



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté en vue de l'obtention d'un Diplôme de MASTER 2 Recherche

« Agroenvironnement et Bioindicateur »

THÈME

ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE
punica granatum (GRENADE)

Soutenu le : 24/06/2024

Présentée par : - BEKHOUCHE Karima

Devant Le Jury Composé de :

DELIMI Amel	MCA	PRESIDENTE	UCBET
LECHKHEB Hanene	MCB	EXAMINATRICE	UCBET
LARHAM Aicha Beya	MAA	PROMOTEUR	UCBET

Année universitaire 2023-2024

Remerciement

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude, avant tout à dieu le tout puissant qui m'a aidé et m'a donné le courage pour mener à terme ce modeste travail.

*En seconde lieu, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame **Larhem Aicha Baya**, Maitre Assistante «**A**» à la faculté des sciences de la nature et de la vie l' université Chadli Benjdid d'El Taref, pour m'avoir conseillé et aidé durant toute la période du travail.*

*Mes remerciements à **Dr. Delimi Amel**, Maitre de conférence «**A**» à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Chadli Benjdid d' El Taref, d'avoir accepté d'examiner, d'évaluer ce travail et qui a bien acceptée de me faire le grand honneur de présider le jury de ma soutenance.*

*Mes remerciements à **Dr. Lechkheb Hanene**, Maitre de conférences «**B**» à la faculté des sciences de la nature et de vie de l'université Chadli Benjdid d' El Taref, d'avoir accepté d'examiner, d'évaluer ce travail et de siéger au jury de ma soutenance.*

*Mes remerciements à tous les enseignants du département de Biologie de
L'université d'El Taref*



Dédicace

Je dédie ce modeste travail À

Mes chers parents pour leur tendresse, leur amour et leur sacrifice, leur aide morale et Financière. Vous êtes les êtres les plus chers à mon cœur, aucun mot ne pourra exprimer ma gratitude et mon estime pour Vous.

Toutes mes sœurs, tous mes frères et tous les membres de la famille

***Bekhouché** , et mon fiancé, et enfin à mes amies avec lesquelles j'ai partagé des moments inoubliables (**Marwa et Nabila**)*

Tous les étudiants du Master

*« **Agro environnement et Bio indicateur** »*

Karima



SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction	02
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE GRENADIER	
1.1. Introduction	06
1. 2.Nomenclature	08
1.3. Grenadier dans le règne Végétal	08
1. 4. Biologie du grenadier	09
1.4.1. Fleurs	09
1. 4.2. Fruit	10
1.5. Propriétés thérapeutiques des grenades (<i>Punica granatum L.</i>)	10
1.5.1. Propriétés antioxydantes de la grenade	10
1. 5.2. Action préventive des maladies cardiovasculaires	11
1.5.3. Inhibition de l'oxydation des LDL	11
1.5.4. Action anticancéreuse	12
1.5.5. Action antimicrobienne	13

2. Composition physicochimique du grenadier	13
2.1. Caractéristiques physiques des fruits	14
2.2. Caractéristiques chimiques des fruits	14
2.2.1. Le jus de grenade	14
6.2.2. Graines	15
6.2.3. Ecorce de la grenade	16
CHAPITRE II	
LES COMPOSES PHENOLIQUES, STRUCTURES ET PROPRIETES	
2.1. Généralités	18
2.2. Classification et structure chimique	18
2.2.1. Acides phénoliques	18
2.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques	19
2.2.1.2. Acides hydroxybenzoïques	19
2.2.2. Acides coumariques	20
2.2.3. Les Stilbènes	20
2.2.4. Lignines et lignanes	21
2.2.5. Flavonoïdes	21
2.2.5.1. Flavones et flavonols	22
2.2.5.2. Flavanones et flavanonols	24
2.2.5.3. Flavanols	24
2.2.5.4. Anthocyanes	24
2.2.5.5. Isoflavones	24
2.2.5.6. Chalcones et Aurones	24
2.2.6. Tanins	25

2.2.6.1. Tanins hydrolysables	25
2.2.6.2. Tanins condensés	25
2.3. Toxicité des composés phénoliques de la grenade	26
2.4 Différentes utilisations de <i>Punica granatum L</i>	26
2.4.1. Usage culinaire	26
2.4.2. Utilisation industrielle	27
2.4.2.1. Les teintures naturelles	27
2.4.2.2. Le tannage et la teinture des cuirs	27
2.4.3 Utilisation médicinale	27
2.4.4 Utilisation de la grenade dans des produits cosmétiques	28
2.4.5 Usage ornemental	29
2.4.6 Autres utilisations	29
PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE III	
METHODE D'ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES	
3.1. Méthodes d'extraction	32
3.1.1. Méthodes classiques	32
3.1.2. Méthodes alternatives	33
3.2. Méthodes de dosage et d'identification des composés phénoliques	33
Conclusion générale	39
Références bibliographiques	41

