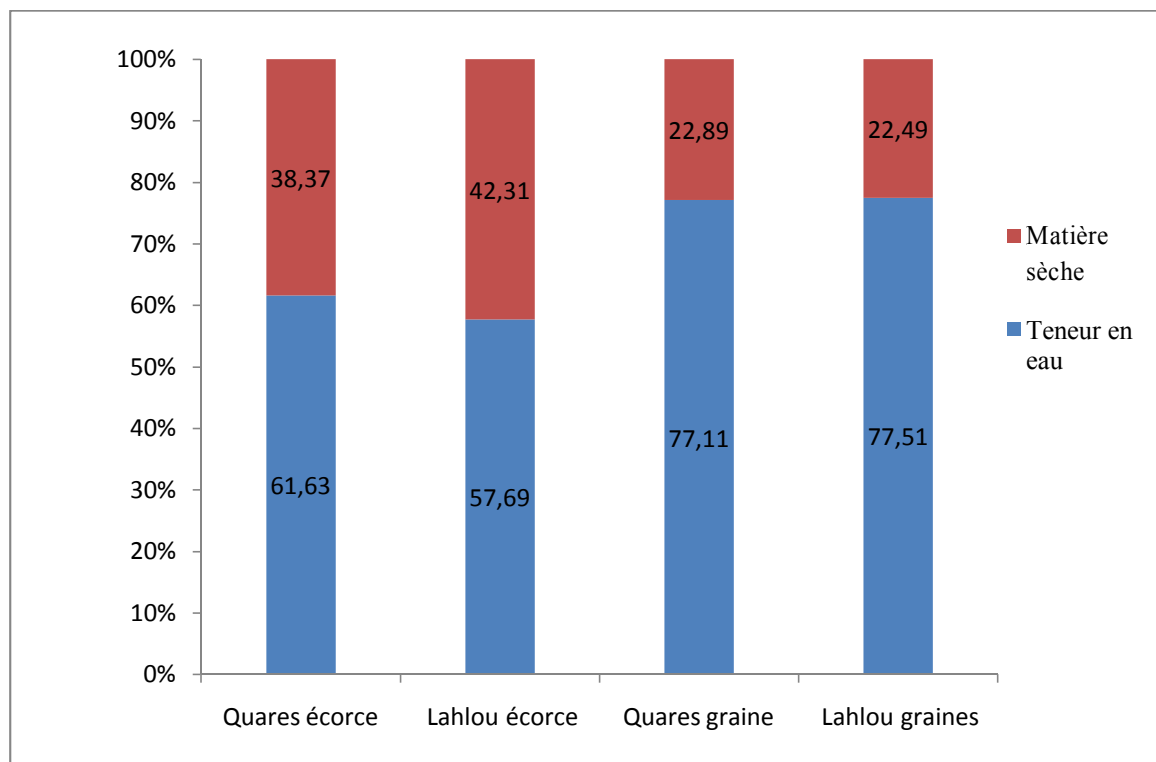
# **Résultats et discussion**

---

## 1. Taux d'humidité

Les graines des deux variétés de grenade étudiées sont très riches en eau. Le taux d'humidité de la variété *Quares* est de  $77,11 \pm 0,49\%$  et celui de *Lahlou* est de  $77,51 \pm 0,31\%$ . Ces résultats concordent avec ceux de Jaiswal *et al.* (2010) qui ont trouvé un taux d'humidité des graines de 78,7% et ceux Al-Said *et al.* (2009) qui rapportent que l'humidité des graines de grenade varie de  $79,92 \pm 0,23$  à  $76,01 \pm 0,19$ .

L'écorce de la variété *Quares* a un taux d'humidité de  $61,63 \pm 0,50$  et celle de *Lahlou* est de  $57,69 \pm 0,87$  (Figure N°24). Cette différence est due au fait que l'écorce de la variété *Lahlou* est plus épaisse que celle de la variété *Quares*. Sharma et Sharma (1990) mentionnent un taux d'humidité de 56 à 65%.



**Fig. N°24: Teneur en eau et matière sèche des graines et écorces de deux variétés de grenade**

## 2. Etude morphologique des fruits

Le poids du fruit varie significativement ( $p \leq 0,05$ ) en fonction de la variété. La variété *Lahlou* donne des fruits qui pèsent  $327,93 \pm 74,07$  g, largement supérieur au poids des fruits

de la variété *Quares* qui est de  $198,69 \pm 40,40$  g. Selon l'étude de Mirdehghan et Rahemi (2007), le poids du fruit augmente régulièrement tout au long de la période de maturation.

**Tableau VIII : caractéristiques morphologiques des fruits de deux variétés de grenade**

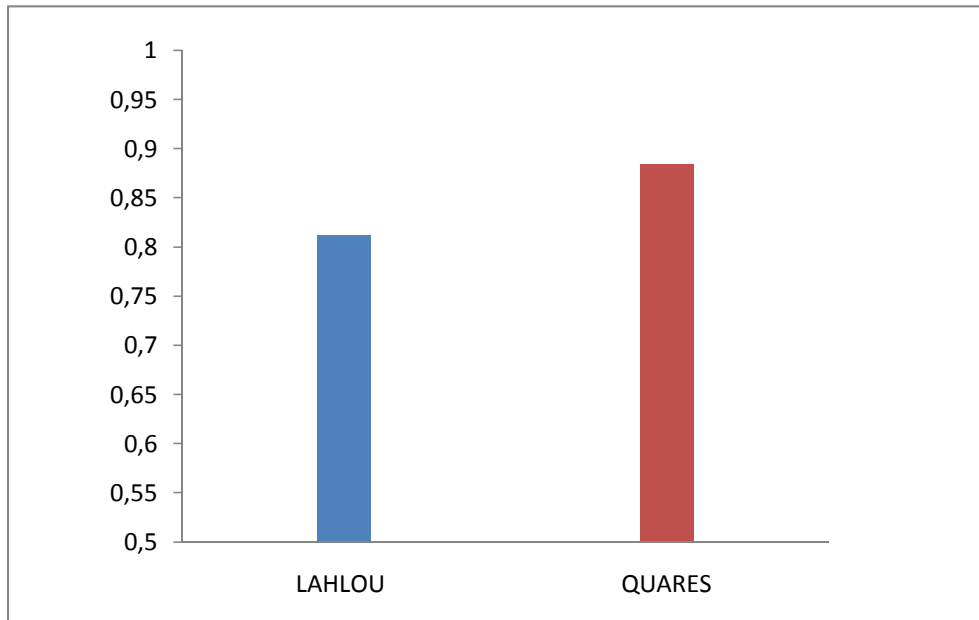
Variété	Poids moyen du fruit	Diamètre équatorial (D)	Hauteur axiale (H)	Hauteur du calice	Diamètre du calice	Nombre de sépales	$\frac{H}{D}$
<i>Lahlou</i>	327,93±74,07	8,09±0,57	6,55±0,52	1,67±0,30	2,01±0,28	6,4 ± 0,7	0,81±0,05
<i>Quares</i>	198,69±40,40	7,24±0,53	6,39±0,52	1,99±0,23	2,07±0,34	7,5 ± 0,9	0,88±0,05

Le diamètre équatorial des fruits de la variété *Lahlou* est significativement supérieur à celui des fruits de la variété *Quares*. Cependant il n'existe pas de différence significative entre la hauteur axiale des fruits des deux variétés (figure N°25). Le rapport hauteur axiale sur le diamètre équatorial renseigne sur la forme du fruit. Les fruits de la variété *Quares* ont une forme plus arrondie que les fruits de la variété *Lahlou* qui ont une forme aplatie. Cette information est très importante pour la conception d'un emballage adéquat pour le transport et le stockage.

La forme du calice est une caractéristique spécifique de chaque variété étudiée. La hauteur du calice de la variété *Quares* est significativement supérieure à celle du calice de la variété *Lahlou* ( $p \leq 0,05$ ). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre le diamètre du calice des deux variétés.

La variété *Quares* est caractérisée par un nombre élevé de sépales avec une moyenne de 7,5 alors que *lahlou* n'en n'a que 6,4. Le nombre de sépales est une caractéristique significative des variétés étudiées.

La variété *Quares* étudiée présente des caractéristiques morphologiques similaires à la variété *Wild* étudiée par Al-Said *et al.* (2009).



**Fig. N°25 : Hauteur axiale / Diamètre équatorial des fruits des deux variétés de grenade**

### 3. Caractéristiques physico-chimiques du jus de grenade

Les résultats de l'étude physico-chimique du jus des deux variétés de grenade sont donnés dans le tableau (IX) suivant :

**Tableau IX : Caractéristiques physico-chimiques du jus de deux variétés de grenade**

Variété	Rendement en jus	pH	°Brix	Acidité titrable %	Indice de maturité
<i>Quares</i>	62,20±0,38	3,04±0,01	17,73±0,03	1,70±0,04	10,42±0,26
<i>Lahlou</i>	65,23±0,33	4,55±0,03	19,62±0,13	0,44±0,03	44,23±2,79

Le rendement en jus est un paramètre très important du point de vue industriel et agronomique. La teneur en jus de la variété *Lahlou* est significativement ( $p \leq 0,05$ ) supérieure à celle de la variété *Quares*. Nos résultats sont similaires à ceux de Al-Said *et al.* (2009) et de Martinez *et al.* (2006), la teneur en jus varie de  $57,33 \pm 0,33$  à  $67,33 \pm 1,33$  et de  $50,25$  à  $64,17$  respectivement. Selon l'étude de Martinez *et al.* (2006), les variétés de grenades sucrées

présentent un meilleur rendement en jus. La teneur en jus augmente avec la maturation du fruit (Borochoy-Neori *et al.*, 2006).

Le pH et l'acidité titrable (AT) de la variété *Lahlou* sont respectivement de  $4,55 \pm 0,03$  et  $0,44 \pm 0,03\%$  et celui de la variété *Quares* est de  $3,04 \pm 0,01$  et  $1,70 \pm 0,04\%$ . L'analyse statistique montre une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les deux variétés. Pour les variétés de grenades espagnoles étudiées par Martinez *et al.* (2006), le pH varie de 3,5 à 4,28 et l'acidité titrable varie de 0,2683 à 1,0046 %. Il mentionne que l'acidité titrable de certaines variétés peut atteindre 6,28%.

La teneur totale en solides solubles (°brix) est de  $17,73 \pm 0,03$  et  $19,62 \pm 0,13$  pour la variété *Quares* et *Lahlou* respectivement. Ce paramètre varie significativement en fonction de la variété et permet d'évaluer la concentration en sucres solubles. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Kulkarni et Aradhya (2005) ; Martinez *et al.* (2006) ; Alighourchi *et Barzegar* (2009) ; Al-Said *et al.* (2009) ; Orak (2009) qui varient entre 12,36 à 17.16.

On peut classer les variétés de grenades selon l'échelle d'indice de maturité (IM) :

- variétés sucrées : IM = 31–98.
- variétés aigres (acides)-sucrées: IM = 17–24.
- variétés aigres ou acides: IM = 5–7. (Martinez *et al.*, 2006)

Selon cette échelle la variété *Lahlou* avec un indice de maturité de  $44,23 \pm 2,79$  est une variété sucrée et la variété *Quares* avec un indice de maturité de  $10,42 \pm 0,26$  est une variété acide. Cet indice nous renseigne sur la saveur et le goût.

Durant la maturation et le développement du fruit, il y a une hydrolyse de l'amidon et libération des sucres simples tels que le glucose et le fructose, ce qui conduit à une augmentation de la concentration en sucres solubles ainsi qu'une augmentation de la teneur

totale en solides solubles. Il existe une forte corrélation entre le teneur en glucose et fructose et teneur en solides solubles (Kulkarni *et Aradhya*, 2005 ; Shwartz *et al.*, 2009).

Cette augmentation de la teneur en sucre coïncide avec la diminution de l'acidité titrable et une augmentation du pH, ce qui améliore le goût et la saveur du fruit. Plusieurs acides organiques ont été identifiés dans plusieurs variétés de grenades tels que : l'acide oxalique, l'acide succinique, l'acide tartrique, l'acide malique, et l'acide citrique qui est l'acide dominant. La teneur en acide ascorbique augmente avec la maturation du fruit alors que celle de l'acide citrique diminue. Ce phénomène est caractéristique des étapes de maturation des fruits (Shwartz *et al.*, 2009 ; Tezcan *et al.*, 2009).

#### 4. Les anthocyanines du jus de grenade

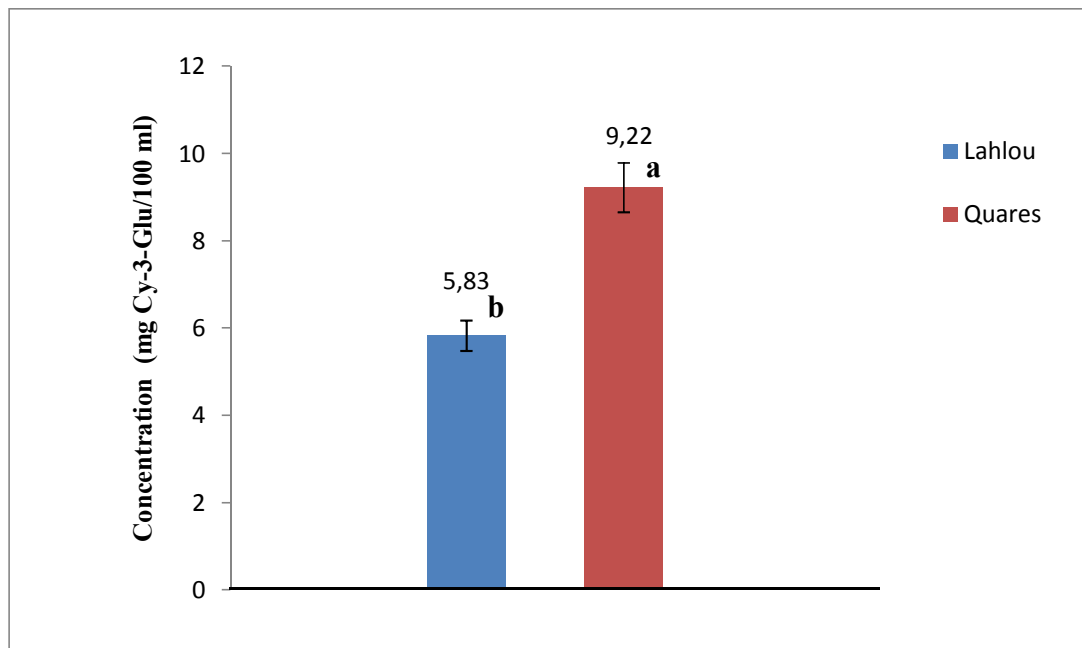
Les anthocyanines sont des pigments phénoliques hydrophiles responsables de la coloration rouge, bleue ou violette de nombreux fruits et légumes. Les nutritionnistes recommandent la préservation de ces composés lors du procédé d'extraction du jus, vu leurs effets bénéfiques pour la santé (Orak, 2009 ; Shwartz *et al.*, 2009).

