

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT



كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

Département Des Sciences de la matière

Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie organique appliquée

Par :

LASSAKEUR Hadjira

THEME

Etude de l'effet de la fermentation du jus de grenade sur les teneurs des sucres et des phénols totaux et leurs activités antioxydantes

Soutenu publiquement devant le jury composé de:

<i>Mr. YOUSFI Mohamed</i>	<i>Professeur</i>	<i>Président</i>
<i>Mr. DJERIDANE Amar</i>	<i>M.C.A</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mme. BOUSSOUSSA Hadjer</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme. HAMIA Chahrazed</i>	<i>M.C.B</i>	<i>Rapporteur</i>

Année Universitaire 2015/2016

« Les œuvres de l'esprit, de la science et du savoir doivent être au service de l'humanité pour rendre la vie plus simple et plus belle, et non à l'enrichissement de quelques individus »

Nikola Tesla (1856-1943)

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire

- ❖ *A vous mes très chers parents, si j'en suis arrivée à ce stade, c'est grâce à Dieu et à vous en suivant tous vos précieux conseils qui seront gravés dans ma mémoire à jamais.*
- ❖ *A mes chers adorables frères et sœurs.*
- ❖ *A tous mes amies.*
- ❖ *A tous les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.*

LASSAKEUR HADJIRA

Remerciements

Mes remerciement tout d'abord à notre Dieu.

*Mon mémoire a été entrepris aux seins du laboratoire de recherche à l'université de Amar Telidji de Laghouat grâce à Monsieur **Mohamed YOUSFI** directeur de ce laboratoire je le remercie pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire et disponible pour mener à bien ce travail.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame **HAMIA Chahrazed** pour m'avoir encadré et dirigé ce travail, pour l'aide qu'elle m'a apportée et pour l'intérêt constant qu'elle n'a cessé d'accorder pour l'orientation de ce travail.*

Mes vifs remerciements vont à l'adresse de tous les membres du jury pour avoir accepté de lire et de critiquer le présent travail.

*Je tiens également à remercier les enseignants Monsieur **Mohamed BENALIA**, Monsieur **Amar DJRIDANE** pour les conseils et le soutien moral.*

Un grand merci aussi pour mes enseignements des années de cursus universitaire.

Mes remerciements vont aussi à tous mes amis et mes collègues pour les moments sympathiques qu'on a passé ensemble.

Enfin, je souhaite exprimer mes profondes reconnaissances à toutes les personnes qui partagent ma vie et qui ont contribué grandement à l'accomplissement de ce travail dans de parfaites conditions.

Liste Des Notations

Aac	: Acide Acétique
AE	: Acétate d'éthyle
AEAC	: Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity
CCM	: Chromatographie sur couche mince
Chl	: Chloroforme
DNS	: Acide 3,5dinitrosalicylique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl
E	: Eau distillé
EAG	: Equivalent en acide gallique
ED	: D'éthyle éther
ESR	: Equivalent en sucre réducteur
MOH	: Méthanol
PA	: Pourcentage antiradicalaire
Tpph	: Teneur en polyphénol totaux
UV-visible	: Ultra-violet -visible

Liste Des Figures

Figure 1	: Carte géographique représente la localisation de Tlemcen et Messàad en Algérie.	3
Figure 2	: l'arbuste et les graines de la grenade.	3
Figure 3	: Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit.	4
Figure 4	: L'oxydation des sucres réducteurs en présence du DNS.	6
Figure 5	: Réduction de radical libre DPPH [·] en présence d'antioxydant.	8
Figure 6	: Courbe d'étalonnage du fructose et du glucose.	10
Figure 7	: Cinétique de concentration des sucres dans le jus fermenté de la grenade de Tlemcen en fonction des jours.	12
Figure 8	: Cinétique de concentration des sucres dans le jus fermenté de la grenade de Messàad en fonction des jours.	12
Figure 9	Transformation de sucre réducteur en alcool en présence de levure.	13
Figure 10	Transformation du glucose en acide acétique	14
Figure 11	: Cinétique de la concentration en acide du jus fermenté de Tlemcen en fonction des jours.	14
Figure 12	: Cinétique de la concentration en acide du jus fermenté de Messàad en fonction des jours.	14
Figure 13	: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	15
Figure 14	: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.	15
Figure 15	: Teneurs en phénol totaux et en AEAC dans le jus fermenté de Messàad en fonction des jours.	17
Figure 16	: Teneurs en phénol totaux et en AEAC dans le jus fermenté de Tlemcen en fonction des jours.	19

Figure 17	: Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénolique pour le premier et le dernier jour des deux variétés.	20
Figure 18	: Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénoliques pour chaque 5 jour de Messàad sous lampe UV ($\lambda=254$ nm).	20
Figure 19	: Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénolique pour chaque 5 jours de Tlemcen sous lampe UV ($\lambda=254$ nm).	20
Figure 20	: Courbe d'étalonnage du glucose.	27
Figure 21	: Courbe d'étalonnage du fructose.	27

Liste Des Tableaux

Tableau 1	: Réactifs chimiques utilisés.	5
Tableau 2	: Concentration des extraits en équivalent en sucres réducteurs g(ESR)/l de jus.	11
Tableau 3	: La concentration en acide des jus de grenades de Tlemcen et Messàad	14
Tableau 4	: Teneurs en phénols totaux et AEAC des extraits de Messàad et Tlemcen.	16
Tableau 5	: Situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte	28

ملخص

يُعرّف الرمان منذ قديم الزمان، و ذلك لخصائصه المتعددة، مما جعلناه محور دراستنا المخبرية.

من خلال هذا العمل المتواضع، قمنا بتقييم محتواه من السكريات الإرجاعية بطريقة DNS، معايرة لونية لمعرفة محتواه من الحموضة و كذلك للفينولات الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu و أخيرا قياس القدرة على مضادات الأوكسدة و ذلك عن طريق فحص DPPH المعبر عنه بـ AEAC للمستخلصات المستخرجة من عصير الرمان المخمر لمنطقتين مختلفتين من الجزائر و هي تلمسان و مسعد.

تُظهر النتائج أن المتغيرين الإثنيين منبع واعد السكريات بقيم تتراوح بين 135,308 و 3,428 غرام / لتر لفاكهة تلمسان و بين 131,916 و 2,417 غرام /لتر لفاكهة مسعد و المركبات الفينولية بين 0,051 و 0,188 ميليغرام مكافئ لحمض الغاليك/ميليتر و بين 0,048 و 0,169 مكافئ لحمض الغاليك/ميليتر لتلمسان و مسعد على الترتيب. القيم المعبرة بـ AEAC المنشورة تبين أن عصير الرمان كافي الفعالية و هذه الفعالية راجعة الى تركيبة المكونات الفينولية بقيم تتراوح بين 1,542 و 11,140 غرام / اللتر و بين 1,694 و 5,334 غرام / اللتر لتلمسان و مسعد.

الكلمات المفتاحية: عصير الرمان، التخمر، السكريات المرجعية، المركبات الفينولية، القدرة الضادة للأوكسدة.

RESUME

La grenade est connue, depuis longtemps, pour ces vertus multiples, ce qui l'a mise au centre de notre étude expérimentale.

A travers cette modeste contribution, nous avons estimé les teneurs en sucres réducteurs par la méthode de DNS, les teneurs en acidités par colorimétrie puis celles des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et enfin la mesure de l'activité antioxydante vis-à-vis du test DPPH exprimé en AEAC pour les extraits de jus de grenade fermenté de deux zones différentes en Algérie qui sont Tlemcen et Messàad et une plaque CCM analytique pour les extraits phénoliques.

Les résultats ont montrés que les deux variétés sont des sources prometteuses en sucres par des valeurs allant de 135,308 g/l à 3,428 g/l pour la variété de Tlemcen et de 131,916 g/l à 2,417 g/l pour Messàad et en composés phénoliques de 0,051 mg(EAG)/ml à 0,188 mg(EAG)/ml et de 0,048 mg(EAG)/ml à 0,169 mg(EAG)/ml pour Tlemcen et Messàad respectivement. Les valeurs en AEAC illustre que les jus de grenades sont assez actifs et que cette activité est due à la composition en phénols par des valeurs allant de 1,542 g/l à 11,140 g/l et de 1,694 g/l à 5,334 g/l pour Tlemcen et Messàad.

Mots clés : jus du grenade, fermentation, sucre réducteur, composé phénolique, activité antioxydant.

ABSTRACT

The pomegranate is known for a long time for these many virtues, which put her at the center of our experimental study.

Through this modest contribution, we estimated the levels of reducing sugars by DNS methods, levels of acidity by colorimetry and those of total phenols by Folin-Ciocalteu method and finally measuring the antioxidant activity against the DPPH test expressed in AEAC for fermented pomegranate juice extracted from two different areas in Algeria are Messàad and Tlemcen analytical CCM plate phenolic extracts.

The results showed that both varieties are promising sources of sugars with 135,308 g/l to 3,428 g/l for Tlemcen and 131,916 g/l at 2,417 g/l for Messàad and phenolic compounds content ranged from 0,051 mg (EAG)/ml to 0,188 mg (EAG)/ml and 0,048 mg(EAG)/ml to 0,169 mg(EAG)/ml for Tlemcen and Messàad. The values in AEAC shows that pomegranate juice are active enough and that this activity is due to the composition of phenols de 1,542 g/l to 11,140 g/l and 1,694 g/l to 5,334 g/l for Tlemcen and Messàad respective.

Keywords: Pomegranate juice, fermentation, reducing sugar, phenolic compound, antioxidant activity.