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 1. Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit).	15

Liste des tableaux et figures

Liste des Figures

Titre	Page
Figure 1. Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo and Valero, 2012)	07
Figure 2. Arbre du grenadier « Sefri » collectionné au domaine expérimental de l'INRA à Ain Taoujdate (500 m d'altitude).	08
Figure 3. Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum</i>) (Flora von Deutschland and Schweiz. 1885).	09
Figure 4. Fleur et fruits du grenadier 'Sefri 'sur un arbre en collection à l'INRA.	10
Figure 05 : Principales classes des composés phénoliques, * polymère de flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).	19
Figure 06 : Structures chimiques des principaux acides phénoliques (Chanforan, 2010).	20
Figure 07 : Structure chimique des acides coumariques (Macheix et al., 2005)	20
Figure 08 : Structures chimiques des stilbènes (Chanforan, 2010).	20
Figure 09 : Structure de base des flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).	21
Figure 10: Structure des différentes familles des flavonoides.	23
Figures 11 : Structures chimiques typiques des tanins (Achat, 2013).	25
Figure 12. Composition biochimique de l'écorce de grenade	34
Figure 13 . Composition biochimique de jus de grenade	35
Figure 14. Composition biochimique des grains de grenade	35
Figure 15 . Chromatogramme des composés phénoliques dans le jus de grenade (L5)	36

Résumé

La grenade est l'un des produits les plus riches en polyphénols, les tanins et les anthocyanes. Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne, la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, de maladies cérébro-vasculaires et certains cancers. C'est pour ces raisons que la culture du grenadier connaît un regain d'intérêt dans plusieurs pays en raison d'une demande assez forte de ces fruits sur le marché. La grenade, très anciennement connue dans le monde, est considérée comme un symbole de beauté et de fertilité.

La grenade (*Punica granatum*) est un fruit riche en nutriments et en composés bioactifs. Voici une vue d'ensemble de ses principales compositions biochimiques : Polyphénols : : Pigments responsables de la couleur rouge du jus. Ellagitannins et acide ellagique : Puissants antioxydants. : Divers composés avec des propriétés. : Présents principalement dans les graines et l'écorce, avec des propriétés astringentes et antioxydantes.

L'écorce du fruit contient également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique, elle renferme aussi des molécules de nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la , la corilagine, la granatine A et la granatine B. Les flavonoïdes sa coloration jaunes et anthocyanidine; responsables de la couleur rouge des grenades. L'écorce de grenade se compose également, d'acide gras, de catéchines, de quercétines et de rutines.

La grenade est un fruit important dans notre vie quotidienne en raison de ses nombreux bienfaits pour la santé. Sa composition chimique la rend unique, car elle contient une large gamme de vitamines, de minéraux et de composés végétaux bénéfiques. Une consommation régulière peut avoir un effet positif significatif sur notre santé.

Mots clés: Punica granatum, polyphénols, Anthocyanines, Flavonoïdes, antioxydantes, Tanins, punicalagine,.

Abstract

Pomegranate is one of the richest products in soluble polyphenols, tannins, and anthocyanins. These constituents exhibit various biological activities such as eliminating free radicals, inhibiting microbial growth, and reducing the risks of cardiovascular diseases, cerebrovascular diseases, and certain cancers. For these reasons, pomegranate cultivation is experiencing renewed interest in several countries due to strong market demand for these fruits. Pomegranate, known since ancient times around the world, is considered a symbol of beauty and fertility.

The pomegranate (*Punica granatum*) is a fruit rich in nutrients and bioactive compounds. Here is an overview of its main biochemical compositions:

- : Pigments responsible for the red color of the juice.
- Ellagitannins and ellagic acid: Powerful.
- : Various compounds with antioxidant properties.
- : Present mainly in the seeds and peel, with astringent and properties.

The peel of the fruit also contains two important hydroxybenzoic acids, gallic acid and ellagic acid. It also contains many ellagitannins such as punicalin, corilagin, granatin A, and granatin B. The peel has yellow pigments and anthocyanidins, which are responsible for the red color of pomegranates. Additionally, the pomegranate peel contains fatty acids, catechins, quercetins, and rutin.