La teneur en anthocyanines des deux variétés étudiées est représentée dans la figure N°26. La variété *Quares* contient  $9,22 \pm 0,56$  mg Cy-3-Glu/100 ml de jus et la variété *Lahlou*  $5,83 \pm 0,34$  mg Cy-3-Glu/100 ml de jus. L'analyse statistique montre une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre la teneur en pigments des deux variétés.

Les teneurs en anthocyanines du jus de grenade citée dans la littérature varient considérablement d'un auteur à l'autre : Çam *et al.* (2009) rapportent des teneurs allant de 8,2 à 36,9 mg /100 ml de jus et les variétés acidulé sont plus riches que les variétés sucrées ; Alighourchi *et Barzegar* (2009) ont trouvé 190,9 mg/l de jus ; Kulkarni *et Aradhya* (2005) donnent une concentration de 138 mg/100 g de graines ; Ozgen *et al.* (2008) rapportent des teneurs allant de 6,12 à 219 mg/l de jus en fonction des variétés étudiées. Shwartz *et al.*



(2009) mentionnent que la teneur en anthocyanine augmente lors de la maturation du fruit de 165 à 328 mg/l de jus.



**Fig. N°26 : Teneur en anthocyanines du jus de deux variétés de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype. Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0,05$ ).

Alighourchi *et* Barzegar (2009) et Mousavinejad *et al.*, (2009) ont identifié par HPLC 6 types d'anthocyanines dans le jus de grenade : delphinidine-3,5-diglucosides, cyanidine-3,5-glucosides, pelargonidine-3,5-diglucosides, delphinidine-3-glucosides, cyanidine-3-glucosides et pelargonidine-3-glucosides. Selon Alighourchi *et* Barzegar (2009), delphinidine-3,5-diglucosides est l'anthocyanine dominante suivie par cyanidine-3,5-glucosides ; par contre la cyanidine-3,5-glucosides est l'anthocyanine dominante chez les variétés étudiées par Mousavinejad *et al.* (2009). Les deux études s'accordent sur le fait que les formes diglycosylées sont les plus abondantes car elles sont plus stables que les formes monoglycosylées.

La teneur en anthocyanines varie selon les variétés, les conditions de cultures, le stade de maturité, les conditions de stockage et la méthode de dosage (Gil *et al.*, 2000 ;

Kulkarni et Aradhya 2005 ; Ozgen *et al.*, 2008 ; Çam *et al.*, 2009 ; Orak, 2009 ; Shwartz *et al.*, 2009).

## 5. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante et critique lors de l'isolation, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques. Il n'existe pas de méthode standard idéale pour leurs extractions. Le but de l'extraction est d'avoir le meilleur rendement d'extraction et la meilleure qualité des composés phénoliques sans modification chimique. L'extraction solide-liquide, en utilisant des solvants organiques et leurs mélanges aqueux, est généralement la plus utilisée (Bucic-Kojic *et al.*, 2007 ; Spigno *et al.*, 2007).

Différents systèmes de solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols du matériel végétal. Des solvants, tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le propanol, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide, ainsi que leur mélange aqueux et l'eau pure ont été utilisés (Hayouni *et al.*, 2007). L'extraction des composés phénoliques est influencée par leur solubilité dans le solvant utilisé et la polarité des solvants jouera un rôle clé dans l'accroissement de la solubilité phénolique (Alothman *et al.*, 2009).

Les paramètres affectant le rendement d'extraction sont : la méthode d'extraction, le solvant d'extraction, la taille des particules, le temps d'extraction, le pH, le nombre d'extraction et le ratio solide/liquide. En outre, dans l'extraction des polyphénols, plusieurs extractions sont meilleures qu'une seule extraction (Goli *et al.*, 2004).

### 5.1. Taille des particules

L'écorce est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur de laboratoire. La poudre est tamisée, à l'aide d'un tamiseur électrique contenant plusieurs tamis de différents diamètres allant de 45 $\mu$ m à 1mm. Selon Bucic-Kojic *et al.* (2007), le rendement d'extraction augmente en diminuant la taille des particules. De ce fait, la poudre utilisée pour l'extraction est celle

ayant une granulométrie inférieure à 63 $\mu$ m afin d'augmenter la surface de contact avec le solvant.

## 5.2. Temps d'extraction

Selon les résultats de l'optimisation effectuée par Chirinos *et al.* (2007), la cinétique d'extraction des polyphénols suit un model logarithmique. Il n'y a pas de différence significative entre le rendement d'extraction après un temps de 60 mn et 120 mn. Ils rapportent aussi que le prolongement de la durée d'extraction peut induire des pertes en composés bioactifs.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Jia *et al.* (2006) sur l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade. Dans ces travaux, le taux de polyphénols extraits augmente avec l'augmentation de la durée de macération. Le meilleur rendement est atteint pour un temps de 1 heure et 1 heure et demi, et au bout de deux heures il y'a diminution de la quantité de composés extraits. Nous avons donc choisi un temps d'extraction d'une heure pour l'extraction avec un solvant organique.

## 5.3. Nombre d'extractions

Chirinos *et al.* (2007) ont démontré dans leur étude que plusieurs extractions, avec renouvellement du solvant, sont plus efficaces qu'une seule extraction. Trois extractions successives suffisent pour avoir un taux de recouvrement de 95%.

## 5.4. Choix du solvant d'extraction

Les résultats de la première étape d'optimisation sont représentés dans les figure N°27 et N°28. La teneur en phénols totaux est estimée par la méthode du Folin-Ciocalteu. L'étude statistique effectuée à l'aide du logiciel Statistica 5.5, révèle une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) de la teneur en polyphénols totaux des extraits des différents solvants étudiés. Elle varie de 18,60 à 69,98 mg EAG/g de MS pour les graines de la variété *Lahlou*, de 22,90 à

116,34 mg EAG/g de MS pour les graines de la variété *Quares*, de 118,31 à 374,52 mg EAG/g MS pour les écorces de la variété *Lahlou* et de 191,38 à 452,38 mg EAG/g MS pour les écorces de la variété *Quares*.

L'efficacité d'extraction des solvants utilisés pour les graines des deux variétés de grenades, est selon l'ordre décroissant suivant : acétone 80% > éthanol 80% > acétone 50% > méthanol 80% > éthanol 50% > méthanol 50% > eau > acide acétique 80% > acide acétique 50%.

Alors que pour les écorces, nous avons obtenu l'ordre suivant : acétone 50% > méthanol 50% > acétone 80% > méthanol 80% > éthanol 50% > éthanol 80% > acide acétique 80% > acide acétique 50 > eau.

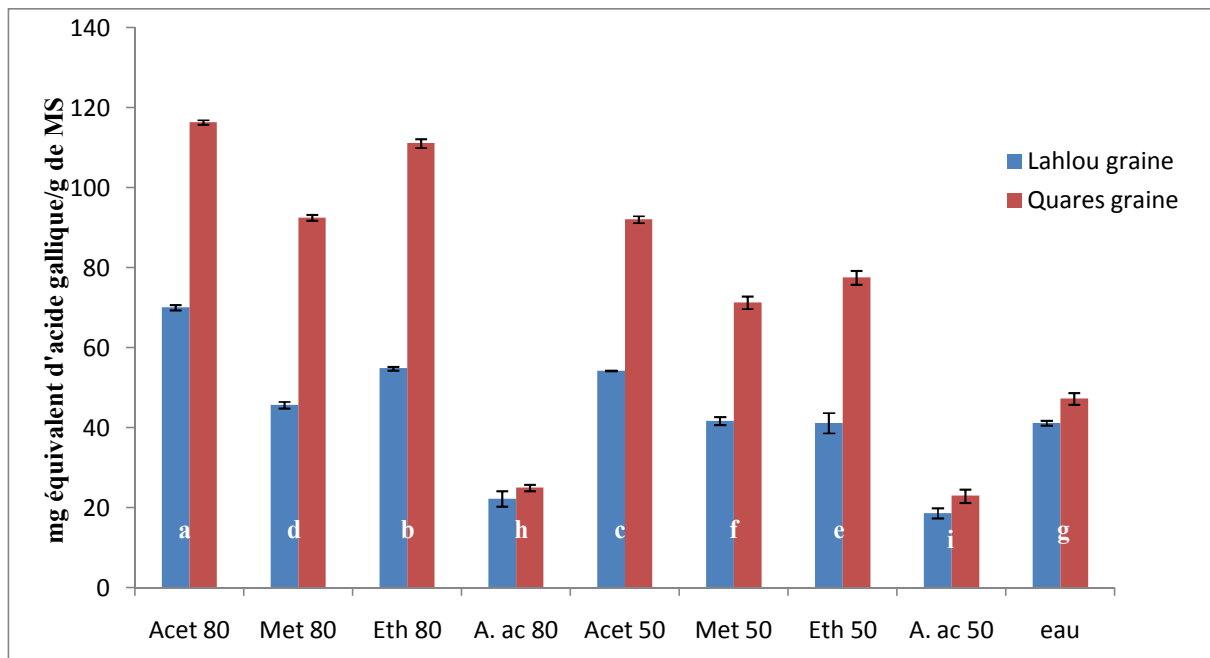
L'analyse statistique montre que les solvants à 80% sont plus efficaces que les solvants à 50% pour l'extraction des composés phénoliques des graines des deux variétés de grenades. Tandis que pour les écorces, les solvants à 50% sont plus appropriés que les solvants à 80%.

La nature du solvant affecte considérablement le rendement d'extraction et la nature des composés phénoliques extraits. On voit clairement que l'acétone est le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances bioactives des écorces et graines de grenades.

Par contre, l'étude réalisée par Iqbal *et al.* (2008) sur l'écorce de grenade révèle le contraire : le méthanol est le meilleur solvant suivi de l'acétone avec une légère différence puis éthanol, chloroforme, éthyle acétate et l'eau.

Turkmen *et al.* (2007) ont démontré dans leur étude sur le thé que l'acétone 50% est plus efficace que le diméthylformamide 50% > l'éthanol 50 % > le méthanol 50 %. Dans une autre étude sur le thé, Turkmen *et al.* (2006) mentionnent que le diméthylformamide 50%, et l'acétone 50% sont les meilleurs solvants suivit par l'acétone 80%, le diméthylformamide

80%, l'éthanol 50%, le méthanol 50%, l'éthanol 80%, le méthanol 80%, le diméthylformamide 100%, le méthanol 100%, l'éthanol 100% et l'acétone 100%.



**Fig. N°27: Teneur en phénols totaux des extraits des graines de grenade par rapport au solvant d'extraction**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype. Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0,05$ ).

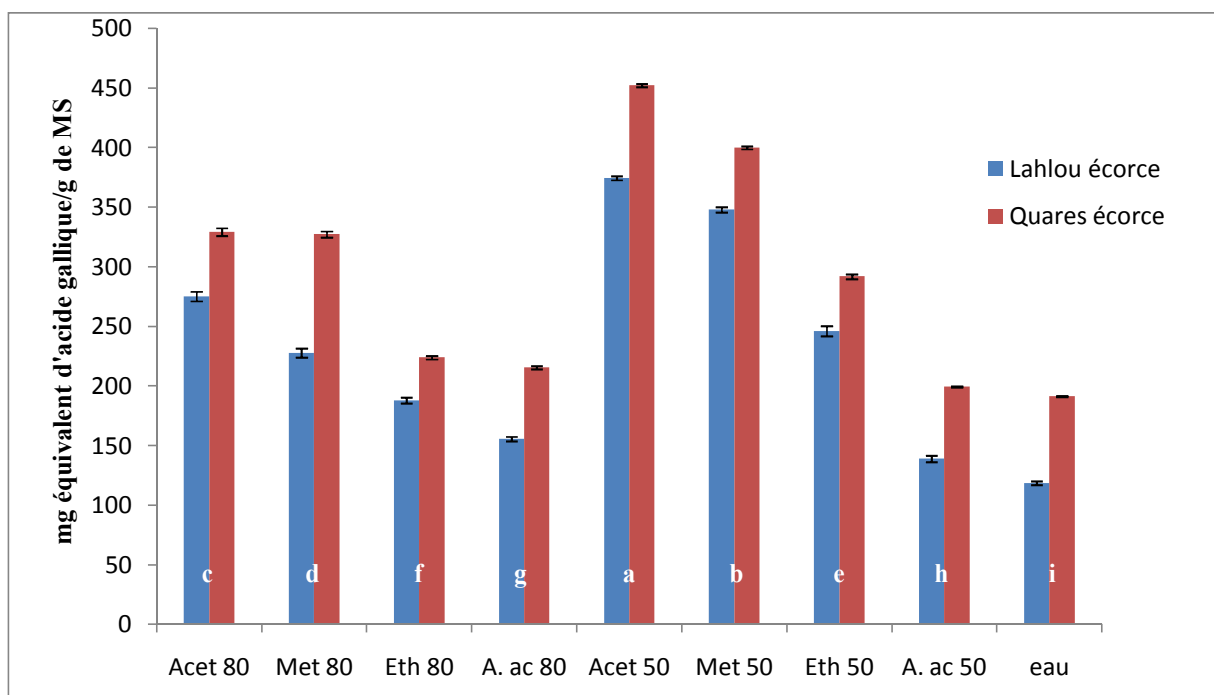
Hayouni *et al.* (2007) rapportent dans son étude que l'acétone : eau (70 : 30) avec ou sans acidification est le meilleur solvant pour extraire le maximum de tannins condensés. Ainsi que Ben Nasr *et al.* (1996) mentionnent que l'acétone : eau (90 : 10) donne de meilleurs résultats que le méthanol et l'eau pour l'extraction des tannins des écorces de grenade.