Table des matières

Liste des notations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
I. Introduction générale	1
II. Matériel et méthodes	3
II.1 Matériel	3
II.1.1 Matériel végétal	3
II.1.2 Réactifs chimiques	5
II.2 Méthodes	5
II.2.1 Préparation des extraits	5
II.2.2 Dosage des sucres réducteurs	6
II.2.3 Dosage de l'acidité du jus	6
II.2.4 Dosage des phénols totaux	7
II.2.5 Evaluation de l'activité antioxydant	7
II.2.6 Analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince (CCM)	9
III. Résultats et discussion	10
III.1 Quantification des sucres réducteurs	10
III.2 Détermination de l'acidité du jus	13
III.3 Quantification des composés phénoliques et l'évaluation de leurs activités antioxydantes	15
III.4 Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince	19
IV. Conclusion	22
V. Références bibliographiques	23
VI. Annexe	27

I. Introduction

Un grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent leurs applications très largement répandue dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (*Bérubé, 2006*).

A l'origine, la nature constituée essentiellement de végétaux, servaient d'alimentation aux animaux et aux hommes peuplant la terre. Mais à coter de cette fonction nutritionnelle, l'homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer ces plantes médicinales, l'entretien de l'environnement, économique et industrielle.

Parmi les raisons qui nous ont incitées à entreprendre cette étude, il faut citer le triple intérêt que revêt la grenade :

- Au point de vue écologique, le grenadier valorise et fixe les sols pauvres et salins, il est capable de s'adapter aux conditions de milieu caractérisé par une aridité climatique marquée (*Melgarejo et Salazar, 2003*).
- Au point de vue économique, elle réside également dans ses fruits qui ont une grande valeur nutritive comparable à celle des fruits juteux comme les abricots, les oranges, les pommes et d'autres. La production mondiale annuelle de grenades est estimée à environ trois millions de tonnes. Les pays les plus producteurs de ces fruits sont l'Inde, l'Iran et la Chine avec une production respectivement de 900 000, 800 000 et 250 000 Tonnes (*Melgarejo et Valero, 2012*).
- Au point de vue médicinale, la grenade possède par exemple des propriétés antioxydantes supérieures à celles du vin rouge ou du thé vert (*Gil et al, 2000*), elle a un effet efficace pour certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (*Aviram, Dornfeld et al. 2000; Aviram, Volkova et al. 2008; Davidson, Maki et al. 2009*), le diabète (*McFarlin, Strohacker et al. 2009*), le surpoids (*Al-Muammar et Khan 2012*), l'hygiène buccale (*Haidari, Ali et al. 2009*).

Ces dernières années, le secteur agricole en Algérie a connu de sévères problèmes à cause de la sécheresse, ce qui nécessite le choix des cultures résistantes au stress hydrique et peu exigeantes aux sols riches. Le grenadier (*Punica granatum*) est l'une de ces cultures.

C'est cette importance économique et tous ce qui précède nous ont amené à s'intéresser et à se rapprocher d'avantage de ce fruit dans ce modeste travail qui se résume par ce qui suit.

En premier lieu, ce travail a été effectué par des analyses quantitatives qui caractérisent le jus de grenade fermenté par un dosage des sucres réducteurs par le réactif DNS et un dosage acido-basique pour mesurer son acidité.

Dans un second temps, la quantification des extraits phénolique a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

A la fin de cette étude, l'évaluation de l'activité antioxydante en adoptant un test chimique qui est une analyse d'estimation au moyen du DPPH de la capacité des extraits végétaux à piéger les radicaux libres.

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

La grenade est originaire d'Iran et d'Afghanistan, où le grenadier croit de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. Aujourd'hui sa culture s'étend à tout le bassin Méditerranéen, à la Chine, l'Inde, et au sud-ouest américain (Californie et Mexique) (*Levin1994*).

Les fruits ont été récoltés de deux régions : Tlemcen et Messaad (willaya Djelfa) au mois d'octobre

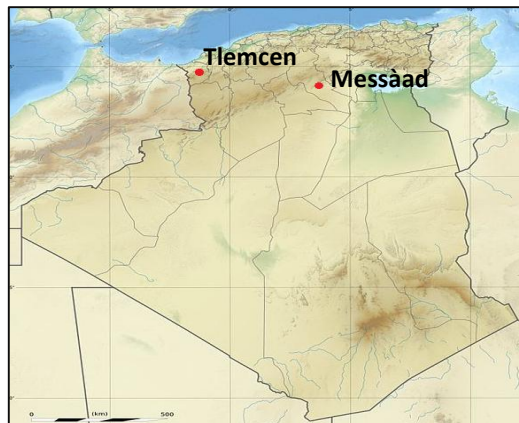


Figure 1 : Carte géographique représente la localisation de Tlemcen et Messaad en Algérie

Nom scientifique : *Punica granatum*

Nom vernaculaire : *Rommane*

Famille : *Lythracées*

Description : Le grenadier est un arbre qui aime les climats chauds et secs. Sa taille est de 4 à 6 m. le fruit plus ou moins sphérique de 5 à 10 cm de diamètre. La grenade est délimitée par un péricarpe épais (ou peau), à l'intérieur duquel sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide contenu par une très fine membrane (*Dallas et Bonewald 2010*).



Figure 2 : l'arbuste et les graines de la grenade

Le fruit donne donc naissance à trois parties bien distinctes: les pépins (environ 3% du poids du fruit) qui contiennent eux-mêmes 20% d'huile, le jus (environ 30% du poids du fruit) et la peau qui comprend également les membranes intérieures, dont la composition phytochimique est détaillée dans les paragraphes suivants (*Lansky et Newman 2007*).

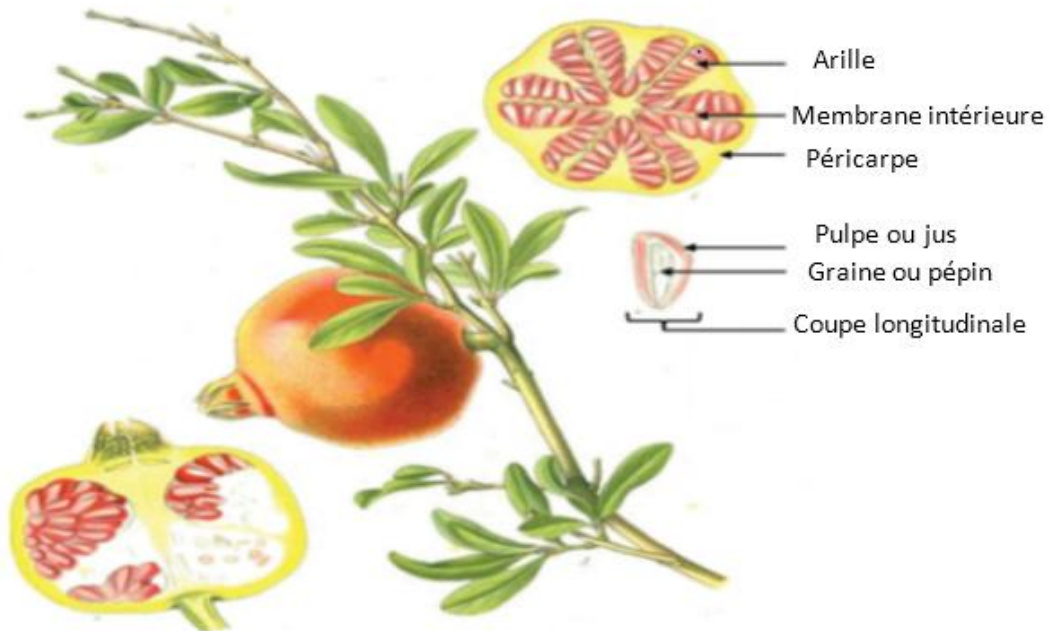


Figure 3 : Planche anatomique de la grenade, définition des différentes parties du fruit.

Utilisation :

La grenade est consommée fraîche graine ou jus, arôme dans certain industrie alimentaire, elle peut non seulement être utilisée en cuisine et aussi grâce à son effet bénéfique pour le traitement de certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (effets antiathérogènes) (*Aviram, Dornfeld et al. 2000; Aviram, Volkova et al. 2008; Davidson, Maki et al. 2009*), le diabète (*McFarlin, Strohacker et al. 2009*), le surpoids (*Al-Muammar and Khan 2012*), l'hygiène buccale (*Haidari, Ali et al. 2009*) et même une activité chémopréventive plus spécifiquement sur les cancers du sein, du colon (*Seeram, Lee et al. 2004; Malik, Afaq et al. 2005; Seeram, Adams et al. 2005; HongSeeram et al. 2008; Koyama, Cobb et al. 2010*), et le cancer prostatique (*Lansky and Newman 2007*)

II.1.2 Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Réactifs chimiques utilisés

Produit	Marque
Acétate d'éthyle, méthanol, butanol, D-(+)-glucose, fructose, tartrate double de potassium et sodium, 3,5-dinitrosalicylic acide, acide gallique, Na ₂ CO ₃ , DPPH, Folin-Ciocalteu, d'éthyle éther, chloroforme.	Sigma-Aldrich
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Riede-dehaen
CCM préparatoire 20x20cm gel de silice 60	Merck
Sulfate de sodium anhydre (Na ₂ SO ₄)	Biochem
Acide ascorbique vitamine C	Prolabo

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des extraits

Les fruits ont été nettoyés puis on a procédé à une séparation des écorces et des grains, celles-ci ont été conservées au frais à une température très basse.