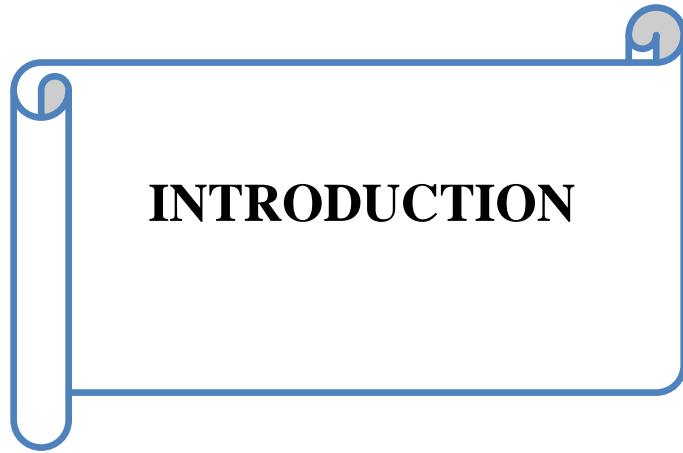
Pomegranate is an important fruit in our daily lives due to its numerous health benefits. Its chemical composition makes it unique because it contains a wide range of vitamins, minerals, and beneficial plant compounds. Regular consumption can have a significant positive impact on our health.

Keywords: *Punica granatum*, polyphenols, anthocyanins, flavonoids, antioxidant, tannins, punicalagin,

ملخص

يُعدُّ الرمان واحدًا من أغنى المنتجات بالبولىفينولات القابلة للذوبان، والعفص، والأنثوسيانين. تتمتع هذه المكونات بأنشطة بيولوجية متنوعة مثل التخلص من الجذور الحرة، تثبيط نمو الميكروبات، تقليل مخاطر الأمراض القلبية الوعائية، الأمراض الدماغية الوعائية وبعض أنواع السرطان. لهذه الأسباب، تشهد زراعة شجرة الرمان اهتمامًا متزايدًا في عدة بلدان نظرًا للطلب القوي على هذه الفاكهة في السوق. الرمان، المعروف منذ القدم في العالم، يُعتبر رمزًا للجمال والخصوبة الرمان (*Punica granatum*) هو فاكهة غنية بالعناصر الغذائية والمركبات النشطة بيولوجيًا. فيما يلي نظرة عامة على مكوناته البيوكيميائية الرئيسية:

- البولىفينولات: أصباغ مسؤولة عن اللون الأحمر للعصير.
 - الإلاجيتانينات وحمض الإلاجيك: مضادات أكسدة قوية.
 - الفلافونويدات: مركبات متنوعة ذات خصائص مضادة للأكسدة.
 - التانينات: موجودة بشكل رئيسي في البذور والقشرة، ولها خصائص قابضة ومضادة للأكسدة.
- يحتوي قشر الرمان أيضًا على اثنين من الأحماض الهيدروكسي بنزويك المهمة، حمض الغاليك وحمض الإلاجيك. كما يحتوي على العديد من الإلاجيتانينات مثل البونيكالين، الكوريلاجين، الجراناتين A والجراناتين B. بالإضافة إلى ذلك، تحتوي القشرة على أصباغ صفراء وأنثوسيانيد المسؤولين عن اللون الأحمر للرمان. يتكون قشر الرمان أيضًا من الأحماض الدهنية، الكاتيكينات، الكويرسيتين والروتين.
- الرمان يعد من الفواكه المهمة في حياتنا اليومية بسبب فوائده الصحية العديدة. لهذا تركيبه الكيميائي يجعله مميزًا لأنه يحتوي على مجموعة واسعة من الفيتامينات، والمعادن، والمركبات النباتية المفيدة. واستهلاكه بانتظام يمكن أن يكون له تأثير إيجابي كبير على صحتنا.
- كلمات مفتاحية:** *Punica granatum*، بولىفينولات، أنثوسيانينات، فلافونويدات، مضادات الأكسدة، تانينات، بونيكالاجين.



INTRODUCTION

Depuis ces dernières années, une grande attention est accordée aux bienfaits de la consommation régulière des fruits et légumes sur la santé humaine. Cette valeur nutritive réside dans la grande variété de molécules biologiquement actives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines...) (Tomas-Barberan and Gil, 2008). La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydants notamment les polyphénols solubles, les tanins et les anthocyanes (Gil et al., 2000). Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébro-vasculaires et certains cancers (Mena et al., 2011). Les extraits du grenadier peuvent être utilisés aussi pour la prévention ou la guérison de l'athérosclérose, des diarrhées, des ulcères gastriques et des maladies liées à l'œstrogène telle que la maladie de Paget du mamelon (Holland et al., 2009).

La grenade (*Punica granatum* L.) est une culture traditionnelle, cultivée dans le monde entier dans les régions subtropicales et tropicales. On pense qu'il est originaire d'Asie centrale, en particulier de l'Iran et des pays voisins, d'où il s'est propagé au reste du monde (Teixeira da Silva et al., 2013). En médecine traditionnelle, toutes ses parties, fruits, racines, écorce, pépins et feuille sont utilisés (ACHOUCHE et AZOUZI, 2019; BAKHTAOUI, 2019).