Il est difficile d'élaborer une méthode standard pour l'extraction des composés bioactifs des plantes. Le recouvrement des composés phénoliques est influencé par leurs solubilités dans le solvant utilisé et la polarité du solvant joue un rôle très important dans le processus d'extraction. Le méthanol pur ou l'éthanol pur donnent de meilleurs résultats que l'acétone pur. De ce fait, on peut affirmer que les solvants purs ayant une polarité moyenne sont les plus appropriés pour l'extraction des composés phénoliques (tableau VII). Cependant, l'acétone aqueux présente un meilleur rendement que le méthanol aqueux ou l'éthanol

aqueux : L'acétone 50% et l'acétone 70% donnent le meilleur rendement en polyphénols totaux pour l'ananas et la banane (Alothman *et al.*, 2009).

Les solvants les plus polaires telle que l'eau et les solvants les moins polaires, tels que l'hexane ou chloroforme, ne donnent pas de bon rendement d'extraction (Chirinos *et al.*, 2007). Lapornik *et al.* (2005) suggèrent que la polyphénol oxydase pourrait être responsable de la faible teneur en phénols totaux lors de l'extraction à l'eau, alors qu'en utilisant l'éthanol cette enzyme est inhibée.

L'utilisation de l'eau comme solvant conduit à un extrait contenant plusieurs substances indésirables tels que les acides organiques, sucres et protéines hydrosolubles qui pourront interférer lors du dosage ou l'identification des composés phénoliques (Chirinos *et al.*, 2007). Ainsi la combinaison eau/solvant organique permet d'avoir un milieu à polarité modérée qui accreue l'extraction des polyphénols (Lapornik *et al.*, 2005).



**Fig. N°28: Teneur en phénols totaux des extraits des écorces de grenade par rapport au solvant d'extraction**

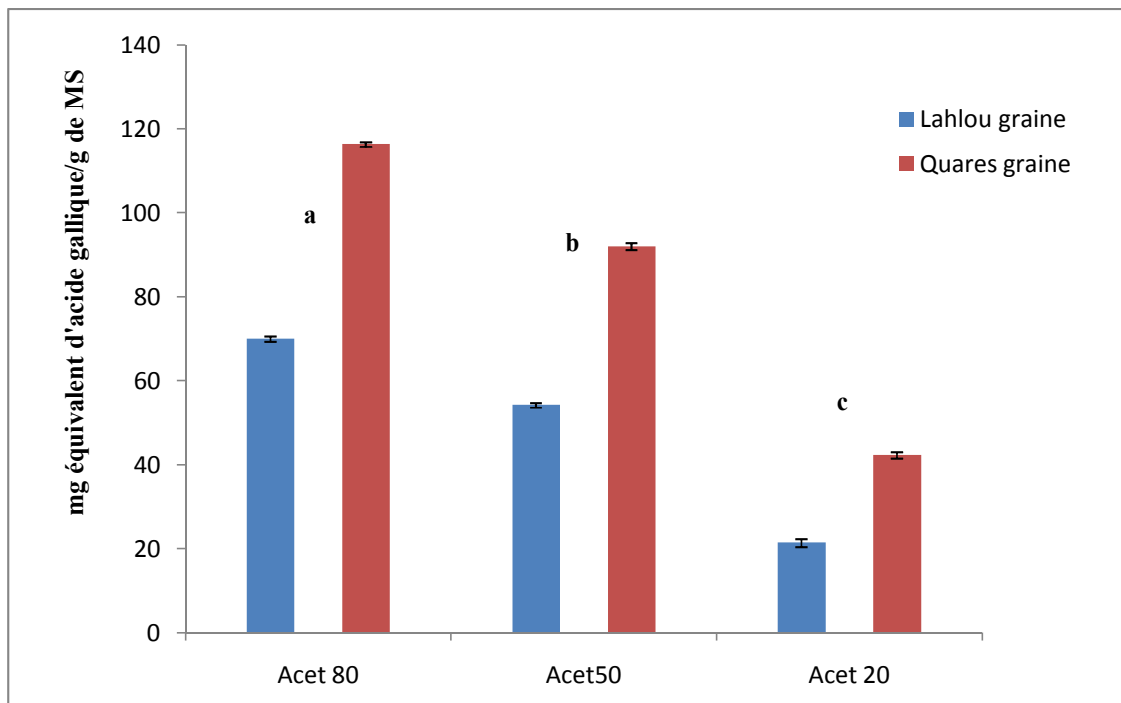
Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype. Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0,05$ ).

L'acétone étant le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques des deux variétés de grenades étudiées, on a étudié l'effet du ratio acétone : eau sur le rendement d'extraction. Trois concentrations ont été étudiées : acétone 80%, acétone 50% et acétone 20%. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures N°29 et N°30.

La concentration de l'acétone dans l'eau affecte significativement ( $p \leq 0,05$ ) la teneur en polyphénols de l'extrait obtenu. Nous remarquons que l'acétone 20% est le solvant le moins efficace pour les deux variétés que ce soit pour les écorces ou pour les graines.

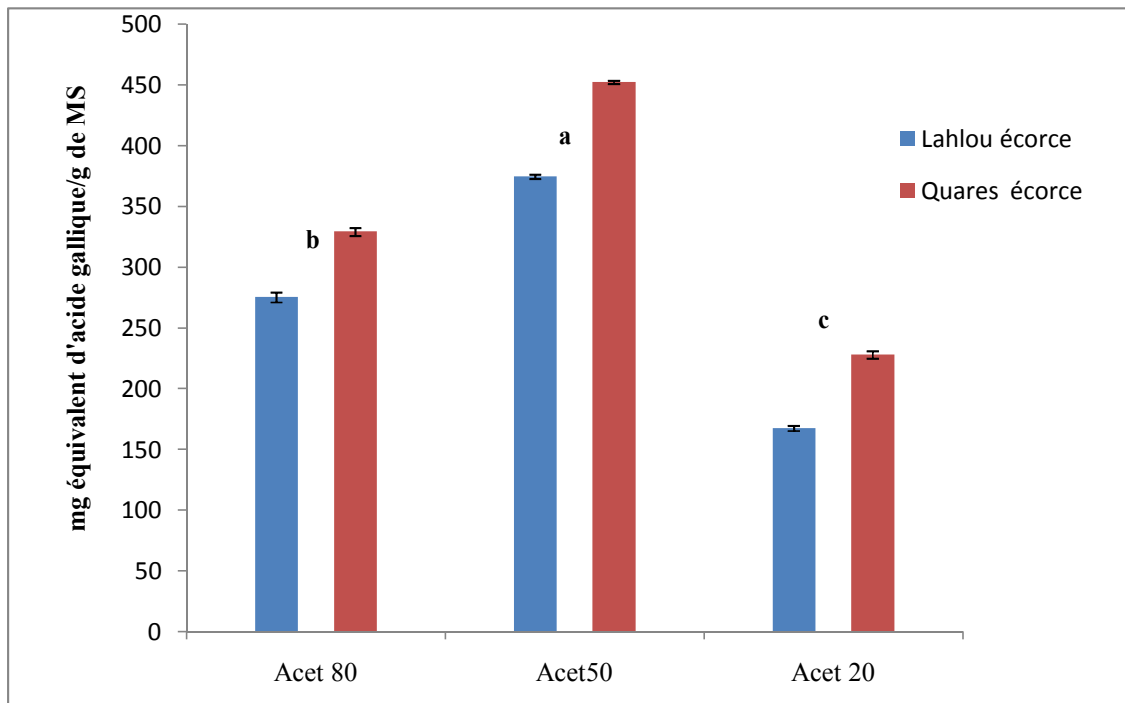
Pour les graines des deux variétés de grenades, l'acétone 80% donne un meilleur rendement suivi de l'acétone 50% et de l'acétone 20%.

Alors que pour les écorces des deux variétés de grenades, l'acétone 50% donne un meilleur rendement suivi de l'acétone 80% et de l'acétone 20%.



**Fig. N°29: Teneur en phénols totaux des extraits acétoniques (20, 50 et 80%) des graines de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais ( $n=3$ ) avec  $\pm$  l'écartype. Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0,05$ ).



**Fig. N°30: Teneur en polyphénols totaux des extraits acétoniques (20, 50 et 80%) des écorces de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype. Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0,05$ ).

Shi *et al.* (2003) avancent qu'un ratio solvant : eau (50 : 50) extrait peu de tannins à partir des échantillons contenant un taux d'humidité élevé (80 à 90% d'eau) alors que ce même solvant extrait plus de tannins des matières végétales contenant un taux d'humidité faible. Un ratio de 80 à 95% extrait plus de tannins des matières végétales contenant un taux d'humidité élevé. On peut expliquer cela par le fait que l'eau contenue dans les matières fraîches agit comme un diluant et diminue la quantité du solvant organique dans le mélange aqueux.

Il est mentionné dans la littérature qu'une concentration de 70% de méthanol est nécessaire pour inactiver la polyphénol oxydase. La faible teneur en phénols totaux des extraits d'acétone 20% pourrait être due à l'action de cette enzyme qui n'a pas été inhibée en raison de la faible concentration d'acétone (Chirinos *et al.*, 2007).

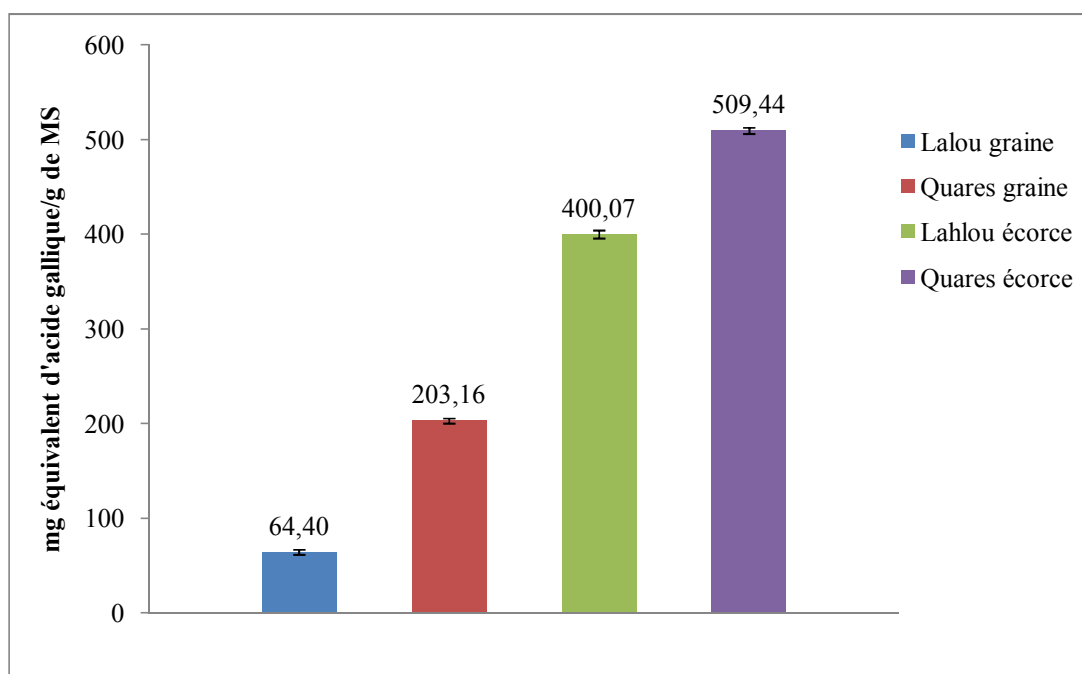


## 6. Dosage des composés phénoliques de l'extrait final

L'extrait final est obtenu en utilisant l'acétone 80% et l'acétone 50% pour extraire les composés phénoliques des graines et des écorces de grenade des deux variétés. Ces extraits ont été utilisés pour le dosage des phénols totaux, tannins, flavonoïdes et l'évaluation de leur activité antioxydante.

### 6.1. Les phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits est estimée à l'aide de la méthode du Folin-Ciocalteu en utilisant une courbe d'étalonnage à l'acide gallique (annexe 1). Les résultats obtenus sont significativement différents ( $p \leq 0,05$ ) et sont représentés dans la figure N°31. La teneur en polyphénols totaux varie de 64,40 à 509,44 mg équivalent d'acide gallique / g de matières sèches.



**Fig. N°31: Teneur en phénols totaux des extraits acétoniques de deux variétés de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype.

L'extrait des graines de la variété *Lahlou* présente la plus faible teneur en phénols totaux. La teneur en polyphénols des graines de la variété *Quares* est trois fois supérieure à celle des graines de *Lahlou*.

Nos résultats sont supérieurs à ceux de Kulkarni et Aradhya (2005), qui ont trouvé une teneur en phénols totaux de 5,06 mg EAG/g de poids frais filtré alors que nos résultats sont respectivement de 14,55 et 46,50 mg EAG/g de poids frais pour les graines de *Lahlou* et de *Quares*. Cette différence s'explique par le fait que les auteurs ont dosé uniquement les polyphénols du jus sans pulpe.

Li *et al.* (2006) mentionnent une teneur en polyphénols totaux de 24,4 mg EAG/g MS dans son étude portant sur l'évaluation des propriétés antioxydante des extraits d'écorce en comparaison aux extraits de pulpe des grenades chinoises. Cette différence peut être expliquée par le fait que les auteurs ont utilisé le méthanol pur comme solvant d'extraction ainsi que la variété, le stade de maturation, le sol, conditions climatiques etc.

Selon l'étude de Çam *et al.* (2009) sur le jus de huit variétés de grenades turques, les jus des variétés sucrés contiennent moins de polyphénols totaux que ceux des variétés acidulés. Cela a été également constaté par Ozgen *et al.* (2008).