Le jus des graines de la grenade a été obtenu à partir d'un appareil extracteur de jus. Le jus est conservé dans un erlenmeyer fermé à l'abri de la lumière et à une température ambiante.

La préparation et l'analyse des extraits de sucres et phénoliques est faite pendant 35 jours qui représente la durée d'une fermentation accomplie. Chaque jour on prélève 40 ml de jus à l'aide d'une pipette de 20 ml pour procéder à une extraction liquide/ liquide avec de l'acétate d'éthyle. Cette extraction a été opérée en deux grandes étapes, la phase aqueuse a été testée par le DNS afin d'avoir la concentration des sucres réducteurs présent dans le jus pour le jour même et la phase organique est séchée avec du sulfate de sodium anhydre puis filtrée et évaporée sous pression réduite à l'aide d'un Rota vapeur. Le résidu sec obtenu est pesé et solubilisé dans des volumes différents de méthanol absolu de 3 à 5 ml. Les extraits obtenus sont conservés à 4°C

jusqu'à leur analyse. En parallèle on fait un dosage acido-basique pour voir l'acidité du jus pour chaque jour.

II.2.2 Dosage des sucres réducteurs

La méthode utilisée est celle de **Dubois** (*Dubois et al, 1956*). Il s'agit d'une analyse spectrophotométrique.

Le réactif 3,5-dinitrosalicylique possède une coloration jaune lorsqu'il réagit avec les sucres réducteurs dans un milieu alcalin à 100°C devient 3-amino, 5-nitrosalicylique. Dans cette réaction, la couleur de la solution passe du jaune-orange au rouge, qui absorbe fortement la lumière à 540 nm.

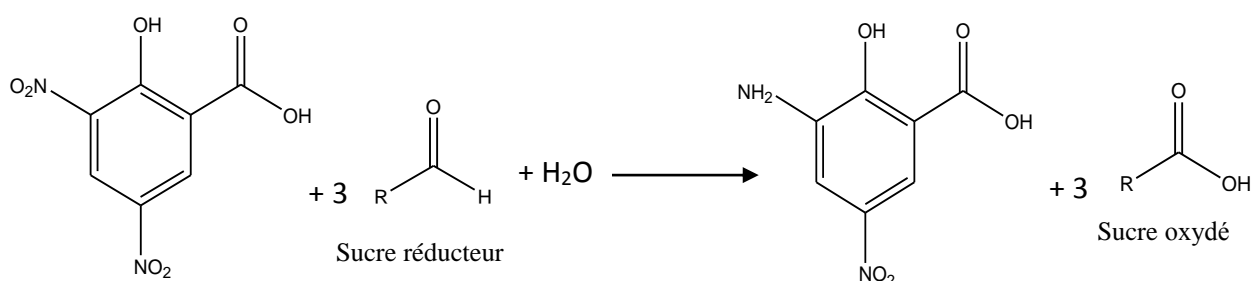


Figure 4 : L'oxydation des sucres réducteurs en présence du DNS.

Dans des tubes à essais on ajoute 3ml de réactif DNS (8 g de soude, 5 g d'acide Di-Nitro-3,5 Salicylique, 150 g de tartrate double de sodium et de potassium, complété à 500 ml avec de l'eau et conservé à l'abri de la lumière) à 1ml de chaque extrait diluée, puis on la chauffe pendant 5 minutes dans un bain marie à une température de 100°C. Après refroidissement dans un bain de glace on ajoute 6ml d'eau distillé. L'absorbance est lue à 540 nm dans un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601 contre un blanc.

II.2.3 Dosage de l'acidité du jus

Un dosage acido-basique a été réalisé pour déterminer l'acidité du jus de grenade fermenté par le titrage colorimétrique, d'un volume de 10 ml du jus et de 10 ml d'eau distillée dans un bécher avec des gouttes de l'indicateur coloré qui est la phénolphaléine, le dosage acide- base a été effectuée par une base d'hydroxyde de sodium NaOH de concentration 0,1 M. Ce dosage était faite à partir de 21^{ème} jours de la fermentation de jus.

II.2.4 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux a été effectuée par une méthode adaptée par **Singleton et Ross (Lamaison, 1990)**. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de phénols totaux présents dans le milieu.

100 μ l de chaque extrait dilués ont été introduites à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais, suivis de l'addition de 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué), puis 2 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 4%. Les solutions ont été secouées immédiatement et sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm dans un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601 contre un blanc.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique exprimée en milligrammes par un millilitre de jus de grenade fermenté équivalent en acide gallique mg(EAG)/ ml du jus.

II.2.5 Evaluation de l'activité antioxydant

Les méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou d'un mélange sont nombreuses. Elles sont fondées sur la détermination de produits qui résultent de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits, a été réalisée par un test chimique. On s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre par les fractions antioxydants en employant le DPPH.

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrzyl (DPPH \cdot) est un radical organique stable de couleur violet intense. Les antioxydants donneurs de proton, tels que les polyphénols, sont capables de réduire ce radical. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (*Tirzitis et al, 2010 ; Prior et al, 2005*). La réduction du radical libre DPPH \cdot par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par la présence des extraits (*W. Brand-Williams; et al, 1995*), (**Figure 5**).

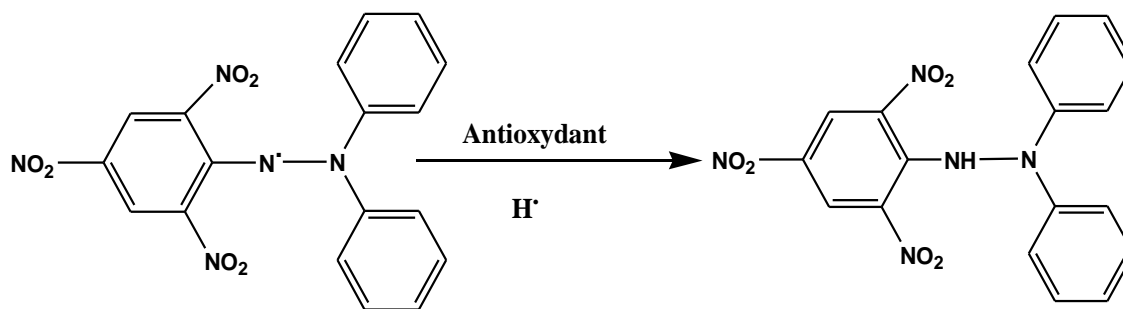


Figure 5 : Réduction de radical libre DPPH[•] en présence d'antioxydant

Le pourcentage antiradicalaire est calculé selon l'équation suivante:

$$PA = \frac{Abs (Control) - Abs (Extrait)}{Abs Control} \times 100$$

PA : Pourcentage antiradicalaire.

Abs (Control) : l'absorbance de la solution de DPPH seul à 517 nm.

Abs (Extrait) : l'absorbance du DPPH en présence de l'extrait testé à 517 nm.

Pour réaliser ce test, on prépare une dilution de chaque extrait phénolique à un volume de 1 ml de méthanol, et on ajoute 1ml de la solution méthanolique de DPPH[•] (250 μM). Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm dans un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601 contre un blanc (Al, et al, 2009).

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits est faite par rapport à l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant dans l'industrie agroalimentaire. Il est nécessaire de mettre en évidence l'efficacité de cet antioxydant à ce test, et cela en traçant une courbe d'étalonnage. Une gamme de 7 concentrations allant de 0,01 à 0,1 mg/ml a été préparé à partir d'une solution mère de 0,1 g/l. La lecture se fait après 30 minutes d'incubation à l'obscurité.

A partir de la pente de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique obtenu à 517 nm, nous avons déterminé les valeurs de l'activité antioxydante des extraits étudiés exprimée en valeur d'AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity).

II.2.6 Analyse des extraits par la chromatographie sur couche mince (CCM)

Une CCM analytique a été réalisée pour avoir une idée sur les différents composés existants dans les différents extraits phénoliques bruts. La séparation a été effectuée dans des cuves en verre saturées. En utilisant quatre solvant appropriés (solvant 1 : Acétate d'éthyle / méthanol / eau ; 8/1/1 v/v/v ; solvant 2 : Acétate d'éthyle / méthanol / eau / acide acétique; 8/1/8/0,1 ; v/v/v/v ; solvant 3 : D'éthyle éther / chloroforme / acide acétique ; 7/3/0,1 v/v/v et solvant 4 : D'éthyle éther / chloroforme / acide acétique ; 5/5/0,1 v/v/v). En utilisant une plaque CCM de dimension 10x10cm en gel de silice. Après migration la plaque est séchée à l'air libre et révélée par une lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 254$ nm.

III. Résultats et discussion

III.1 Quantification des sucres réducteurs

Les sucres sont des constituants majeurs de la grenade. L'analyse des sucres de la grenade a révélée essentiellement la présence des sucres réducteurs. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion (*Acourene et Belguedj, 2001*).

La **figure 6** représente la courbe d'étalonnage du fructose et glucose (sucres réducteurs) réalisée par la méthode de *Dubois*.