Aujourd'hui, les pays méditerranéens et asiatiques sont les principaux centres de culture commerciale de la grenade (Verma et al., 2010). Ces dernières années l'Algérie est l'un des principaux producteurs de la grenade des pays méditerranéens avec une production annuelle totale de 717,063 t à 790,374 t (Meziane et al., 2016). Les grenades cultivés dans l'Algérie sont importantes en fonction du poids des fruits et des écorces, du nombre d'arilles, du rendement en jus, de l'acidité, de la teneur en solides solubles totaux et de l'indice de maturité (Meziane et al., 2016). La partie comestible, grains, est consommée à l'état frais et peut être conservée sous forme de sirop ou utilisée pour la fabrication de la gelée, de jus ...etc. L'écorce et les grains du fruit sont des sources très importantes de minéraux (macros et oligoéléments) et de métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes...).

Les fruits de la grenade sont également considérés comme des aliments fonctionnels en raison de leur teneur élevée en composés phénoliques, en vitamines et en minéraux. Des nombreux rapports ont montré la bioactivité de la grenade. Les grenades ont montré une activité antioxydante plus élevée que le thé vert (BAKHTAOUI, 2019). Des études ont montré que la grenade a plusieurs fonctionnalités thérapeutiques: antimutagène (Cano-

INTRODUCTION

Lamadrid et *al.*, 2016), prévention du cancer et traitement du cancer (Lansky et Newman, 2007), antioxydant (Kalaycıoğlu et Erim, 2017), les activités anti-inflammatoires, hépato-protectrices et neuro-protectrices (Rahmani et *al.*, 2017) et d'autres effets favorables à la santé (Viuda-Martos et *al.*, 2010).

Ce présent mémoire a pour objet la réalisation d'une recherche bibliographique et une étude sur les propriétés biologiques de la grenade telles que : l'effet anti oxydantes, antimicrobienne, anti-inflammatoires.

L'écorce et les grains du fruit sont des sources très importantes de minéraux (macros et oligoéléments) et de métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes...). Pour cette raison dans le second chapitre nous avons synthétisé des recherches et des études récentes portées sur la structure et les propriétés des composés phénoliques.

A la fin pour extraire et dosées ces composées nous citons dans la dernière chapitre les méthodes classique et alternatives largement utilisées pour les quantifiées.

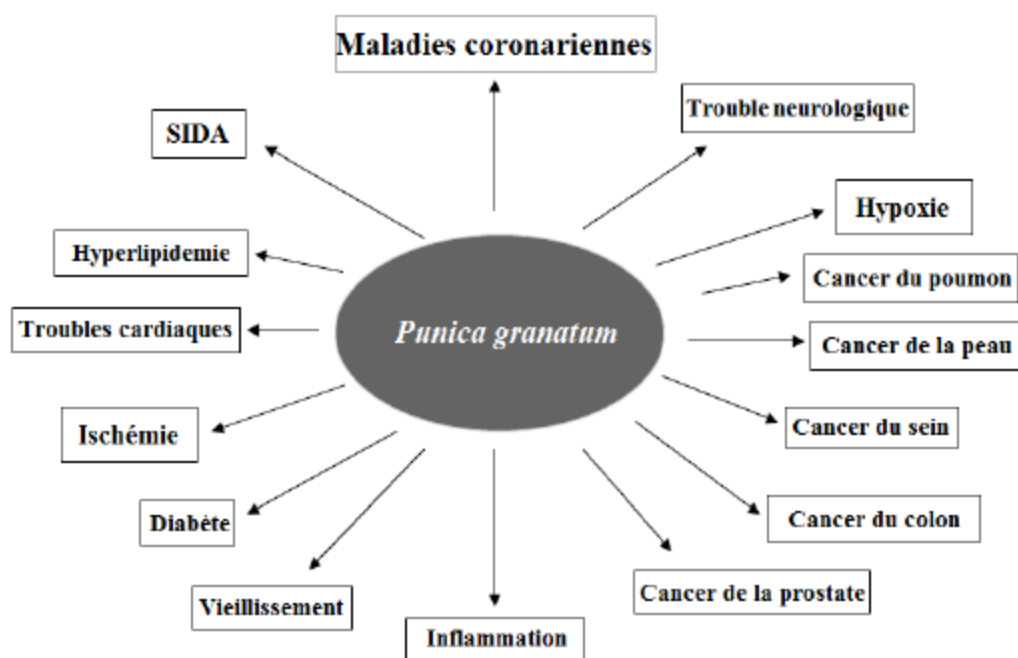


Figure 1 : Maladies traitées par *Punica granatum*(Seeram et *al.*, 2006).



PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I
GENERALITES SUR LE GRENADIER

1.1. Introduction:

Depuis ces dernières années, une grande attention est accordée aux bienfaits de la consommation régulière des fruits et légumes sur la santé humaine. Cette valeur nutritive réside dans la grande variété de molécules biologiquement actives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines...) (Tomas-Barberan and Gil, 2008). La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydants notamment les polyphénols solubles, les tanins et les anthocyanes (Gil et al., 2000). Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébro-vasculaires et certains cancers (Mena et al., 2011). Les extraits du grenadier peuvent être utilisés aussi pour la prévention ou la guérison de l'athérosclérose, des diarrhées, des ulcères gastriques et des maladies liées à l'œstrogène telle que la maladie de Paget du mamelon (Holland et al., 2009).

C'est pour ces raisons que la culture du grenadier connaît un regain d'intérêt dans plusieurs pays en raison d'une demande assez forte de ces fruits sur le marché. La grenade, très anciennement connue dans le monde, est considérée comme un symbole de beauté et de fertilité. Il existe plus de 1000 cultivars de *Punica granatum*, originaires du Moyen-Orient, de la région méditerranéenne, de l'Est de la Chine, de l'Inde, du Sud-Ouest américain, de la Californie et du Mexique (Lansky and Newman, 2007). Les cultivars les plus connus commercialement dans le monde sont 'Roja' et 'Mollar de Elche' en Espagne, 'Hicaznar' en Turquie, 'Manfalouty' en Egypte, 'Rosh Hapered' et 'Acco' en Israël, 'Bagua' en Inde, 'Malas Yazdi' en Iran et 'Wonderful' et aux USA (Caliskan and Bayazit, 2012).

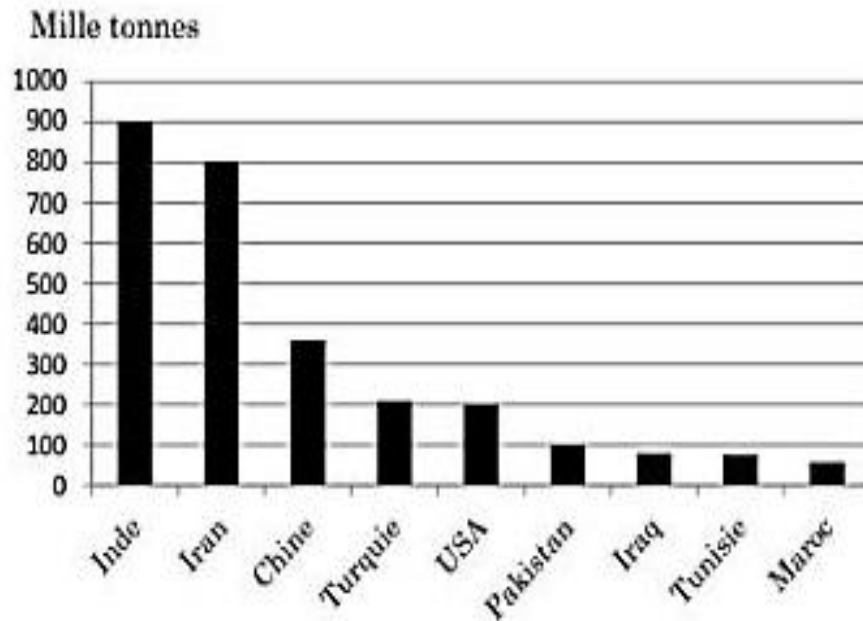


Figure 1. Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo and Valero, 2012).

Au Maroc, la culture du grenadier repose sur une gamme variétale réduite bien que le germoplasme local comprend plusieurs variétés. La collection de l'INRA qui comprend des variétés étrangères et des géotypes locaux, témoigne de l'importance accordée à cette espèce dans la diversification de la production fruitière et servira de base pour répondre à des besoins spécifiques des professionnels. La diversité phénotypique rassemblée en collection reste indispensable pour conduire un programme d'amélioration génétique. L'organisation de cette diversité génétique chez cette espèce est peu connue. En effet, seuls quelques travaux de caractérisation pomologie et d'évaluation agronomique conduits sur cette collection avaient permis de proposer les variétés pour la culture (Oukabli et al., 2004). Ainsi, l'élaboration d'une étude pomologique approfondie basée sur la caractérisation biochimique s'avère très nécessaire afin de confirmer la variabilité observée dans l'étude élaborée par Martinez et al., (2012).



Figure 2. Arbre du grenadier « Sefri » collectionné au domaine expérimental de l'INRA à Ain Taoujdate (500 m d'altitude).