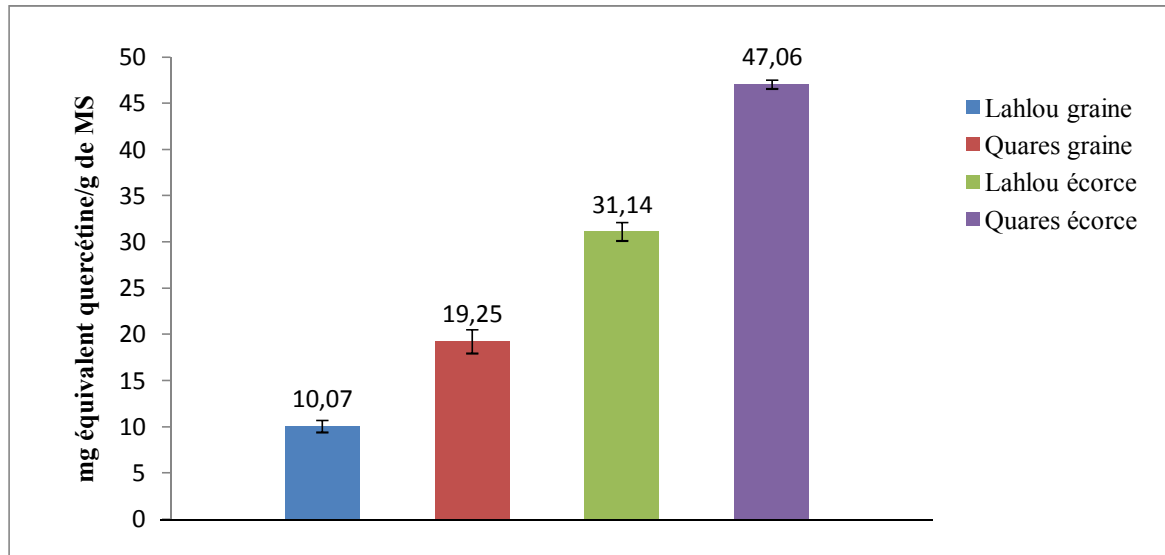
L'écorce de la variété *Quares* présente la plus forte concentration en polyphénols totaux (509,44 mg EAG /g MS) qui est supérieure à celle de l'écorce de la variété *Lahlou* (400,07 mg EAG /g MS).

Ben Nasr *et al.* (1996) rapportent une teneur en phénols totaux de 216,9 mg EAG/g MS pour les écorces de grenades tunisiennes et Li *et al.* (2006) une teneur de 249,4 mg EAG/g MS.

Les écorces sont plus riches en polyphénols totaux que les graines (Mirdehghan *et al.*, 2007). Les grenades de la variété *Quares* sont plus riches en phénols totaux que celles de la variété *Lahlou*.

## 6.2. Les flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage à la quercétine (annexe 1). L'analyse statistique révèle une différence significative entre les variétés et entre graines et les écorces de chacune d'elle.



**Fig. N°32 : Teneur en flavonoïdes des graines et écorces de deux variétés de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype.

La teneur en flavonoïdes est de 10,07 et 19,25 mg EQ/g de matière sèche pour les extrait des graines des deux variétés *Lahlou* et *Quares* respectivement et de 31,14 et 47,06 mg EQ/g MS pour les extraits d'écorces de *Lahlou* et *Quares* respectivement (figure N°32). La variété *Quares* contient plus de flavonoïdes que *Lahlou*.

Nos résultats concordent avec ceux de Li *et al.* (2006), la teneur en flavonoïdes des graines et des écorces de grenade est respectivement  $17,2 \pm 3,3$  et  $59,1 \pm 4,8$  mg équivalent rutine/g de matière sèche. Il en ressort que les écorces sont plus riches en flavonoïdes que les graines.

Cependant, Mousavinejad *et al.* (2009) n'ont pas détecté par HPLC UV-VIS de flavonoïdes autre que les anthocyanines dans le jus de huit variétés de grenade étudiées. Cela pourrait s'expliquer par le fait que lors de la maturation du fruit, la teneur en anthocyanine

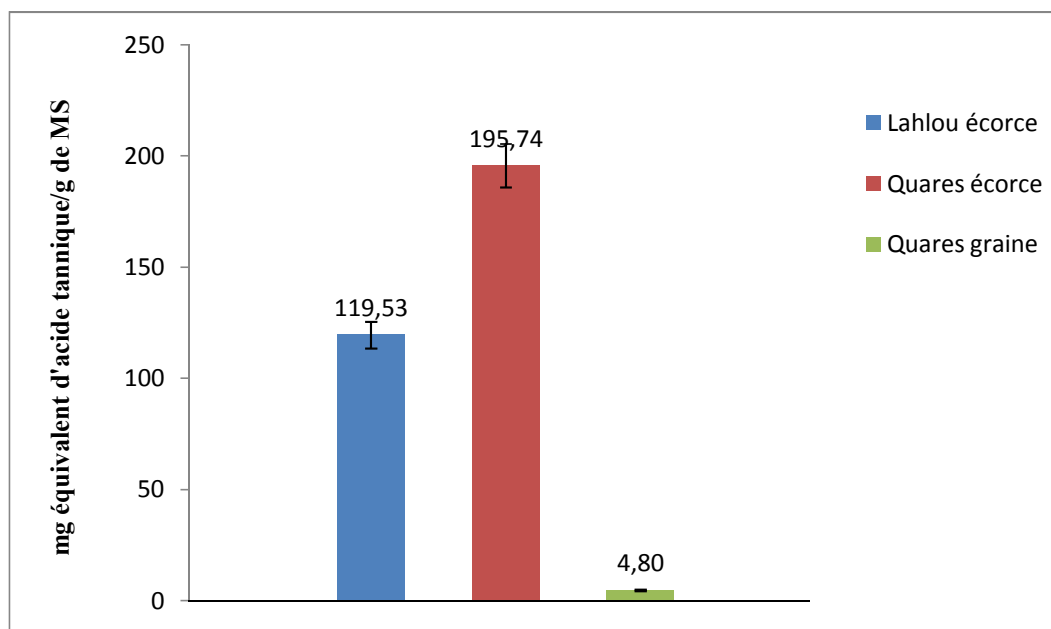
augmente alors que celle des autres composés phénoliques diminue (Mousavinejad *et al.*, 2009)

### 6.3. Les tannins

La teneur en tannins de l'écorce de grenade est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide tannique (annexe 1). Les résultats obtenus sont significativement différents et sont résumés dans la figure N°33.

L'écorce de grenade est connue pour sa saveur astringente, du fait de sa richesse en tanins et il est très utilisé en tannerie traditionnelle.

Dans cette présente étude, l'extraction par l'acétone : eau (50/50) a donné les teneurs suivante : 119,53 mg EAT/g de MS pour les écorces de la variété *Lahlou* et 195,74 mg EAT/g de MS pour les écorces de la variété *Quares*.



**Fig. N°33: Teneur en tannins des écorces des deux variétés de grenade**

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype.

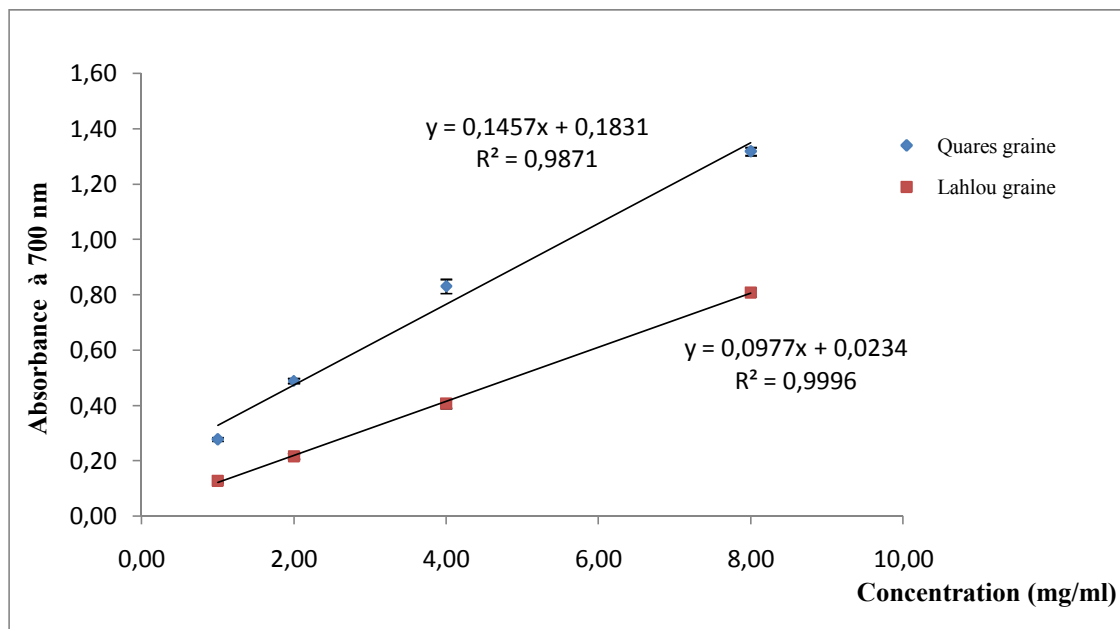
L'extrait des graines la variété *Quares* contient 4,80 mg EAT/g de matière sèche correspondant à 1,1 mg EAT/g de matière fraîche. Alors que les graines de la variété *Lahlou* n'en contiennent pas. L'absence de tannins dans les graines de *Lahlou* pourrait être due à leur très faible teneur et à la sensibilité de la méthode.

Mousavinejad *et al.* (2009) ont trouvé des teneurs en tannins allant de 15 à 22 mg/100 g de jus grenade de huit variétés iraniennes. Gil *et al.* (2000) mentionnent des teneurs en tannins de 417–539 mg/l de jus de grenade expérimental (préparé au laboratoire à partir de grenades fraîches) et commercial.

## 7. Activité antioxydante

### 7.1. Le pouvoir réducteur

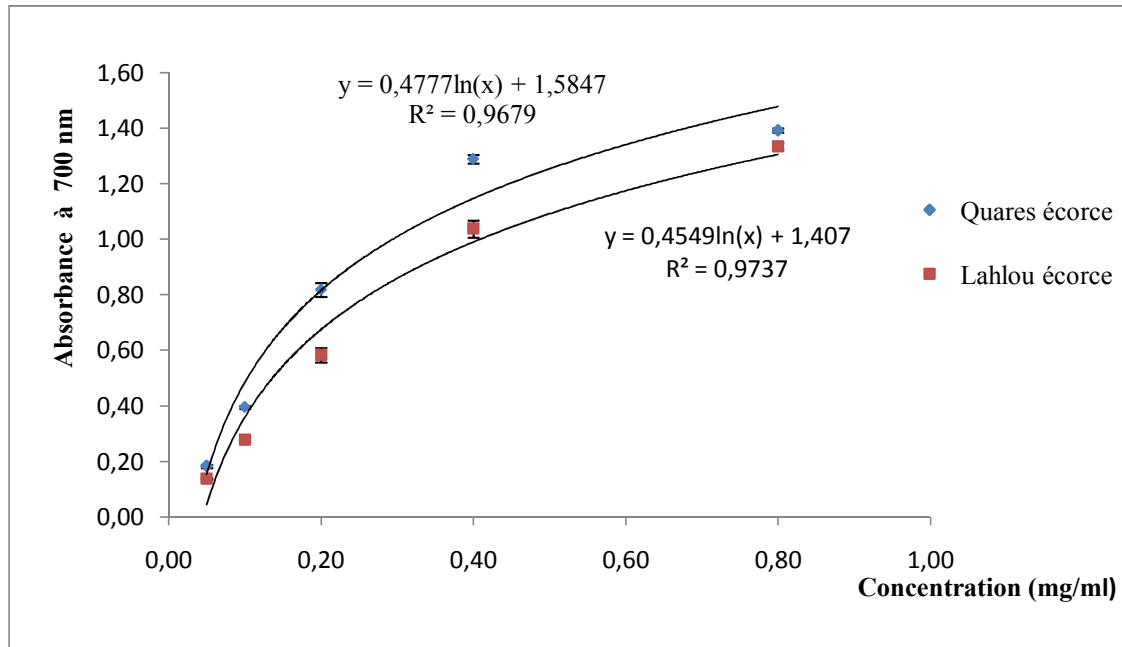
Le potentiel antioxydant des extraits d'écorces et de graines de grenade locale est estimé par la méthode de la réduction du ferricyanure de potassium. Le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants des extraits. Le pouvoir réducteur des extraits est représenté dans les figures N°34 et N°35, il est comparé à celui de deux standards : l'acide gallique et l'acide ascorbique (figure N°36). Le pouvoir réducteur des extraits et des standards augmentent en fonction de la concentration.



**Fig. N°34 : Pouvoir réducteur des extraits de graines des deux variétés de grenade**

Pour les extraits des graines des deux variétés de grenade, leur pouvoir réducteur évolue linéairement selon une droite d'ordre 1 de type  $y = a x + b$ . Les graines de la variété *Quares* présente significativement un pouvoir réducteur 2 fois supérieur que celui des graines

de la variété *Lahlou*. Nous avons observé le même rapport entre la teneur en flavonoïdes de la variété *Quares* et *Lahlou*. Cependant, la teneur en phénols totaux de la variété *Quares* est 3 fois supérieure que celle de *Lahlou*. Il existe une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des graines des deux variétés.



**Fig. N°35 : Pouvoir réducteur des extraits d'écorces des deux variétés de grenade**

Le pouvoir réducteur des extraits d'écorce de grenade et des standards augmente en fonction de la concentration de l'extrait jusqu'à atteindre une valeur limite au-delà de laquelle l'absorbance n'augmente plus. Il répond à une fonction logarithmique (figures N°35 et 36).

L'extrait d'écorce de la variété *Quares* a un pouvoir réducteur 1,5 fois supérieur que celui de l'écorce de la variété *Lahlou*. La variété *Quares* a respectivement une teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins de 1,3 , 1,5 et 1,6 fois supérieure que celle de la variété *Lahlou*, ce qui explique cette différence entre le pouvoir réducteur des deux variétés étudiées et la bonne corrélation entre le pouvoir réducteur des écorces et de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins.

Les écorces des deux variétés présentent un pouvoir réducteur 20 à 30 fois supérieur que celui des graines de la variété *Quares* et *Lahlou* respectivement. Selon Guo et al. (2003)

les écorces des fruits ont une activité de 2 à 27 fois supérieure que celle de leur pulpe. Nos résultats concordent avec ceux de Li *et al.* (2006) et de Naveena *et al.* (2008).

L'acide gallique présente un pouvoir réducteur plus élevé que celui de l'acide ascorbique. Nos extraits ont un pouvoir réducteur très faible par rapport à celui des standards (Fig. N°37). L'acide gallique présente une activité antioxydante 6 et 9 fois plus élevée que celle de l'extrait des écorces de la variété *Quares* et celle de la variété *Lahlou*.