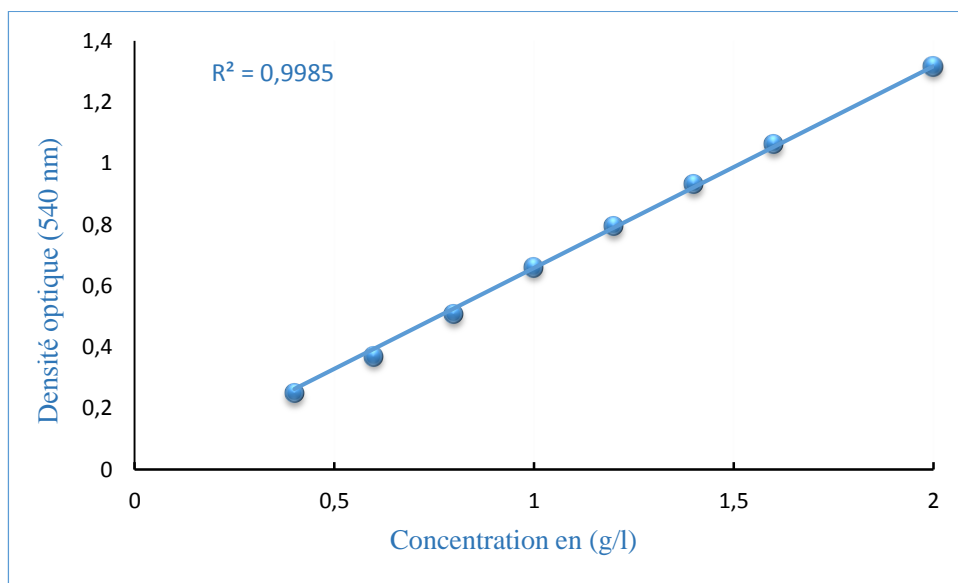


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du fructose et du glucose.

La concentration des extraits en sucres réducteurs a été calculée par rapport à la courbe d'étalonnage qui est exprimée en gramme d'équivalent en sucre réducteur ESR par 1 litre de jus du grenade.

Le **tableau 2** représente la concentration des sucres réducteurs en fonction des jours des deux variétés : Messaad et Tlemcen. Les résultats illustrent que la concentration en sucres diminue dans les deux variétés : Tlemcen avec 135,308 à 3,428 g/l et Messaad avec 131,916 à 2,417 g/l, chaque essai a été refaite 3 fois.

Tableau 2 : Concentration des extraits en équivalent en sucres réducteurs g(ESR)/l de jus.

Tlemcen		Messàad	
jours	Concentration du sucre réducteur (g/l)	jours	Concentration du sucre réducteur (g/l)
1	104,860 ±1,396	1	123,994 ±1,396
2	135,308 ±1,289	2	131,916 ±0,575
3	119,109 ±1,595	4	112,377 ±1,074
5	123,083 ±0,966	5	122,956 ±0,632
6	107,264 ±1,595	6	115,718 ±1,643
7	101,190 ±1,218	7	92,483 ±1,297
8	68,869 ±0,322	8	75,728 ±1,727
9	56,340 ±1,186	9	39,787 ±0,548
10	38,724 ±0,402	12	6,581 ±0,358
13	15,059 ±0,036	13	5,182 ±0,188
14	9,017 ±0,134	14	3,449 ±0,078
15	3,428 ±0,245	15	3,457 ±0,137
16	3,609 ±0,228	16	3,786 ±0,185
17	4,802 ±0,116	19	3,285 ±0,057
20	3,872 ±0,035	21	4,207 ±0,033
22	5,140 ±0,092	22	3,629 ±0,088
23	4,943 ±0,075	23	3,501 ±0,052
24	4,787 ±0,005	26	2,417 ±0,031
27	3,898 ±0,052	27	4,171 ±0,094
28	3,804 ±0,061	28	3,475 ±0,102
29	4,363 ±0,129	29	3,447 ±0,030
30	4,252 ±0,057	30	3,565 ±0,081
31	4,156 ±0,024	33	3,662 ±0,074
34	4,429 ±0,054	34	3,690 ±0,032

Pour mieux discuter les résultats, nous avons tracé une cinétique pour chaque variété représentées dans **Les figures (7 et 8)**.

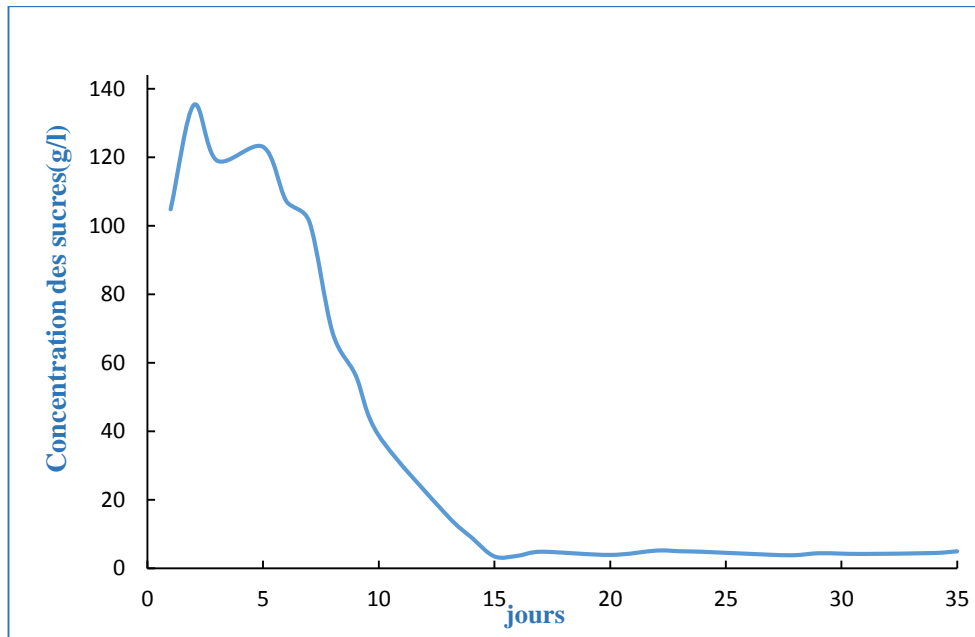


Figure 7 : Cinétique de concentration des sucres dans le jus fermenté de la grenade de Tlemcen en fonction des jours.

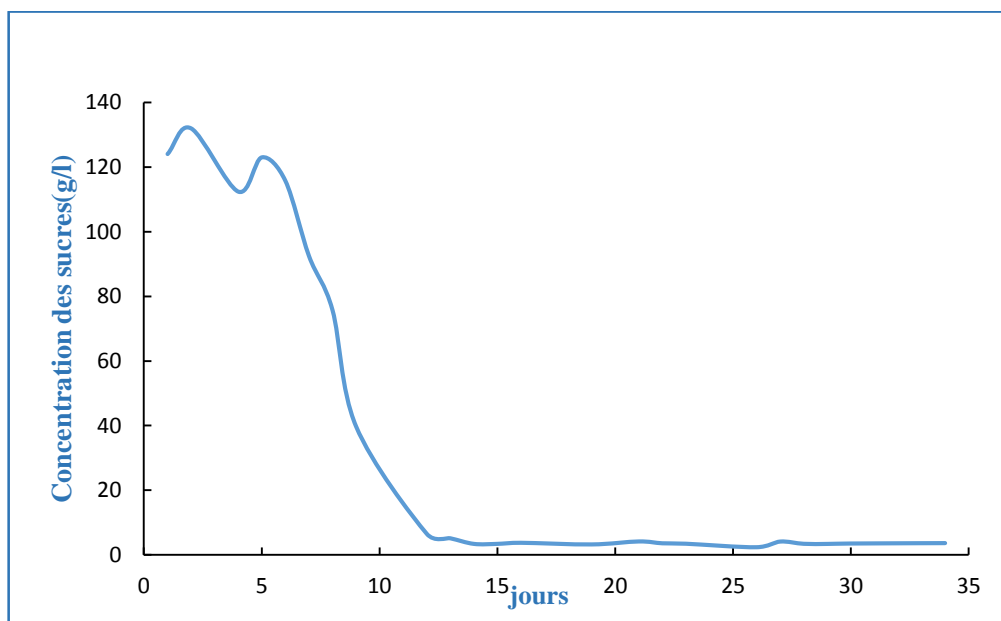


Figure 8 : Cinétique de concentration des sucres dans le jus fermenté de la grenade de Messaad en fonction des jours.

D'après ces deux cinétiques, on remarque que dans les premiers jours (de 1 jusqu'à 5^{ème} jours) il existe une perturbation qui est marquée par des concentrations allant de 104,860 g(ESR)/l à 123,083g(ESR)/l passant par une valeur plus élevée à savoir 135,308 g(ESR)/l pour la région

de Tlemcen. De même pour la région de Messàad a une valeur de 123,994 g(ESR)/l à 122,956 g(ESR)/l passant par une valeur maximale de 131,916 g(ESR)/l pour le 2^{ème} jour.

A partir de 6^{ème} jour, une diminution bien définie jusqu'au 15^{ème} jour allant de 107,264 g(ESR)/l à 3,428 g(ESR)/l pour la variété de Tlemcen. Une allure pareil pour la variété de Messàad où une diminution de concentration à partir du 6^{ème} jour jusqu'au 14^{ème} jour en concentration en sucre réducteur allant de 115,718 g(ESR)/l à 3,449 g(ESR)/l. A partir du 15^{ème} jusqu'au dernier jour on enregistre une stabilisation des concentrations en sucre réducteur pour les deux variétés allant de 3,609 g(ESR)/l à 4,429 g(ESR)/l et 3,457 g(ESR)/l à 3,690 g(ESR)/l pour les régions de Tlemcen et Messàad respectivement. Cette diminution remarquable est due à l'accélération de la fermentation du jus où les sucres se transforment en alcools par la réaction suivant :

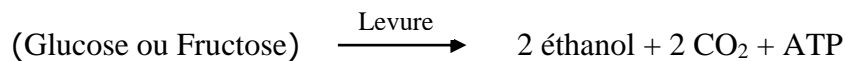


Figure 9 : Transformation de sucre réducteur en alcool en présence de levure.