1. 2.Nomenclature:

- Nom scientifique : *Punica granatum*
- Nom français : grenadier
- Nom anglais : pomegranate
- Nom espagnol : Granada
- Nom italien : Melograno
- Nom arabe : Romane

1.3. Grenadier dans le règne Végétal:

Le grenadier (*Punica granatum L.*), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des *Punicaceae*, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (Sarkhosh et al., 2006). Il est depuis longtemps cultivé à but ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits contiennent de nombreuses graines, chacun enrobé dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppé dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Les fruits sont consommés en frais et sont aussi utilisés pour produire un sirop dont le principal ingrédient est sa pulpe au goût acide. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge.

Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification (Melgarejo,1993)

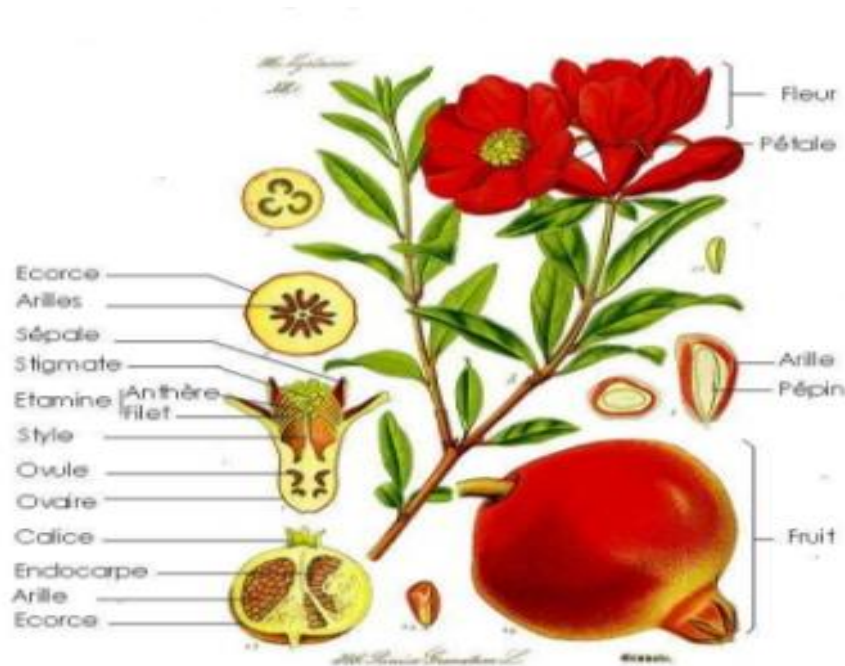


Figure 3. Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland and Schweiz. 1885).

1. 4. Biologie du grenadier:

Les feuilles du grenadier sont opposées ou sous-opposées, luisantes, étroites, et de forme oblongues, entières, de 3 à 7 cm de long et de 2 cm de large. Ses fleurs sont rouge vif, de 3 cm de diamètre et ayant cinq pétales (souvent davantage sur les plantes cultivées). Elles sont hermaphrodites, portant de 4 à 8 sépales coriaces et un même nombre de pétales rouges, de nombreuses étamines et un nombre variable de sépales, qui constitue l’ovaire inférieur. Son fruit est une baie, dont la taille varie entre celle d’une orange ou d’un pamplemousse, de 7 à 12 cm de diamètre, de forme hexagonale arrondie ; son écorce est épaisse, rougeâtre et contient de nombreuses graines. Les fruits du grenadier ont un taux de respiration faible et un rythme respiratoire non climatérique (Ben-Arie et al., 1984).

1.4.1. Fleurs

La période normale de la floraison de différents cultivars de grenadier se produit généralement entre mars- avril et juin- aout. Elle dure jusqu’à 10 –12 semaines et voire plus selon les variétés et les conditions géographiques (Ben-Arie et al.,1984). Sur le plan de la biologie florale, le grenadier est une espèce monoïque qui développe, sur le

même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles en formes de "vase", et des fleurs mâles stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés (en forme de cloche) (Melgarejo and Salazar, 2003).

La dominance revient généralement aux fleurs mâles avec un taux de 60 à 70 % selon les variétés et les saisons, les variétés de grenadiers sont auto fertile, mais peuvent être également inter-polinisés, avec cependant une dominance de la pollinisation libre. La première vague de floraison donne le meilleur taux de nouaison (90 %) avec des fruits de bonne qualité et qui sont moins susceptibles à l'éclatement (Chaudhari and Desai, 1993).

1. 4.2. Fruit

Le grenadier, bien conduit entre en production à partir de la quatrième année. Il est déconseillé de cueillir par temps humide, car les fruits risquent également de se fendre. Selon les variétés, la période de maturité des grenades a lieu entre la fin du mois d'aout et de décembre (Melgarejo, 1993).