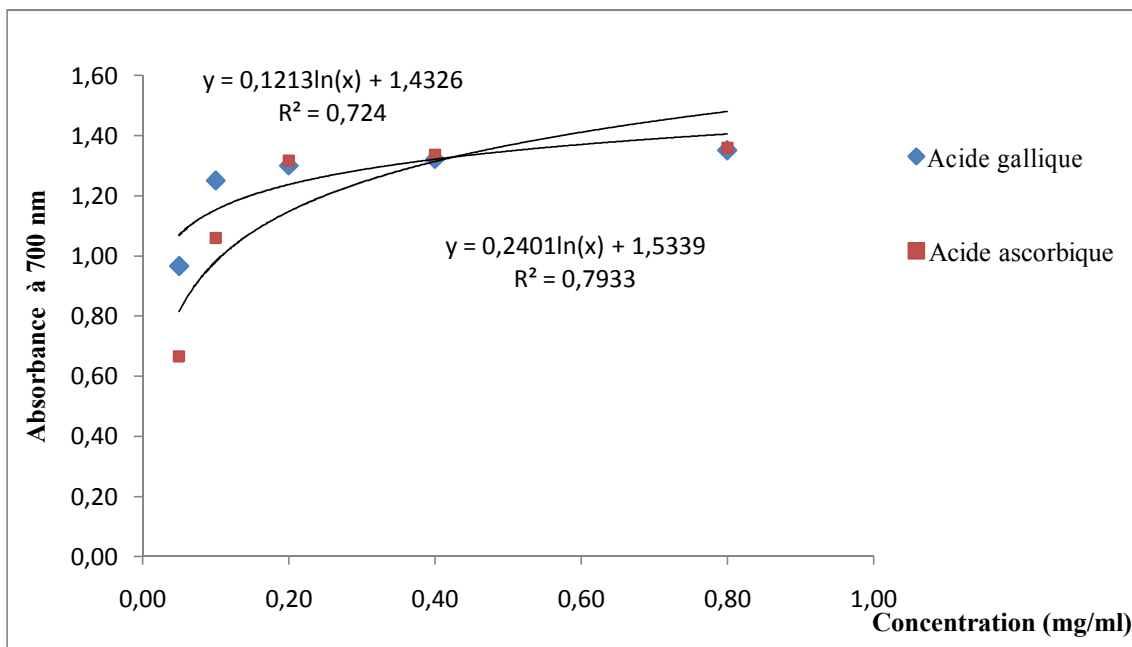


Fig. N°36 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et l'acide gallique

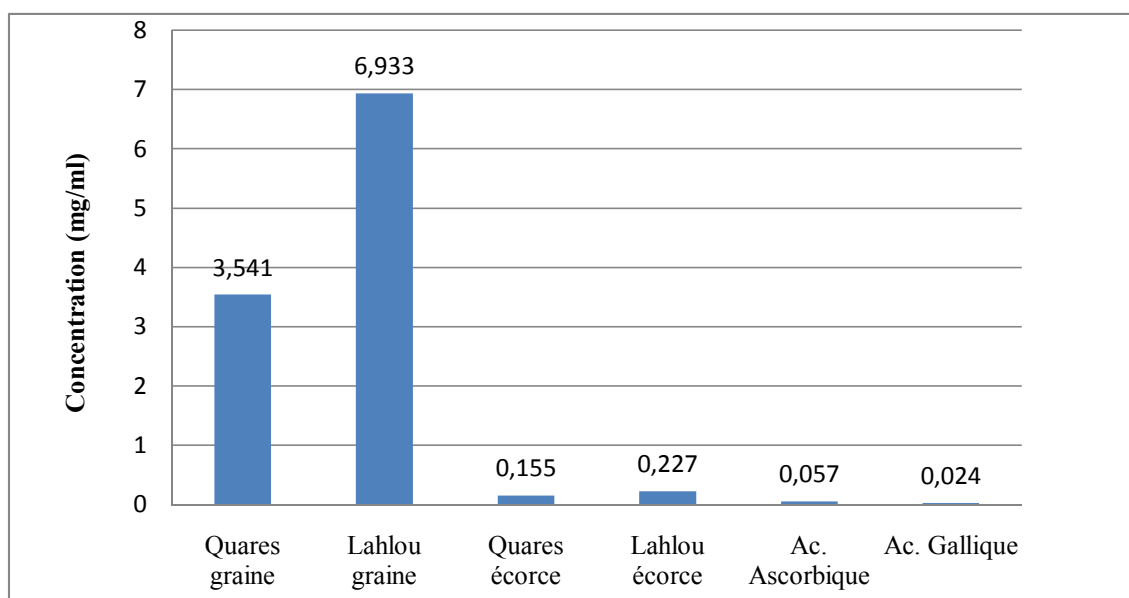
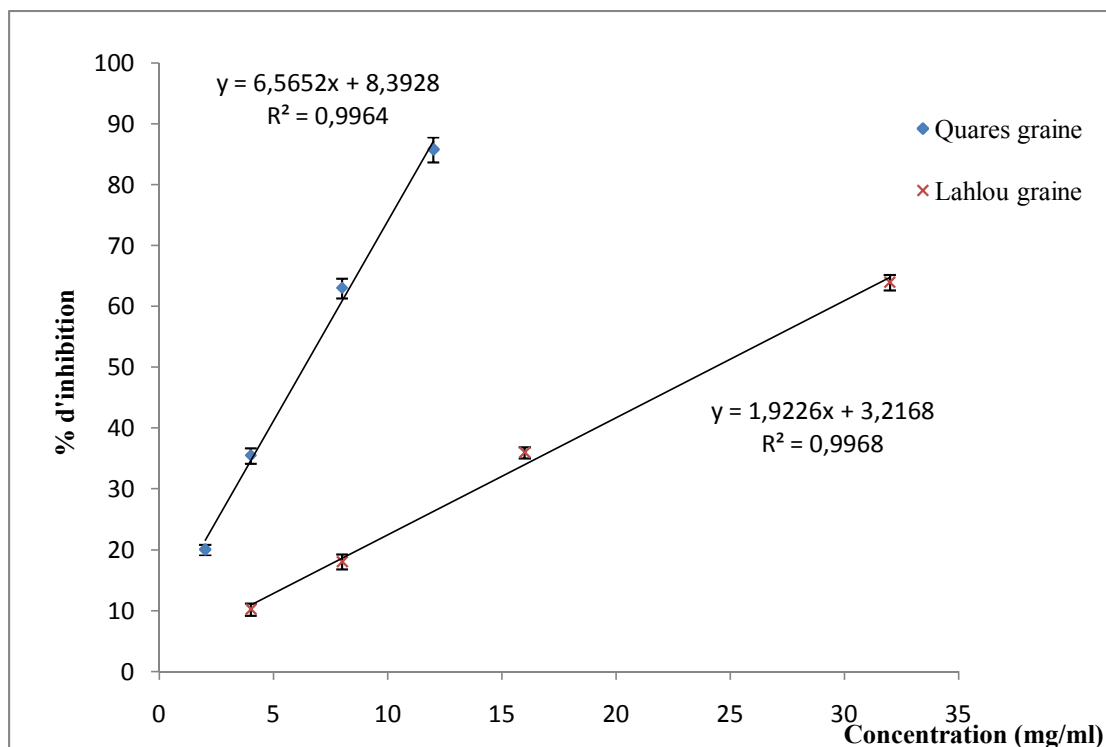


Fig. N°37: Concentrations d'extraits et standards ayant une absorbance de 0,7 à 700 nm

## 7.2. Activité antiradicalaire par la méthode du DPPH

La réaction entre le DPPH et les antioxydants est une réaction de transfert de protons. Cependant, de récentes études suggèrent que c'est une réaction de transfert d'électron (Çam *et al.*, 2009). L'activité antiradicalaire des extraits et des standards vis-à-vis du radical DPPH est représentée dans les figures N°38, 39 et 40. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente en fonction de la concentration.



**Fig. N°38 : Activité antiradicalaire des extraits de graines de grenade**

L'extrait des graines de la variété *Quares* a une activité antiradicalaire significativement supérieure à celle de l'extrait des graines de la variété *Lahlou* (figure N°38).

L'extrait des écorces de la variété *Quares* a une activité antiradicalaire significativement supérieure que celle de l'extrait des écorces de la variété *Lahlou* (figure N°39).



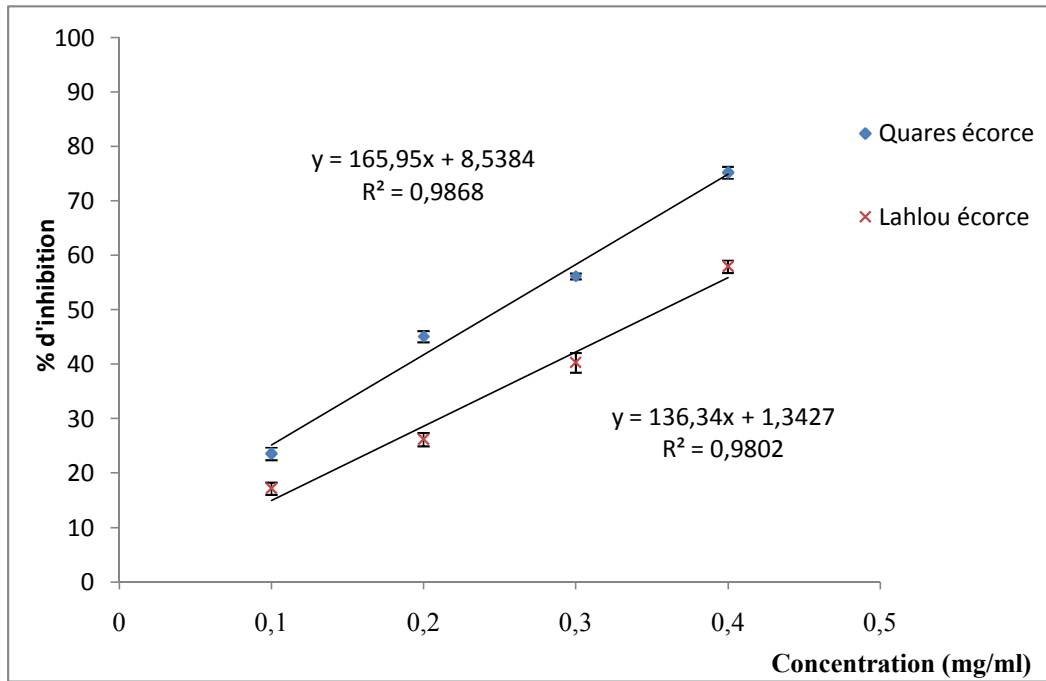


Fig. N°39 : Activité antiradicalaire des extraits d'écorces de grenade

L'activité antiradicalaire de l'acide gallique est 2 fois supérieure que celle de l'acide ascorbique, ce qui concorde avec les résultats du pouvoir réducteur de ces deux standards.

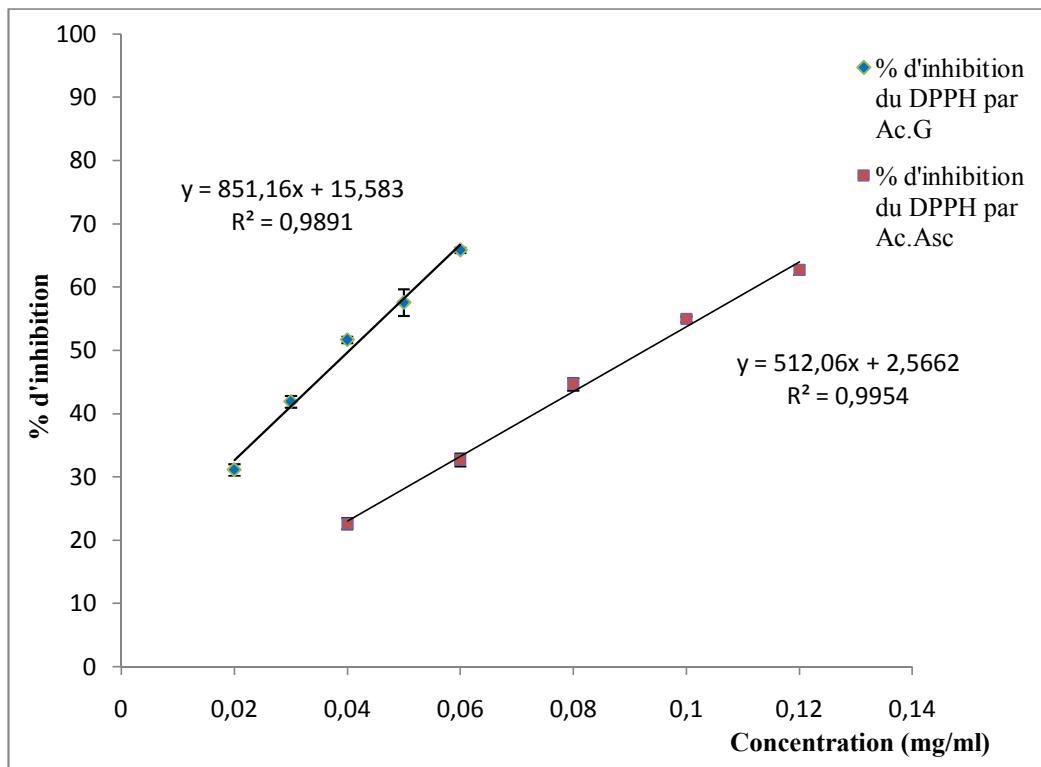
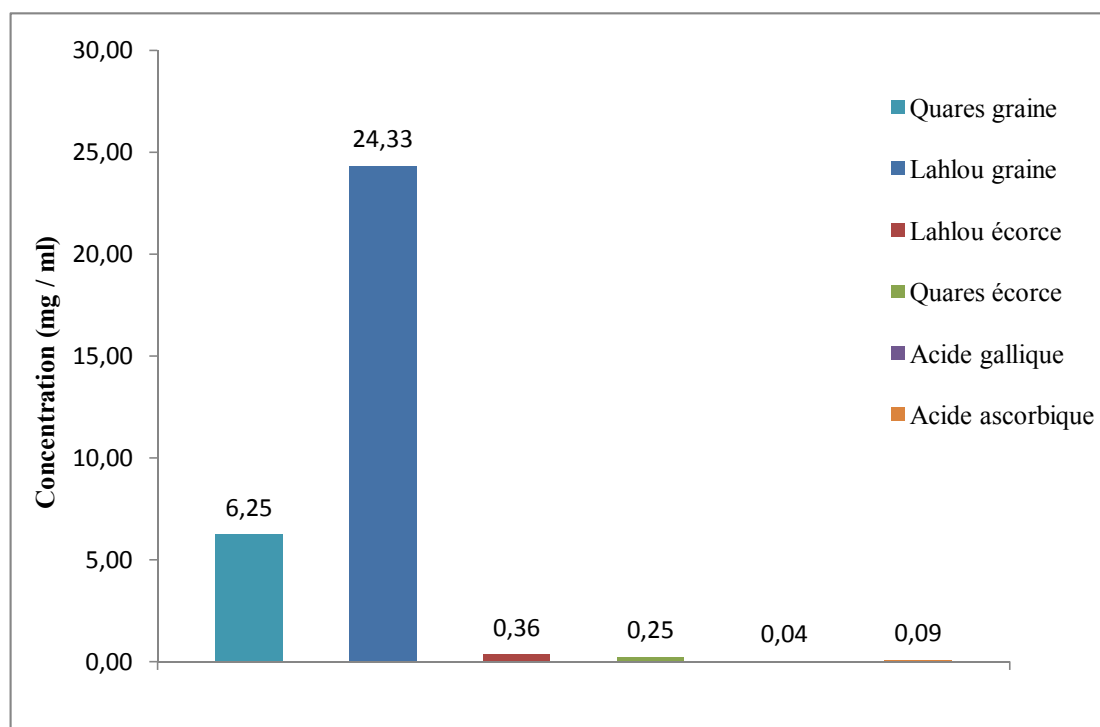


Fig. N°40 : Activité antiradicalaire de l'acide gallique et l'acide ascorbique



**Fig. N°41 : IC<sub>50</sub> des extraits de deux variétés de grenade et de deux standards**

L'IC<sub>50</sub> est la concentration de l'extrait ou du standard ayant un pourcentage d'inhibition du DPPH de 50%. Elle permet de comparer entre l'activité des différents extraits et standards. La figure N°41 représente les différentes IC<sub>50</sub>.