Les résultats montrent que les grenades de l'étude ont une bonne valeur alimentaire car ils sont riches en sucres. Ils peuvent servir de matière première dans plusieurs industries de transformation comme la fabrication de sucre liquide, sirops, alcools, vinaigres, levures, ...etc (*Estanov, 1990*).

La différence entre les deux variétés de grenades en teneurs de sucres est due peut être à la région (le climat, la nature du sol, ...etc.) sachant que Tlemcen est marqué par un climat subhumide par contre Messàad son climat est semi-aride.

III.2 Détermination de l'acidité des jus

L'acidité des jus a été effectuée par un dosage acido-basique, elle se fait à partir du 21^{ème} jour. Le **tableau 3** représente la concentration en acide dans le jus en fonction des jours de la fermentation.

Tableau 3 : La concentration en acides des jus de grenades de Tlemcen et de Messàad.

Tlemcen		Messàad	
jours	Concentration (mol/l)	jours	Concentration (mol/l)
22	0,035	21	0,1
23	0,04	22	0,11
24	0,052	23	0,111
27	0,053	26	0,113
28	0,054	27	0,114
29	0,054	28	0,115
30	0,054	29	0,116
31	0,055	30	0,117
34	0,055	33	0,122
35	0,056	34	0,123

D'après les cinétiques représentées dans les figures (11 et 12) qui montrent qu'il y a une augmentation avec une certaine stabilisation en concentration en acide allant de 0,035 à 0,056 mol/l pour la région de Tlemcen et de 0,1 à 0,123 mol/l pour celle de Messàad. Certaines études montrent que cette augmentation en concentration d'acide est due à la transformation de glucose en acide acétique en passant par l'alcool. Les souches d'Acétobacter sont plus oxydatives que celles de glucono-acétobacter dans un premier temps, l'éthanol est déshydrogéné en acétaldéhyde (alcool déshydrogénase) puis dans un second temps, ce dernier est oxydé en acide acétique (acétaldéhyde déshydrogénase) (*Bartowsky E.J. et al. 2008*).

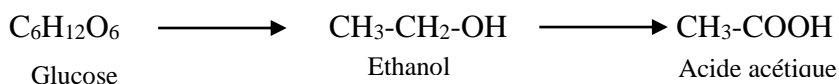


Figure 10 : Transformation du glucose en acide acétique.

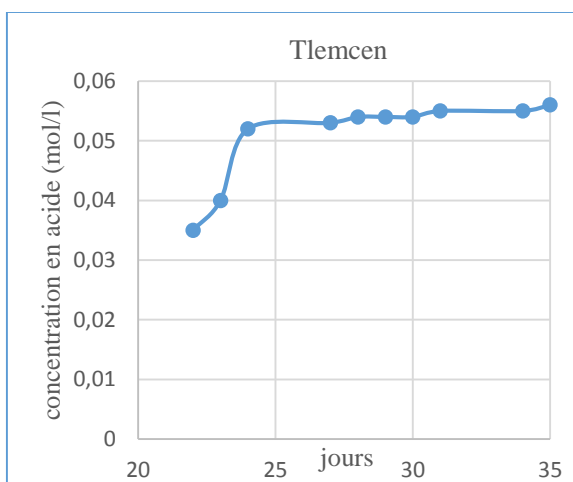


Figure 11 : Cinétique de la concentration en acide du jus fermenté de Tlemcen en fonction des jours.

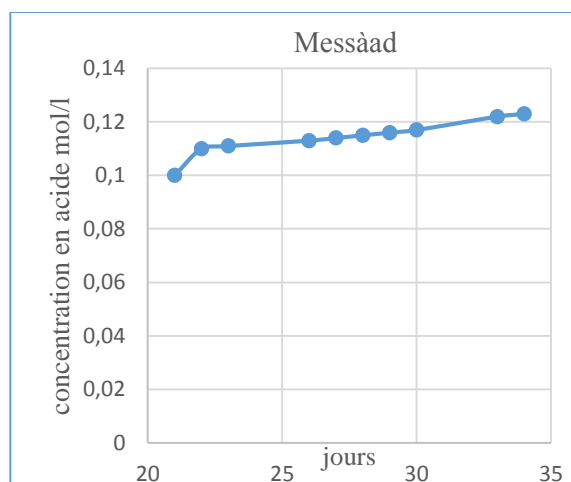


Figure 12 : Cinétique de la concentration en acide du jus fermenté de Messàad en fonction des jours.

III.3 Quantification des composés phénoliques et l'évaluation de leurs activités antioxydantes

La teneur en phénols totaux de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 13**) et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (EAG) par 1 millilitre de jus.

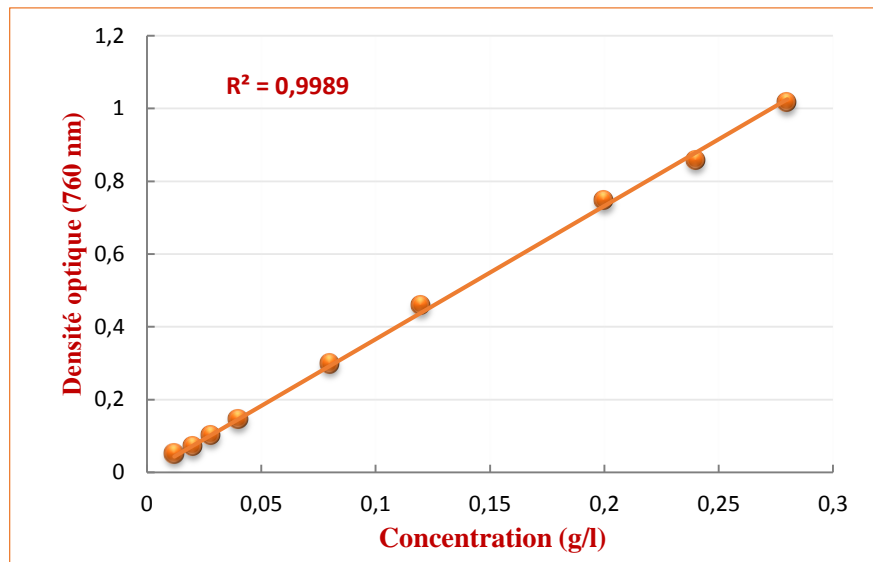


Figure 13: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

L'activité antioxydant des extraits étudiés sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**Figure 14**), exprimée en valeur d'AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity). Nous rappelons que plus la valeur de l'AEAC est importante plus la pouvoir antioxydant des extraits est important.

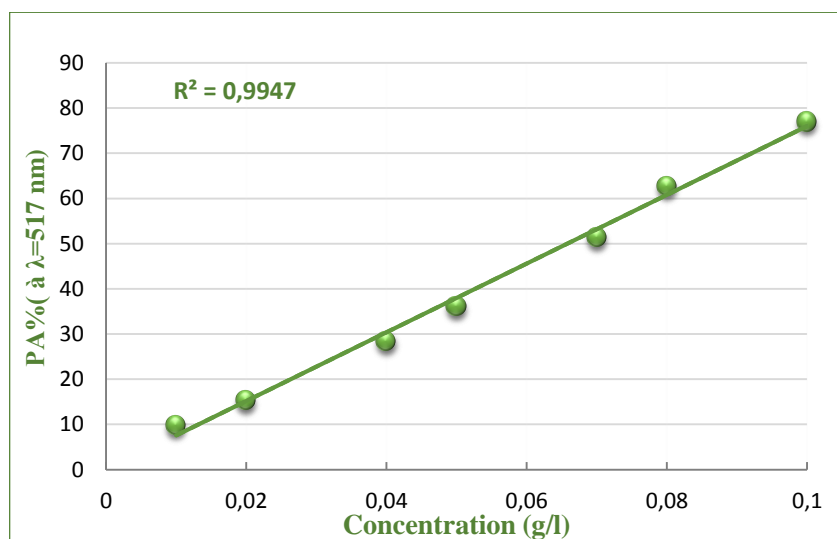


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Les résultats de la quantification des phénols totaux et de l'AEAC des extraits sont consignés dans le **tableau 4** pour les deux régions, chaque essai a été refaite 3 fois.

Tableau 4 : Teneurs en phénols totaux et en AEAC des extraits de Messàad et de Tlemcen.