Figure 4. Fleur et fruits du grenadier 'Sefri 'sur un arbre en collection à l'INRA.

1.5. Propriétés thérapeutiques des grenades (*Punica granatum L.*)

1.5.1. Propriétés antioxydantes de la grenade:

Un rapport de l'OMS, datant de novembre 2003, sur l'alimentation, la nutrition et la prévention des maladies chroniques recommandent la consommation journalière d'au moins 400g de fruits et de légumes (à l'exclusion des féculents tels que les pommes de terre) pour prévenir les maladies chroniques et notamment les cardiopathies, les cancers, le diabète de type II et l'obésité (Sumner et al., 2005 ; Seeram et al., 2007)

Les effets bénéfiques sur la santé qui sont attribués à la consommation de fruits et de légumes sont, au moins en partie, liés à leurs activités antioxydantes. En effet, chez les végétaux comestibles, nous comptons plusieurs centaines de molécules antioxydantes.

Parmi les plus connus de ces antioxydants naturels, nous trouvons la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes (β -carotène et lycopène) et les polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes). Les grenades sont parmi les fruits les plus riches en vitamine C et en composés phénoliques et surtout en anthocyanines et acides phénoliques (El- Nemr et al., 1992).

Pour qu'un composé soit défini comme antioxydant, il doit satisfaire deux conditions :

1. Présent à faible concentration par rapport au substrat susceptible à oxyder, il doit retarder ou empêcher l'oxydation causée par des radicaux libres.
2. Les radicaux libres neutralisés par ce composé doivent former une entité stable, afin d'interrompre la chaîne des réactions d'oxydation.

La composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de polyphénols ayant des propriétés antioxydantes très importantes à savoir les tanins que l'on trouve en concentration très élevée dans les tiges et l'écorce du grenadier (Seeram et al., 2006).

1. 5.2. Action préventive des maladies cardiovasculaires:

L'activité protectrice des polyphénols apportée par l'alimentation contre les maladies cardio-vasculaires est due à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, la formation des macrophages et l'athérosclérose (Aviram et al., 2002).

1.5.3. Inhibition de l'oxydation des LDL:

Les polyphénols de jus de grenade protègent les LDL contre l'oxydation à médiation cellulaire via deux mécanismes qui mettent en jeu une interaction directe des polyphénols avec la lipoprotéine et/ou une action indirecte liée à l'accumulation des polyphénols dans les macrophages artériels. Il a ainsi été démontré que les polyphénols de grenade inhibent l'oxydation des LDL en détruisant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

Par ailleurs, les polyphénols de grenade augmentent l'activité paraoxonase sérique, ce qui entraîne l'hydrolyse des peroxydes lipidiques dans les lipoprotéines oxydées et dans les

lésions athérosclérotiques. Ces propriétés antioxydantes et antiathérogènes des polyphénols de grenade ont été démontrées *in vitro* ainsi qu'*in vivo* chez l'être humain et chez la souris athérosclérotique déficiente en apolipoprotéine E (Aviram et al., 2002).

1.5.4. Action anticancéreuse:

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Les flavonoïdes peuvent induire cette différenciation avec une toxicité plus faible que les rétinoïdes, ce qui les rend intéressants pour le traitement de la leucémie, mais aussi pour la lutte contre le cancer de la prostate, mais aussi contre d'autres types de cancer tels que celui de l'intestin et du sein (Madlener et al., 2006 ; Adams et al., 2006 ; Ackland et al., 2005). Ainsi, les fractions riches en polyphénols de grenade ont une activité anti- proliférative, anti-invasive, antiéicosanoïde, antiangiogène et pro-apoptotique sur des cellules cancéreuses de sein et de prostate. Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que des extraits riches en flavonoïdes, obtenus l'un à partir de jus de grenade fermenté et l'autre à partir de péricarpe de grenade, sont fortement promoteurs de différenciation, alors que l'extrait de jus de grenade frais a un effet plutôt faible. Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (Kawaii and Lansky, 2004)

L'acide ellagique, l'acide caféique, la lutéoline et l'acide punicique sont des molécules présentes dans la grenade et elles sont testées en tant qu'inhibiteurs de la croissance *in vitro* de cellules cancéreuses humaines de prostate (PC-3). Chaque molécule et à une concentration de 4 mg/ml inhibe, de manière significative, la prolifération des cellules cancéreuses et lorsque l'acide caféique, l'acide pucinique et la lutéoline sont utilisés en combinaison aux mêmes concentrations, une inhibition supplémentaire est observée (Lansky et al., 2005)

Seeram et al. (2006)a , par ailleurs, montré que les différents antioxydants du jus de grenade agissent de manière synergique, puisque le jus de grenade a une activité antioxydante plus élevée qu'un extrait de tanins totaux de grenade, que la punicalagine seule ou que l'acide ellagique seul. Ainsi, le jus de grenade a la plus forte activité antiproliférative sur des lignes cellulaires de cancer du côlon (inhibition de 30 à 100 %) (Seeram et al., 2005)

1.5.5. Action antimicrobienne:

Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressants. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée du HIV-1 qui peuvent être isolés par adsorption sur de l'amidon de maïs. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires (Neurath et al., 2004).