Une faible IC<sub>50</sub> est synonyme d'une activité antiradicalaire élevée. L'acide gallique a la plus faible IC<sub>50</sub> suivi par l'acide ascorbique, l'écorce de la variété *Quares*, l'écorce de la variété *Lahlou*, les graines de la variété *Quares* et les graines de la variété *Lahlou*.

L'activité antiradicalaire de l'extrait des écorces de la variété *Quares* est significativement plus élevée 1,5 fois que celle des écorces de la variété *Lahlou*. On remarque une corrélation entre la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins et l'activité antiradicalaire équivalente à celle du pouvoir réducteur. Cependant, l'activité antiradicalaire de l'extrait des écorces de la variété *Quares* est 9 fois inférieure que celle de l'acide gallique.

Kulkarni *et al.* (2004) rapportent une IC<sub>50</sub> de 8,33 µg/ml pour des extraits méthanoliques des écorces de grenade. Cette forte activité antioxydante est liée à la forte concentration en composés phénoliques.

Les écorces sont plus riches en composés phénoliques que les graines, ce qui fait que leurs activités antiradicalaires soient supérieures que celles des graines (Li *et al.*, 2006).

L'activité antiradicalaire des extraits des graines de la variété *Quares* est plus élevée 3,9 fois que celle des graines *Lahlou*, alors que la teneur en phénols totaux de la variété *Quares* est 3 fois supérieure que celle *Lahlou*. Çam *et al.* (2009) confirment dans leur étude : classification de huit jus de grenade en fonction de leur capacité antioxydante, que le jus d'une variété acidulée de présente une activité antiradicalaire (DPPH) supérieure à celle du jus des variétés sucrées. Ils avancent l'hypothèse que la teneur élevée en acide citrique est responsable de cette forte activité antioxydante.

Notre étude révèle que les extraits de la variété *Quares* ont une activité antioxydante supérieure à celle des extraits de la variété *Lahlou*.

### **7.3. Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate**

Cette méthode est basée sur la réduction du molybdate Mo(VI) en Mo(V) par les substances antioxydantes. Elle présente un avantage d'être une méthode quantitatif car l'activité antioxydante est donnée en mg équivalent d'acide ascorbique/g de matières sèches.

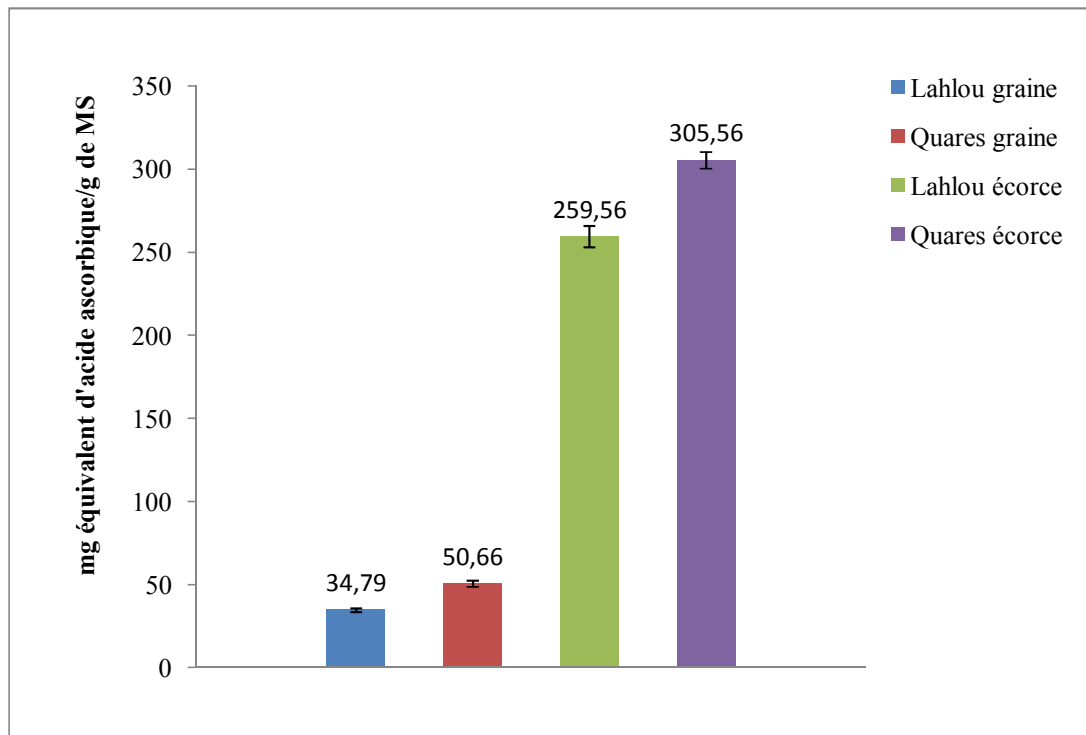
Les résultats de l'activité antioxydante par cette méthode sont illustrés dans la figure N°42. Les valeurs obtenues sont significativement différentes ( $p \leq 0,05$ ), elles varient de 34,79 à 305,56 mg EAA/g MS.

L'extrait de l'écorce de la variété *Quares* a une plus forte activité antioxydante que l'extrait de la variété *Lahlou* avec un rapport de 1,2. De même que l'extrait des graines de la variété *Quares* présente une activité antioxydante 1,4 fois supérieure que celle de l'extrait des graines de la variété *Lahlou*.

Il existe une corrélation entre la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins des extraits des écorces et des graines des deux variétés et l'activité antioxydante par la méthode

du phosphomolybdate. Negi *et al.* (2003) mentionnent une forte activité antioxydante des extraits d'écorces de grenade qui est due à la présence d'une forte teneur en polyphénols.

Les écorces ont une activité largement supérieure à celle des graines. La variété *Quares* présente une activité antioxydante supérieure que celle de *Lahlou*.



**Fig. N°42 : Activité antioxydante par la méthode du phosphomolybdate des extraits acétonique des deux variétés de grenade**

---

# CONCLUSION

---

La grenade, fruit des dieux, suscite actuellement beaucoup d'intérêts de part le monde. Elle a été délaissée par les agriculteurs et consommateurs algériens, malgré toutes les vertus qu'elle renferme. Son apport bénéfique à la santé et son utilisation dans la médecine traditionnelle algérienne sont bien reconnus.

La détermination des caractéristiques morphologiques est réalisée dans un but agronomique et technologique. La variété *Lahlou* se caractérise principalement par un fruit de poids élevé ( $327,93 \pm 74,07$  g) et un gout sucré (pH 4,5), idéale pour la commercialisation directe au consommateur. Par contre, la variété *Quares* se caractérise par un fruit de poids moyen ( $198,69 \pm 40,40$  g) et d'un gout acidulé (pH 3,0), idéale pour la production industrielle de jus (pH très faible permettant une meilleure conservation).

En ce qui concerne la partie extraction des composés phénoliques, il en ressort que l'acétone est le meilleur solvant d'extraction pour les deux variétés étudiées. Pour les graines, l'acétone 80% donne le meilleur rendement suivi de l'acétone 50% et de l'acétone 20%. Alors que, l'acétone 50% donne un meilleur rendement pour l'écorce suivi de l'acétone 80% et de l'acétone 20%.

La teneur en phénols totaux des extraits des graines et d'écorces varie de 64,40 à 509,44 mg équivalent d'acide gallique (EAG) / g de matière sèche. L'écorce de la variété *Quares* présente la plus forte concentration en phénols totaux (509,44 mg EAG /g MS) qui est largement supérieure à celle de l'écorce de la variété *Lahlou* (400,07 mg EAG /g MS). Les graines de la variété *Quares* contiennent 203,16 mg EAG /g MS alors que les graines de la variété *Lahlou* n'en contiennent que 64,40 mg EAG /g MS.

L'écorce de la grenade est connue pour sa saveur astringente, du fait de sa richesse en tannins. L'extraction par l'acétone : eau (50/50) a donné des teneurs en tanins de 119,53 et 195,74 mg EAT/g d'extrait sec des écorces de la variété *Lahlou* et *Quares* respectivement.

Les graines de la variété *Quares* présentent significativement un pouvoir réducteur plus fort que celui des graines de la variété *Lahlou*. L'extrait d'écorce de la variété *Quares* a un pouvoir réducteur 1,5 fois supérieur que celui de l'écorce de *Lahlou*.

Les extraits des graines et des écorces de la variété *Quares* ont une activité antiradicalaire supérieure à celle des graines et écorces de la variété *Lahlou*. L'activité antiradicalaire de l'extrait des écorces de la variété *Quares* est plus élevée : 1,5 fois que celle de la variété *Lahlou*.

Les résultats obtenus sont en grande partie en accord avec les publications parues dans ce domaine. La variété *Quares* présente beaucoup plus de composés phénoliques que la variété *Lahlou* que ce soit dans les graines ou dans les écorces ; son activité antioxydante est également supérieure à celle de la variété *Lahlou*.

L'écorce de grenade contient des quantités considérables en composés phénoliques, ce qui fait de ce sous-produit une source importante en substances actives qui peuvent avoir des applications dans le domaine alimentaire, cosmétique, pharmaceutique ...

Ce travail reste préliminaire et doit être complété par :

- Détermination des conditions optimales de l'extraction des composés phénoliques (temps, température, pH, ... ) ;
- Modélisation mathématique et simulation de l'extraction des composés phénoliques ;
- Fractionnement et identification des composés phénoliques ;
- Détermination d'autres activités biologiques des extraits de grenade ;
- Elargir le champ de l'étude à d'autres régions et variétés ainsi que la caractérisation génétique des grenades algériennes ;
- L'étude de leurs activités et leur toxicité in vivo.

---

# **Références bibliographiques**

---



**Anonyme (2010). Plants profile : *Punica granatum*.** Natural Resource Conservation Service, United States Department of Agriculture. [www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov). Date de consultation : juin 2010

**Abbasi H., Rezaei K. et Rashid L. (2008).** Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO<sub>2</sub>. J Am Oil Chem Soc, 85: 83–89.

**Abdel-Hameed E.-S. S. (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry, 114 : 1271–1277

**Alighourchi H. et Barzegar M. (2009).** Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. Journal of Food Engineering 90 : 179–185.

**Alothman M., Bhat R. et Karim A. A. (2009).** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry, 115 : 785–788

**Amjad H. (2005).** POMEGRANATE : Anatomy Of A Divine Remedy. éd Lulu.com, 126 p, ISBN : 1411662784.

**Ardestani A. et Yazdanparast R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. Food Chemistry, 104 : 21–29

**Al-Said F.A., Opara L.U. et Al-Yahyai R.A. (2009).** Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. Journal of Food Engineering 90 : 129–134

**Ben Nasr C., Ayed N. et Metche M. (1996).** Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. Z Lebensm Unters Forsch, 203:374-378.

**Borochoy-Neori H., Judeinstein S., Tripler E., Harari M., Greenberg A., Shomer I. et Holland D. (2009).** Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Journal of Food Composition and Analysis 22 : 189–195.

**Boukerouis D. (2008).** Caractérisation de l'activité antioxydante de *Pistacia lentiscus* et *fraxinus angustifolia*. Thèse Université de Béjaia.

**Boullard B. (1997).** Dictionnaire plantes et champignons. Edition ESTEM, Paris, p : 380. ISBN : 2-909455-99-8.

**Braca A., Tommasi N. D., Bari L. D., Pizza C., Politi M. et Morelli I. (2001).** Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64 : 892–895

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> ed., Technique et documentation Lavoisier, p : 286-347.

**Bruneton J. (1993).** Composés : Shikimate-acétates. In : Pharmacognosie « Phytochimie, Plantes médicinales ». 3<sup>ème</sup> ed., Technique et documentation Lavoisier, p :199-383.

**Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M. et Velic D. (2007).** Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81 : 236–242

**Çam M., Hisil Y. et Durmaz G. (2009).** Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112 : 721–726

**Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. L., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A. et Galán-Vidal C. A. (2009).** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113 : 859–871.

**Chong J., Poutaraud A. et Hugueney P. (2009).** Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177 : 143–155.

**Derin K. et Eti S. (2001).** Determination of Pollen Quality, Quantity and Effect of Cross Pollination on the Fruit Set and Quality in the Pomegranate. *Turk J Agric For*, 25 : 169-173.

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

**Fabre B. et Ermosilla V. (2008).** Utilisation d'un extrait de grenadier pour le maintien de la coloration capillaire. Fascicule de brevet européen. Bulletin 2008/01.

**Fadavi A., Barzegar M. et Azizi M. H. (2006).** Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 : 676–680.

**Fuhrman B. et Aviram M., (2006).** Protection against Cardiovascular Diseases. In : *Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine*. Seeram N. P., Risa N. S., Heber D. Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.

**Gil M. I., Toms-Barbern F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. et Kader A. A. (2000).** Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 4581-4589.