Messàad			Tlemcen		
Jour	Teneur en phénols totaux (mg EAG/ml)	AEAC (g/l)	Jour	Teneur en phénols totaux (mg EAG/ml)	AEAC (g/l)
1	0,048 ±0,013	1,694 ±0,012	1	0,078 ± 0,033	2,475 ± 0,010
2	0,073 ±0,031	2,664 ±0,023	2	0,054 ± 0,022	1,542 ± 0,005
4	0,098 ±0,029	5,334 ±0,012	3	0,064 ± 0,019	2,888 ± 0,002
5	0,084 ±0,025	3,656 ±0,004	5	0,088 ± 0,017	4,204 ± 0,018
6	0,059 ±0,016	3,037 ±0,018	6	0,066 ± 0,021	4,090 ± 0,009
7	0,079 ±0,023	4,773 ±0,006	7	0,051 ± 0,028	3,209 ± 0,011
8	0,093 ±0,024	4,148 ±0,025	8	0,106 ± 0,013	4,813 ± 0,003
9	0,117 ±0,029	4,343 ±0,021	9	0,103 ± 0,016	3,902 ± 0,009
12	0,106 ±0,027	4,112 ±0,003	10	0,105 ± 0,024	4,527 ± 0,010
13	0,124 ±0,026	4,115 ±0,004	13	0,117 ± 0,029	4,319 ± 0,001
14	0,102 ±0,029	5,044 ±0,015	14	0,125 ± 0,004	4,219 ± 0,013
15	0,110 ±0,020	4,942 ±0,008	15	0,121 ± 0,031	5,262 ± 0,005
16	0,119 ±0,030	4,162 ±0,014	16	0,105 ± 0,031	5,129 ± 0,009
19	0,155 ±0,030	3,822 ±0,004	17	0,151 ± 0,024	4,905 ± 0,006
21	0,156 ±0,015	4,221 ±0,010	20	0,154 ± 0,002	5,425 ± 0,001
22	0,153 ±0,007	4,835 ±0,013	22	0,161 ± 0,017	4,614 ± 0,013
23	0,147 ±0,018	4,822 ±0,011	23	0,176 ± 0,002	4,888 ± 0,007
26	0,133 ±0,008	4,594 ±0,004	24	0,177 ± 0,007	5,504 ± 0,010
27	0,142 ±0,023	4,348 ±0,007	27	0,172 ± 0,029	11,140 ± 0,013
28	0,152 ±0,023	3,512 ±0,015	28	0,146 ± 0,010	9,988 ± 0,015
29	0,151 ±0,019	4,086 ±0,004	29	0,149 ± 0,032	9,493 ± 0,014
30	0,169 ±0,025	4,403 ±0,019	30	0,188 ± 0,021	8,374 ± 0,011
33	0,158 ±0,013	4,061 ±0,008	31	0,187 ± 0,004	8,219 ± 0,002
34	0,132 ±0,031	3,680 ±0,003	34	0,186 ± 0,006	9,037 ± 0,002
			35	0,181 ± 0,011	8,510 ± 0,016

Pour mieux discuter nos résultats, nous avons décidé de tracer la cinétique de chaque variation pour les deux régions, **la figure 15** pour Messàad et **la figure 16** pour Tlemcen.

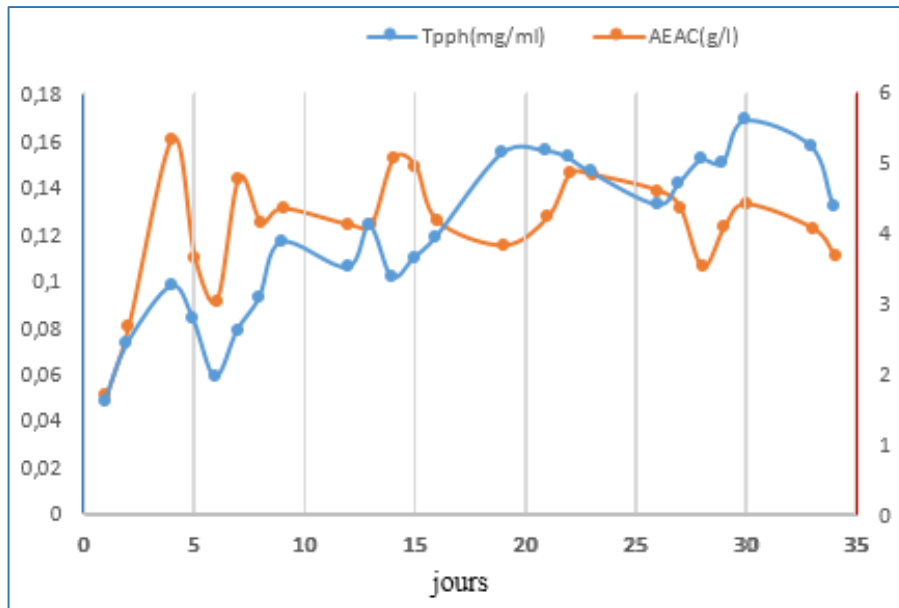


Figure 15 : Teneurs en phénol totaux et en AEAC dans le jus fermenté de Messàad en fonction des jours.

D'après la **figure 15** on constate qu'il existe trois parties où les teneurs en phénols totaux varient dans le même sens avec les valeurs en AEAC montrées par : la partie 1 qui est représentée du 1^{er} jusqu'au 14^{ème} jour où les valeurs s'échelonnent de 0,048 à 0,102 mg(EAG)/ml et de 1,694 à 5,044 g/l en AEAC passant par une valeur maximal de 5,334 dans le 4^{ème} jour, la seconde limitée entre le 22^{ème} au 26^{ème} jour avec 0,153 à 0,133 mg(EAG)/ml et en parallèle de 4,835 à 4,594 en AEAC, puis la partie 3 : du 29^{ème} jusqu'au 34^{ème} jour par des valeurs allant de 0,151 à 0,132 mg(EAG)/ml passant par une valeur maximal de 0,169 mg(EAG)/ml dans le 30^{ème} jour contre des valeurs de AEAC de 4,086 à 3,680 g/l où la valeur maximale est aussi indiquée dans le 30^{ème} jour avec 4,403 g/l pour le cultivar de Messàad. Pour le cultivar de Tlemcen (**Figure 16**) on distingue une première partie présentée du 1^{er} jusqu'au 10^{ème} jour où les valeurs en phénols totaux s'échelonnent entre 0,078 à 0,105 mg (EAG)/ml et de 2,475 à 4,527 g/l en AEAC. La partie 2 du 15^{ème} au 20^{ème} jour désignée par les valeurs 0,121 à 0,154 mg (EAG)/ml en parallèle de 5,262 à 5,425 g/l en AEAC. Une dernière partie qui existe au 34^{ème} et 35^{ème} jour avec des valeurs de 0,186 et 0,181 mg(EAG)/ml respectivement et de 9,037 à 8,510 g/l en AEAC.

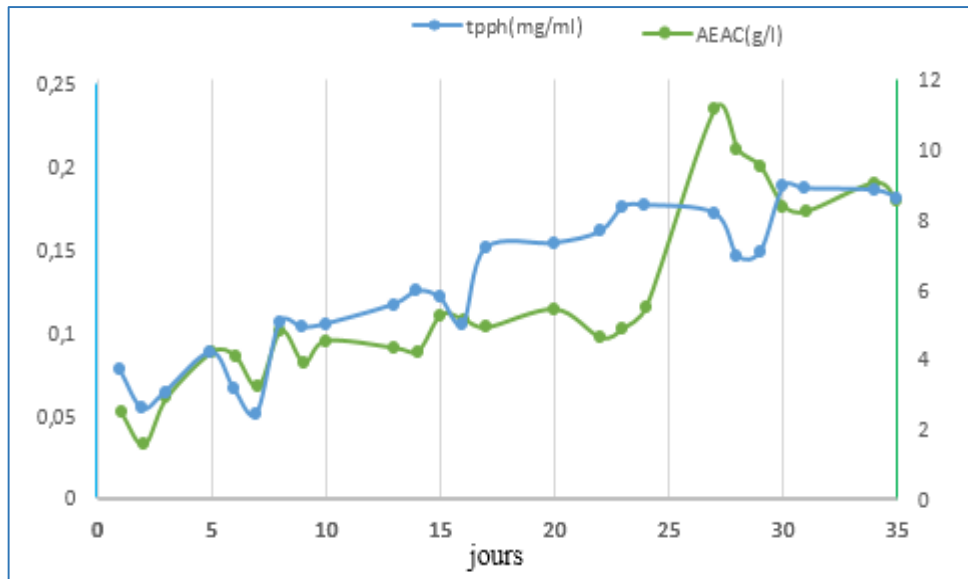


Figure 16 : Teneurs en phénol totaux et en AEAC dans le jus fermenté de Tlemcen en fonction des jours.

Deux autres parties figurants dans ces mêmes cinétiques, où les valeurs en phénols totaux ne varient pas dans le même sens que les AEAC. On cite : la partie 1 : du 15^{ème} jour jusqu'au 21^{ème} jour avec 0,110 à 0,156 mg (EAG) /ml contre 4,162 à 4,221 g/l en AEAC et la partie 2 montrée par le 27^{ème} et le 28^{ème} jour avec 0,142 et 0,152 mg (EAG) /ml contre 4,348 et 3,512 g/l en AEAC respectivement pour la région de Messaad, pour celle de Tlemcen, la première partie est enregistré entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jours avec 0,105 à 0,121 mg (EAG) /ml pour les valeurs en phénols totaux et de 4,527 à 5,262 g/l en AEAC. La deuxième partie est du 20^{ème} jusqu'au 34^{ème} jour avec 0,154 à 0,186 mg (EAG) /ml en phénols totaux et de 5,425 à 9,037 g/l en AEAC passant par une valeur plus élevée qui est 11,140 g/l en AEAC pour le 27^{ème} jour.

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés tyrosines et tryptophane des protéines ce qui permet d'expliquer que l'activité antioxydante est due aux autres composés (*Boizot et Charpentier, 2006*). De ce fait, nous avons essayé de trouver une corrélation entre le teneur en sucres et celles en phénols totaux où nous avons trouvé un coefficient de corrélation égal à -0,84 pour la grenade de Tlemcen et -0,86 pour Messaad (corrélation négative). C'est une valeur assez importante indiquant l'inexistence d'une relation entre la teneur en sucres réducteurs et la teneur en phénols totaux ce qui nous mène à conclure que l'activité antioxydante est due probablement qu'aux composés phénoliques.