**Giusti M. M. et Wrolstad R. E. (2003).** Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14 : 217–225.

**Goli A. H. Barzegar M., et Sahari M. A. (2004).** Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92 : 521–525.

**Goor A. (1967).** The history of the pomegranate in the holy land. *Economic Botany*. 21: 215-230.

**Guignard J. L. (1996).** Les composés phénoliques. *Biochimie végétale*. Edition Masson, Paris, p : 167-231.

**Guo C., Wei J., Yang J., Xu J., Pang W. et Jiang Y. (2008).** Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research*, 28 : 72–77.

**Guo C., Yang J., Wei J., Li Y., Xu J. et Jiang Y. (2003).** Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23 : 1719–1726.

**Hagerman A. E. et Butler L. G. (1989).** Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of chemical ecology*, 15 (6): 1795-1810.

**Hagerman A.E. et Butler L.G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. *Journal agriculture and Food Chemistry*, 26 (4): 809-812.

**Haidari M., Ali M., Casscell S.W. et Madjid M. (2009).** Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has asynergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 16 : 1127–1136.

**Harborne J. B. et Williams C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55 : 481–504.

**Hartman R. E., Shah A., Fagan A. M., Schwetye K. E., Parsadonian M., Schulman R. N., Finn M. B. et Holtzman D. M. (2006).** Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 24 : 506–515.

**Haslam E. (2007).** Review : Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68 : 2713–2721.

**Havsteen B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96 : 67– 202.

**Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105 : 1126–1134.

**Heber D. (2006).** Preface. In : *Pomegranates Ancient Roots to Modern. Medicine* CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN: 0-8493-9812-6.

**Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

**Hubbard J. C. et Clay H. F. (1977).** Punicaceae. In: *Tropical exotics*. Ed. University of Hawaii press. 125 p. ISBN : 0824811283.

**Iserin P. (2001).** Encyclopédie des Plantes Médicinales : identification, préparation, soin. 2<sup>ème</sup> édition, Larousse. 335p, ISBN: 2-03-560252-1.

**Jahfar M., Vijayan K.K. et Azadi P. (2003).** Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. Research Journal of Chemistry and Environment, 7 : 43–50.

**Jia D., Yao K., Tan W. et He Q. (2006).** Optimization of Extraction Conditions of Polyphenols from Pomegranate Peel. Chemistry and Industry of Forest Products, Vol. 26 No. 3: 124-126.

**Kaur G., Jabbar Z., Athar M. et Alam M. S. (2006).** *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology, 44 : 984–993.

**Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. et Lansky E. Kingsly A.R.P., Singh D.B., Manikantan M.R. et Jain R.K. (2006).** Moisture dependent physical properties of dried pomegranate seeds (Anardana). Journal of Food Engineering 75 : 492–496.

**Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. et Lansky E. (2002).** Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 71: 203–217.

**Kulkarni A. P. et Aradhya S. M. (2005).** Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. Food Chemistry 93 : 319–324.

**Kulkarni A. P., Aradhya S. M. et Divakar S. (2004).** Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant : punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. Food Chemistry, 87 : 551–557.

**Kumaran A. et Karunakaran R. J. (2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT, 40 : 344–352.

**Lansky E. et Newman R. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 177–206.

**Lansky E., Shubert S. et Neeman I. (2000).** Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. In : **Melgarejo-Moreno P. (ed.), Martínez-Nicolás J.J. (ed.), Martínez-Tomé J. (ed.)** Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology, Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 2000. 253 p. ISBN 2-85352-214-8.

**Lapornik B., Prosěk M. et Wondra A.G. (2005).** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214-222.

**Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. et Cheng S. (2006).** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96 : 254–260.

**Lloyd J. U. (1897).** *Punica granatum*. The western druggist, Chicago, 9 p.

**Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. (2007).** Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103 : 839–846.

**Orake H. H. (2009).** Evaluation of antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and its sour concentrate processed by conventional evaporation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(1) : 1-11.

**Oukabli A. (2004).** Le Grenadier : *Des Variétés Performantes pour la Culture*. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. MADRPM/DERD, 123 : 1-4.

**Ozgen M., Durgaç C., Serçe S. et Kaya C. (2008).** Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111 : 703–706.

**Petti S. et Scully C. (2009).** Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry* 37 : 413–423.

**Pietta P.-G. (2000).** Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63 : 1035-1042.

**Prasain J. K., Wang C. et Barnes S. (2004).** Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Photoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. Serial Review Editor: Catherine Rice-Evans. *Free Radical Biology & Medicine*, 37 : 1324–1350.

**Macheix J. J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.H. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 190 p. ISBN : 2-88074-625-6.

**Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N. et Mukhtar H. (2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *PNAS*, 102 : 14813–14818  
**Shi J., Yu J., Pohorly J. et Young J. C. (2003).** Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environement*, 1(2) : 42-47.

**Mars M. et Marrakchi M. (1999).** Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46: 461–467.

**Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304–315.

**Martinez J.J., Melgarejo P., Hernandez Fa., Salazar D.M. et Martinez R. (2006).** Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. *Scientia Horticulturae* 110 : 241–246.

**Meerts I.A.T.M., Verspeek-Rip C.M., Buskens C.A.F., Keizer H.G., Bassaganya-Riera J., Jouni Z.E., Van Huygevoort A.H.B.M., Van Otterdijk F.M. et Van de Waart E.J. (2009).** Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Chemical Toxicology* 47 : 1085–1092.

**Mirdehghan S. H. et Rahemi M. (2007).** Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae* 111 : 120–127.

**Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 27 : 152-159.

**Morton J. (1987).** Pomegranate. In: *Fruits of warm climates*. Miami, Florida. p. 352–355.

**Mousavinejad I., Emam-Djomeh Z., Rezaei K. et Khodaparast M. H. H. (2009).** Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, *Food Chemistry*, 115 : 1274–1278.

**Naczk M. et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.

**Naveena B.M., Sen A.R., Vaithyanathan S., Babji Y. et Kondaiah N. (2008).** Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80 : 1304–1308.

**Negi P.S., Jayaprakasha G.K. et Jena B.S. (2003).** Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80 : 393–397.

**Neurath A. R., Strick N., Li Y.-Y. et Debnath A. K. (2004).** *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*, 4:41.

**Ranade S.A., Rana T.S. et Narzary D. (2009).** SPAR profiles and genetic diversity amongst pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(1) : 61-70.

**Ribereau–Gayon P. et Gautheret R.-J. (1986).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition : Dunod, Paris, 273 p.

**Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribereau–Gayon P. (1982).** Composés phénoliques. «Traité d'œnologie, sciences et techniques du vin». Edition : Dunod, 477-499.

**Reichardt C. (1989).** *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH Publishers, 2nd ed., 1988.



**Robards K. et Antolovich M. (1997).** Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. *Analyst*, 122: (11R–34R).

**Seeram N. P., Risa N. S. et Heber D. (2006).** Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.

**Seerama N. P., Adamsa L. S., Henninga S. M., Niu Y., Zhang Y., Nair M. G. et Heber D. (2005).** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 : 360–367.

**Seeram N. P., Zhang Y., Reed J. D., Krueger C. G. et Vaya J. (2006).** Pomegranate Phytochemicals. In : Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine. **Seeram N. P., Risa N. S., Heber D.** Medicine CRC Press Taylor & Francis Group Medicinal and aromatic plants–industrial profiles, 263p, ISBN : 0-8493-9812-6.

**Sharma S .D. et Sharma V.K . (1990).** Variation for chemical characters in some promising strains of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) *Euphytica* 49 : 131-133. Kluwer Academic Publishers . Printed in the Netherlands.

**Sheets M.D., Du Bois M.L. et Williamson J.G. (1994).** The Pomegranate. HS, 44: 1-3. Horticultural Sciences Department, Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Original publication date April 1994. Revised April 2004. Reviewed December 2008.

**Shwartz E., Glazer I., Bar-Ya'akov I., Matityahu I., Bar-Ilan I., Holland D. et Amir R. (2009).** Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry* 115 : 965–973.

**Socha R., Juszczak L., Pietrzyk S. et Fortuna T., (2009).** Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chemistry*, 113 : 568–574.

**Souci S.W., Fachman W. et Krant H. (1994).** Pomegranate. In : Food composition and nutrition tables. 5<sup>ème</sup> ed., CRC Press, London, 1088 p. ISBN : 0-8493-7550-9.

**Spichiger R.-E., Savolainen V. V., Fig M. et Jeanmonod D. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 2<sup>ème</sup> éd., Presse Polytechniques et universitaires, Lausanne, p : 286-287. ISBN : 2-88074-502-0.

**Spigno G., Tramelli L. et De Faveri D. M. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 : 200–208.

**Stover E. et Mercure E. W. (2007).** The Pomegranate : A New Look at the Fruit of Paradise *HortScience*, 42(5) : 1088-1092.

**Syed D. N., Afaq F. et Mukhtar H. (2007).** Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, 17 : 377–385.

**Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G. et Mathé G. (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*, 56 : 200-207.

**Tezcan F., Gültekin-Özgülven M., Diken T., Özçelik B. et Bedia Erim F. (2009).** Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115 : 873–877.

**Turk G., Sonmez M., Aydin M., Yuce A., Gur S., Yuksel M., Aksu E. H. et Aksoy H. (2008).** Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clinical Nutrition*, 27 : 289-296.

**Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F. et Polat G. (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12 : 484-496.

**Turkmen N., Sari F. et Sedat Velioglu Y. (2006).** Analytical, Nutritional and Clinical Methods : Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99 : 835–841.

**Vidal A., Fallarero A., Peña B. R., Medina M. E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y. et Vuorela P. M. (2003).** Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 89 : 295–300.

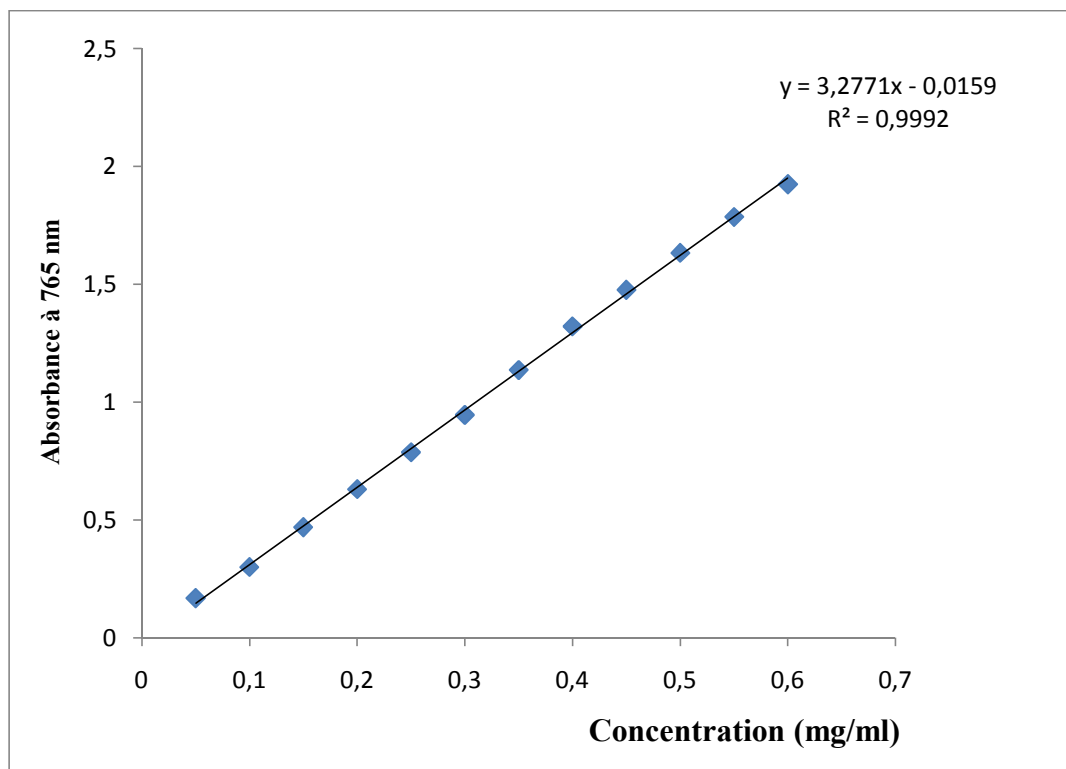
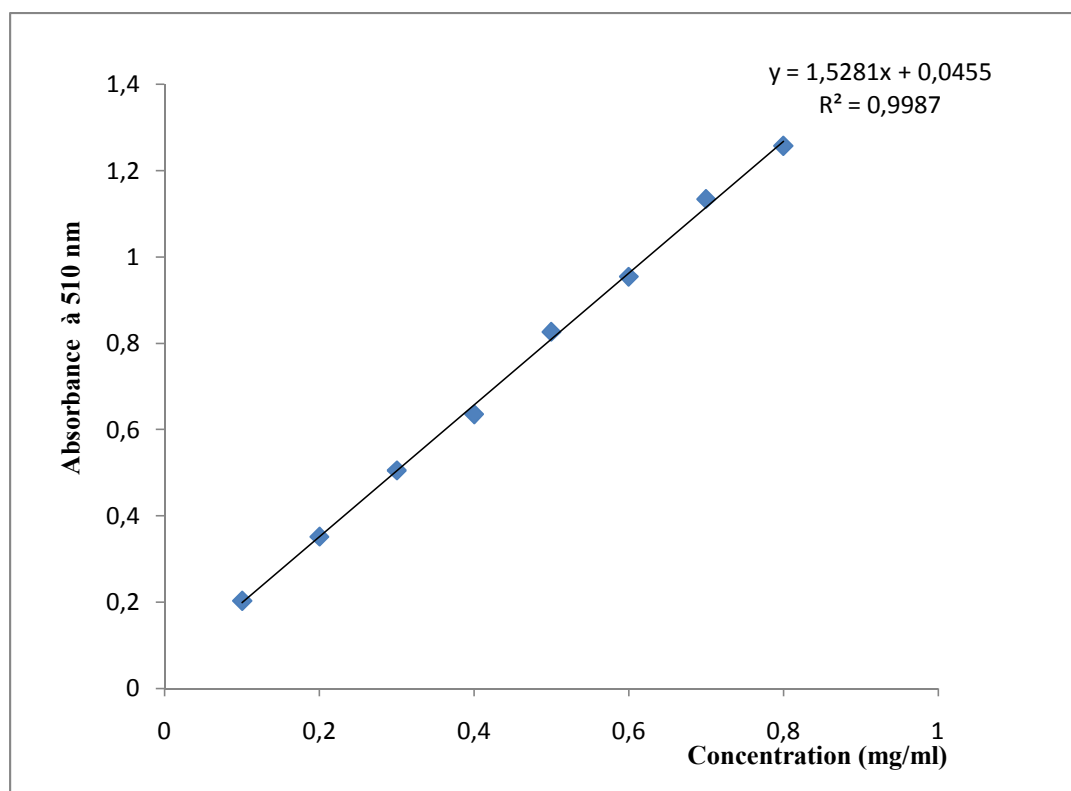
**Walter J. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. et Stevens P. (2002).** Botanique systématique une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université S. A., Paris, p : 318-320. ISBN : 2-7445-01239.

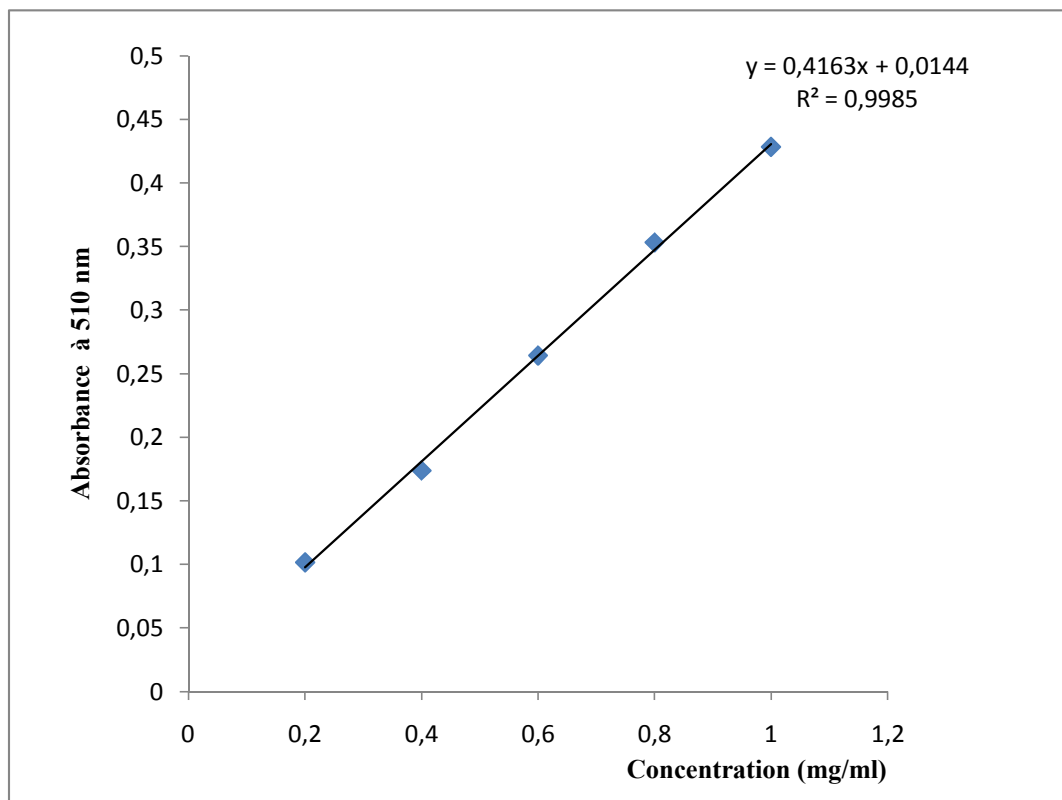
**Zhishen J., Mengcheng T. et Jianming W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64 : 555–559.

---

# ANNEXES

---

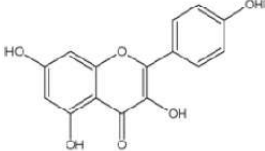
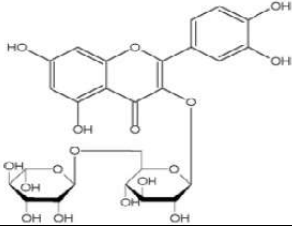
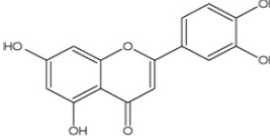
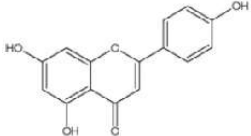
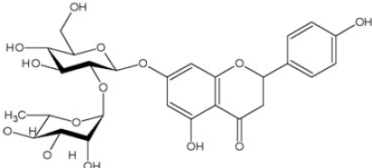
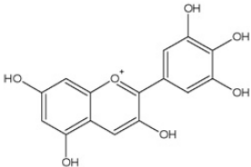
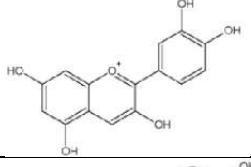
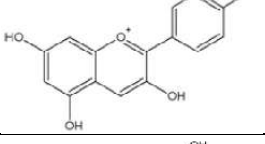
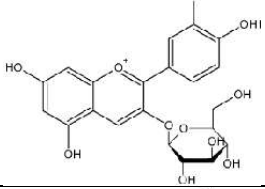
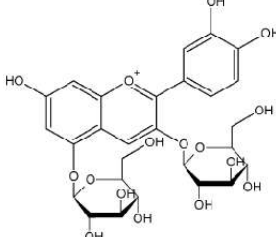
**Annexe 1 : Courbes d'étalonnages****Fig. N°1: Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux****Fig. N°2: Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins**



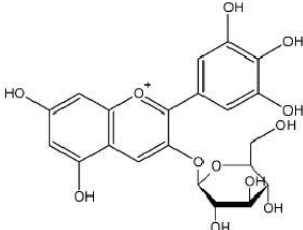
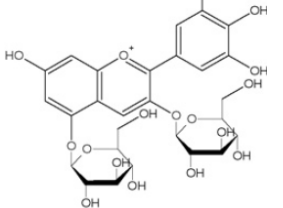
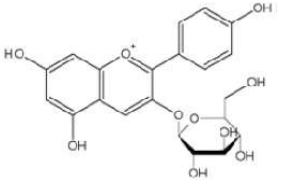
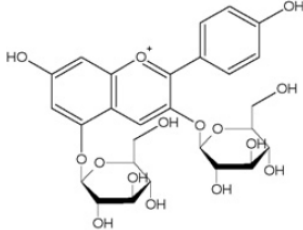
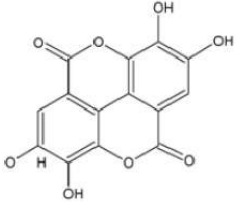
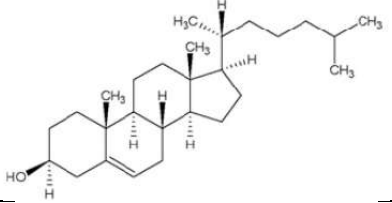
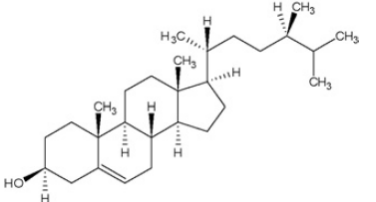
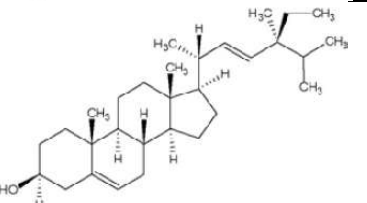
**Fig. N°3: Courge d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes**

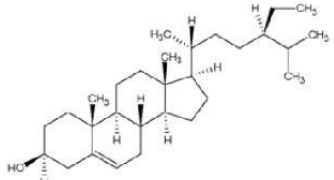
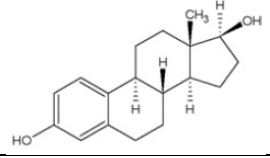
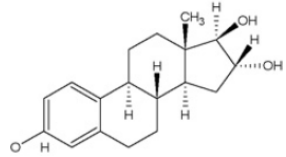
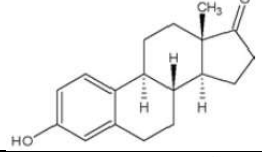
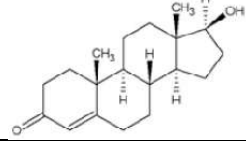
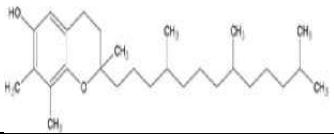
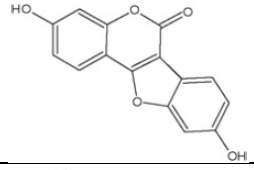
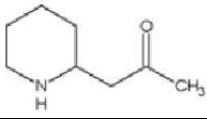
**Annexe 2 : Structure chimique de quelques composés de *Punica granatum* L. (Lansky et Newman, 2007)**

Nom du composé	Classe chimique	Structure chimique
Acide citrique	Acide organique	
Acide malique	Acide organique	
Acide tartrique	Acide organique	
Acide gallique	Acide hydroxbenzoïque	
Acide caféique	Acide hydroxbenzoïque	
Acide quinique	Acide cyclitol carboxylique	
Acide <i>p</i> -coumarique	Acide hydroxycoumarique	
Catéchine	Flavan-3-ols	
Epicatéchiné	Flavan-3-ols	
Quercétine	Flavonol	

Kaempferol	Flavonol	
Rutine	Flavonol	
Luteoline	Flavone	
Apigénine	Flavone	
Naringine	Flavanone	
Delphinidine	Anthocyanidine	
Cyanidine	Anthocyanidine	
Pelargonidine	Anthocyanidine	
Cyanidine 3-O-glucoside	Anthocyanine	
Cyanidine 3,5-di-O-glucoside	Anthocyanine	



Delphinidine 3- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	 <p>The structure shows a delphinidin cation (a flavan-3-ol with a positive charge on the oxygen at the 4-position) linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions.</p>
Delphinidine 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	 <p>The structure shows a delphinidin cation with two glucose molecules attached at the 3 and 5 positions of the flavan-3-ol core. Both glucose units are in their cyclic pyranose forms.</p>
Pelargonidine 3- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	 <p>The structure shows a pelargonidin cation (a flavan-3-ol with a positive charge on the oxygen at the 4-position) linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions.</p>
Pelargonidine 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	Anthocyanine	 <p>The structure shows a pelargonidin cation with two glucose molecules attached at the 3 and 5 positions of the flavan-3-ol core. Both glucose units are in their cyclic pyranose forms.</p>
Acide éllagique	Ellagitannin	 <p>The structure shows the core structure of ellagic acid, a naphthoquinone with two lactone rings fused to the naphthalene system. It has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions.</p>
Cholestérol	Stérol	 <p>The structure shows the steroid nucleus of cholesterol with a hydroxyl group at C3, a double bond at C5, and a branched hydrocarbon side chain at C17. The side chain has methyl groups at C13 and C14, and an ethyl group at C17.</p>
Campestérol	Stérol	 <p>The structure shows the steroid nucleus of campesterol with a hydroxyl group at C3, a double bond at C5, and a branched hydrocarbon side chain at C17. The side chain has methyl groups at C13 and C14, and an isopropenyl group at C17.</p>
Stigmastérol	Stérol	 <p>The structure shows the steroid nucleus of stigmasterol with a hydroxyl group at C3, a double bond at C5, and a branched hydrocarbon side chain at C17. The side chain has methyl groups at C13 and C14, and a vinyl group at C17.</p>

$\beta$ -sitostérol	Stérol	
17- $\alpha$ -estradiol	Stéroïde sexuel	
Estriol	Stéroïde sexuel	
Estrone	Stéroïde sexuel	
Testostérone	Stéroïde sexuel	
$\gamma$ -tocophérol	Tocophérol	
Coumestrol	Coumestan	
Pelletiérine	alcaloïde	

## Résumé

Jadis considérée comme le « fruit des dieux », La grenade (*Punica granatum* L.) reçoit un regain d'intérêt sans précédent des chercheurs et des consommateurs. Considérée comme une pharmacie, la grenade est une source de composés phytochimiques à activité thérapeutique connue des anciens et démontrée par les chercheurs des temps modernes. Cette étude concerne deux variétés de grenade de la région de Bejaia *Lahlou* et *Quares*. Elle porte sur la détermination des caractéristiques morphologiques des fruits et des caractéristiques physico-chimiques de leur jus ainsi que sur l'extraction des composés phénoliques à l'aide de 5 solvants (eau, acétone, méthanol, éthanol et acide acétique) et la détermination de l'activité antioxydante par trois méthodes : pouvoir réducteur, DPPH et phosphomolybdate.

Le meilleur solvant d'extraction des polyphénols de grenade est l'acétone 80% pour les graines et l'acétone 50% pour les écorces. La teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins varie de 64,40 à 509,44 mg EAG /g de MS, de 10,07 à 47,06 mg EQ/g de MS et de 119,53 mg à 195,74 mg EAT/g de MS respectivement. L'extrait d'écorce de la variété *Quares* présente la plus forte teneur en composés phénoliques.

Les extraits des graines et des écorces de la variété *Quares* présentent une activité antioxydante supérieure à celle des graines et écorces de la variété *Lahlou*.

**Mots clés :** *Punica granatum* L., polyphénols, flavonoïdes, tannins, pouvoir réducteur, DPPH, phosphomolybdate, extraction liquide-solide.

## Abstract

The pomegranate (*Punica granatum* L.) was considered as the "fruit of gods," receives an unprecedented resurgence of interest from researchers and consumers. Regarded as a pharmacy, the pomegranate is a source of phytochemicals with a therapeutic activity known in the ancient times and proven by scientists of modern times. This study concerns two types of pomegranates in the region of Bejaia *Lahlou* and *Quares*. It is related to the determination of the morphological characteristics of fruits, the physicochemical characteristics of their juices, the extraction of phenolics compounds using five solvents (water, acetone, methanol, ethanol and acetic acid) and the determination of the antioxidant activity by three methods: reducing power, DPPH and phosphomolybdate.

The best solvent for extraction of polyphenols from pomegranate is acetone 80% for arils and acetone 50% for peel. The content of total phenols, flavonoïds and tannins ranged from 64.40 to 509.44 EAG mg / g of DM, 10.07 to 47.06 mg EQ / g DM and 119.53 mg 195.74 mg EAT / g DM respectively. The peel extract of *Quares* variety has the highest content of phenolic compounds.

Aril and peel extracts of *Quares* variety have an antioxidant activity higher than that of Aril and peel of *Lahlou* variety.

**Keywords :** *Punica granatum* L., polyphenols, flavonoïds, tannins, reducing power, DPPH, phosphomolybdate, liquid-solid extraction.