Plusieurs études ont montrées que le jus de grenade représente une source très importante en composés phénoliques à savoir, les acides hydroxybenzoïques comme l'acide gallique et l'acide éllagique (*Amakura et al, 2000*), les acides hydrocinnamiques à titre d'exemple l'acide caféique et l'acide chlorogénique (*Artik, 1998*), les flavonoïdes où on cite la quercétine et la rutine puis les tannins avec la catéchine et l'epicatéchine, (*De Pascual-Teresa et al, 2000 ; Artik, 1998*), et enfin les anthocyanes ou les trois principales structures sont la delphinidine, la cyanidine et la pelargonidine (*Hernandez et al, 1999*).

Pour notre étude on se limite à croire que la forte activité antioxydante exprimée en AEAC qui représente parfois le double pour la variété de Tlemcen par rapport à celle de Messàad est due probablement soit un composé phénolique majoritaire ; soit à des composés phénoliques de structures chimiques similaires. Nous avons tenté de rechercher des corrélations entre les teneurs en phénols totaux et celles en AEAC. D'après les résultats nous avons trouvés une association assez importante entre les deux avec un coefficient de corrélation estimé de 0,754 et 0,580 pour les variétés de Tlemcen et Messàad respectivement.

III.4 Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince

Pour un essai d'analyse qualitative de nos différents extraits d'acétate d'éthyle on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM), puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour la fraction fermentée par un choix d'un extrait chaque 5 jours de chaque région étudiée Messàad et Tlemcen sur une plaque de gel de silice.

D'après la **figure 17**, il existe une grande différence entre les taches pour les extraits des régions de Tlemcen et Messàad : une seule tache dans le premier jour par contre plusieurs taches dans le dernier jour présentant des polarités différentes pour les deux systèmes de solvants

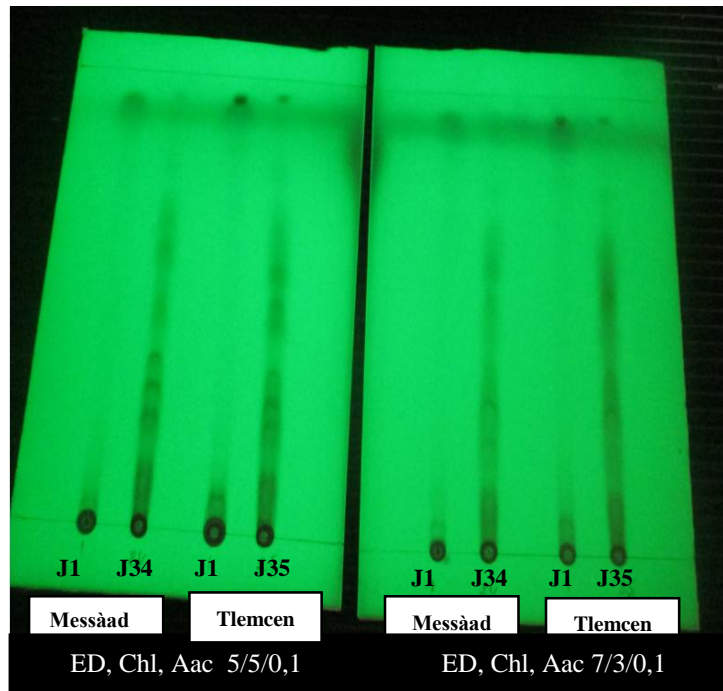


Figure 17 : Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénolique pour le premier et le dernier jour des deux variétés Avec (ED : d'éthyle éther / Chl : chloroforme / Aac : acide acétique / J : jour).

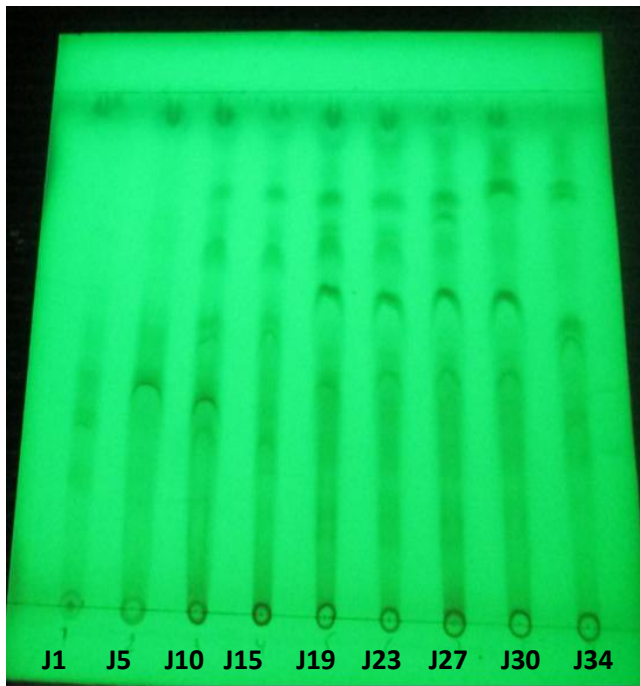


Figure 18 : Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénoliques pour chaque 5 jour de Messaad sous lampe UV ($\lambda=254$ nm) (AE/MOH/E/Aac ; 8/ 1/ 1/ 0,1)

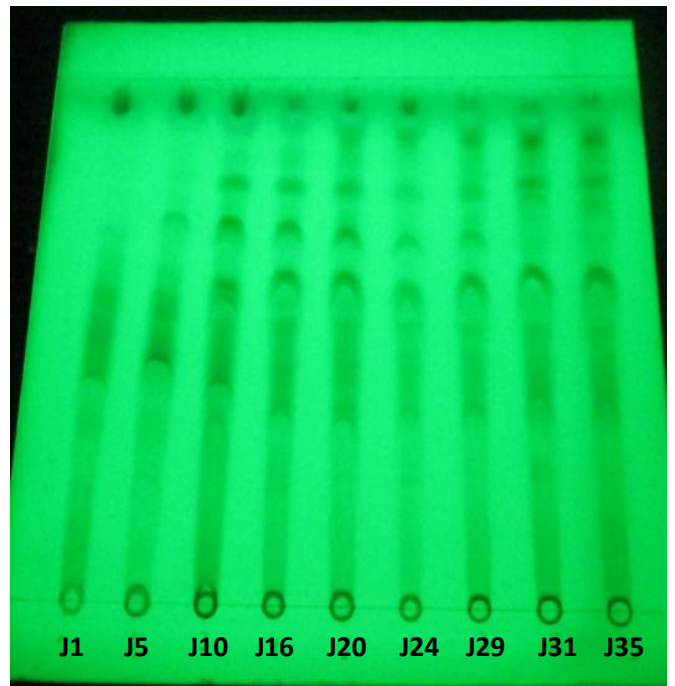


Figure 19 : Photo de plaque CCM analytique monodimensionnelle des extraits phénolique pour chaque 5 jours de Tlemcen sous lampe UV ($\lambda=254$ nm) (AE/MOH/E/Aac ; 8/ 1/ 1/ 0,1)

A partir des **figures 18 et 19** il existe des taches où va apparaître une polarité presque pareille comme le 5^{ème} et le 9^{ème} jour pour les deux variétés. A partir de 19^{ème} jusqu'au 30^{ème} jour, l'apparition des taches plus polaire que les précédents pour la variété de Messaad par contre la variété de Tlemcen indique l'apparition des taches de même niveau mais du 16^{ème} jusqu'au 35^{ème} jour.

L'apparition de composés phénoliques ou de plusieurs familles de ces composés comme les tannins, les flavonoïdes ou les anthocyanes au cours de la fermentation par des polarités distinctes confirment les résultats obtenus.

IV. Conclusion

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons travaillé sur le jus fermenté de grenades Algériennes de deux régions à savoir Tlemcen et Messaad. Cette étude est la première en Algérie.

Au terme de notre travail, nous tirons les conclusions suivantes :

- ✓ L'extraction liquide/liquide du jus de grenades fermenté pour chaque jour par l'acétate d'éthyle nous a mené à quantifier les sucres réducteurs dans la phase aqueuse par le réactif DNS. Les résultats ont montrés que la fermentation commence à partir de 5^{ème} jour puis une diminution jusqu'à 15^{ème} jours qui suit une stabilisation par des faibles concentrations jusqu'au dernier jour avec des valeurs voisines pour les deux variétés.
- ✓ La quantification des phénols totaux à partir des extraits d'acétate d'éthyle réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu ont révélé des valeurs allant de 0,048 à 0,169 mg (EAG)/ml pour la région de Messaad et de 0,051 à 0,188 mg (EAG)/ml pour la région Tlemcen.
- ✓ L'activité antioxydant des extraits a été approuvée par le DPPH où les valeurs exprimées en AEAC ont montré que celles-ci sont dues soit à un composé phénolique majoritaire ; soit à des composés phénoliques de structures chimiques similaires et cela pour les deux variétés.
- ✓ Les CCM ont confirmé que l'activité antiradicalaire est due à certains composés et qui apparait au cours de la fermentation.

À travers cette étude, Il nous a parus clairement, qu'une seule méthode d'estimation de l'activité antioxydante ne peut pas suffire pour caractériser les propensions antioxydantes, et même ne peut pas donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante d'un extrait. Donc, l'utilisation de plus d'une méthode est nécessaire pour permettre de mieux généraliser ces résultats.

Pour mieux valorisé le travail, il est préférable de réaliser le dosage des flavonoïdes, dosage des tanins, plusieurs tests chimiques pour évaluation l'activité antioxydante et faire une étude sur les écorces et les pépins.

V. Références bibliographiques

B. Hurbert, 2008. Etude des polyphénols et des polysaccharides des moûts de pomme et des cidres. Impact de la clarification et de la fermentation. Thèse présentée à l'université de Rennes1/ Agrocampus (2008).

B. Hurbert, A. Baron, J. M. Le Quéré, C. Renard, 2007. Influence of prefermentary clarification on the composition of apple musts. *J. Agric. Food Chem.* 55, p 5118-5122.

B. Jarvis, 2003. Chemistry and microbiology of cidermaking. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. E. S. Ltd. p 1318-1323.

B.K. Mcfarlin., K.A. Strohacker et al, 2009. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD- 1 mice. *Br J Nutrition* 102(1), p 54-59.

C. Prior, I. Saykova, B. Tylkowski, 2005. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 2009, 4, p 25-39.

E. Wald, 2009. Le grenadier (*Punica granatum*) plante historique et l'évolution thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat, université Henri Poincaré – Nancy 1.

E.J. Bartowsky, P.A. Henschke, 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red win - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 125: p 60-70

E.P. Lansky, R.A. Newman, 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109(2), p 177-206.

F. Afaq, A. Malik et al, 2005. Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochem Photobiol* 81(1), p38-45.

F. Hernandez, P. Melgarejo, F.A. Tomas-Barberan, F. Artes, 1999. Evolution of juice anthocyan insduring ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur. Food Res. Technol.* 210, p 39–42.

I. Hamid, 2014. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum*) caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de doctorat, université d'Angers.

G. Tirzitis, G. Bartosz, 2010. Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. Vol. 57, n° 1, p139-142.

G.M. Levin, 1994. Pomegranate (*Punica granatum*) plantgenetic resources in Turkmenistan. Plant Genetic Resources Newsletter, p 31-97.

J.L. Lamaison, C. Carnat, 1990. Pharm. Acta. Helv. 1990, 65(11), p 315-320.

M. Al, L. Dezmirean, D. Adela, M. Otilia, B. Laslo, L.S. Bogdanov, 2009. Physico- chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. Food Chemistry, Breska, 112, p 863-867.

M. Aviram, L. Dornfeld et al, 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutrition 71(5), p 1062- 1076.

M. Aviram, N. Volkova et al, 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein edeficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. J Agric Food Chem 56(3), p 1148-1157.

M. Dubois, K.A. Gilles, P.A. Rebers, F. Smith, 1956. Colorimetric method for detrmination of sugars and related substances, Annal, Chem, 28, p 350-356.

M. Gil, F. Tomas-Barberan et al, 2000. Antioxydant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of agricultural and food chemistry. n°48, p 4581-4589.

M. Haidari, M. Ali et al, 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. Phytomedicine 16(12), p 1127-1136.

M. Herrero, 2011. Influence des fermentations alcoolique et malolactique sur la composition chimique des cidres à distiller en cours d'élaboration. Thèse de doctorat, université de Céan.

M. Splimont, 2013. Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose. Thèse de doctorat, université d'Auvergne.

M. H. Akin, 2008. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. Thèse de doctorat, université de Toulouse.

M. H. Davidson, K.C. Maki et al, 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 104(7), p 936- 942.

M.N. Al-Muammar, F. Khan, 2012. Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition* 28(6), p 595-604.

N. Artik, H. Murakami, T. Mori, 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*. 12, p492–499.

N. Boizot, J.P. Charpentier, 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier .*Le Cahier des Techniques de l'Inra*. p 79-82.

N.P. Seeram, L.S. Adams et al, 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. *J Nutr Biochem* 16(6), p 360-367.

N.P. Seeram, M. Aviram et al, 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem* 56(4), p 1415-1422.

N.P. Seeram, R. Lee et al, 2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L) juice. *Clin Chim Acta* 348(1-2), p 63-68.

P. Estanove, 1990. Note technique : Valorisation de la datte, in Dollé V. (ed.), les systèmes agricoles oasiens, G. Toutain. (ed.). Montpellier : CIHEAM, Options Méditerranéennes : Série A. Séminaire Médiaterrainéens, n° 11, p 301-318.

S. De Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo, 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foods tuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, p 5331–5337.

S.L. Dallas, L. F. Bonewald, 2010. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* 1192, p 437-443.

W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity; *LWT Food Science and Technology*; Vol 28 n°1, p 25-30.

P. Megarejo, D.M. Salazar, 2003. *Tratado de fruticultura para zonas aridas YSemiaridas*. Vol 2, 416 p.

P. Megarejo, D. Valero, 2012. *Série A : Mediterranean Seminars*. n° 103.

Y. Amakura, M. Okada, S. Tsuji, Y. Tonogai, 2000. Determination of phenolicacids in fruit juices by isocratic columnliquid chromatography. *J. Chromatogr.* 891, p. 183–188

VI. Annexe

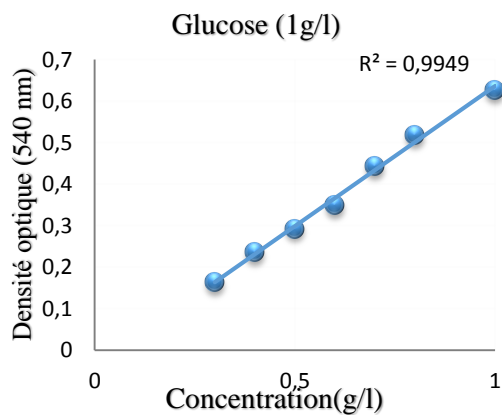
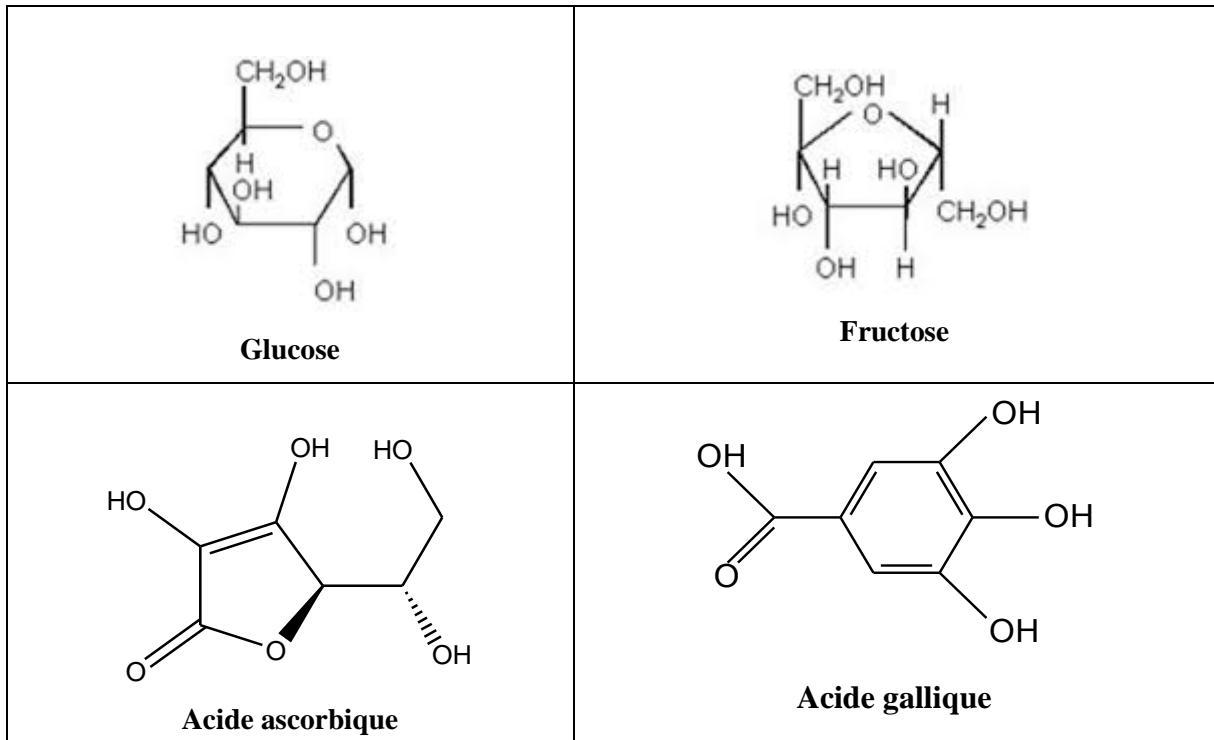


Figure 20 : Courbe d'étalonnage du glucose.

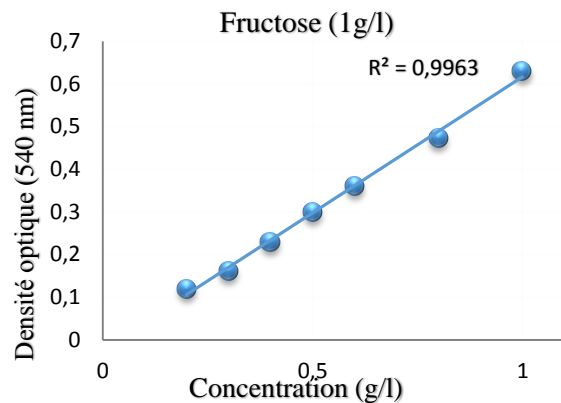


Figure 21 : Courbe d'étalonnage du fructose.

Tableau 6 : Situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Messaad	1010 m	34°10'00''N	3°30'00''E	Aride
Tlemcen	882 m	34°53'24''N	1°19'12''O	Semi-aride