Prashanth et al. (2001) ont étudié, *in vitro*, l'action de différents extraits d'écorce de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les extraits d'écorce de grenade employés sont obtenus à partir de solvants différents, permettant d'isoler les divers principes actifs de ce fruit. Ainsi, en utilisant comme solvant l'eau à température ambiante. Il y aura isolement des tanins et d'autres composés phénoliques, tandis qu'avec le méthanol, des tanins et des alcaloïdes sont extraits. Toutefois, le chloroforme permet d'extraire les alcaloïdes et enfin avec l'éther de pétrole, des stérols. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait méthanolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis*.

2. Composition physicochimique du grenadier

La composition physico-chimique varie selon les espèces et au sein d'une même espèce. Elle dépend des conditions de culture, de la qualité du sol, du climat, des irrigations,...) et de la période de récolte (précoce ou tardive) (Ozkan, 2002).

L'intégration du jus de grenadier comme ingrédients innovant dans le développement de nouveaux produits fait partie des principaux leviers du marché. Ainsi, la grenade est un fruit bénéfique pour la santé et peut être utilisée par les industries agroalimentaires pour améliorer la qualité nutritionnelle des aliments, des boissons ou la formulation des compléments alimentaires.

Pour cette raison, nous pensons que le jus de grenadier a tout à fait sa place dans les linéaires des boissons à base de fruits. L'enjeu d'un tel projet est de réussir à développer une gamme de boissons à base du grenadier qui, en apportant un bénéfique produit inédit et

attractif, puisse faire évoluer les linéaires des boissons à base de fruits et surprendre les consommateurs.

2.1. Caractéristiques physiques des fruits:

Le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216 g. De point de vue botanique, le fruit de grenadier se compose de 3 parties : l'épiderme (écorce), les arilles et les pépins. La proportion de l'épiderme qui est la partie extérieure du fruit représente 28 à 32% du poids total du fruit, alors que le taux en graines varie de 55 à 60 % du poids total du fruit (Al-Maiman and Ahmad, 2002, Oukabli et al., 2004). Dans une autre étude concernant des cultivars iraniens, le poids du fruit varie entre 197 g et 315 g, le pourcentage en arilles est compris entre 38–65% du poids total du fruit, écorce (32,28–59,82%), pépins (9,44–20,55%) et jus (26,95-46,55 ml/100g du fruit) (Tehranifar et al., 2010).

2.2. Caractéristiques chimiques des fruits:

2.2.1. Le jus de grenade:

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. Le tableau 1 montre les valeurs minimales et maximales obtenues pour les acides organiques et les sucres selon une étude élaborée par Melgarejo et al. (2000). Lansky et al. (2007) ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans la grenade, il y a la valine, proline et méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de portion comestible selon le codex alimentaires en 2009.

	Composé	Quantité
Acides organiques (Melgarejo et al., 2000)	Acide citrique	0,09- 0,32
	Acide malique	0,10- 0,21
	Acide oxalique	0,01- 0,07
	Acide tartrique	0,01- 0,05
	Acide fumarique	0,01
Sucres (Melgarejo et al., 2000)	Fructose	5,54- 8,24
	Glucose	5,53- 7,80
	Saccharose	0,01- 0,07
Minéraux et métaux lourds (codex alimentarius, 2009)	Phosphore	0,30
	Fer	259,00
	Potassium	3,00
	Calcium	3,00
	Sodium	3,00
	Manganèse	0,12
	Magnésium	0,15
	Cuivre	0,07
	Sélénium	0,60
(codex alimentarius, 2009)	Vitamine B1	0,03
	Vitamine B2	0,03
(Tehranifar et al., 2010)	Vitamine C	9,90- 17,60

Tableau 1. Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit).

La grenade a aussi une concentration assez importante en minéraux (tableau 1). Entre les différents composés qui pourraient servir de marqueurs sans équivoque dans un produit de jus de fruits, les acides organiques et les composés phénoliques qui sont potentiellement les plus utiles en raison de leur ubiquité, leur spécificité et leur multiplicité.

Le grenadier contient aussi des flavanols et des indole-amines comme la tryptamine, la sérotonine, neuromédiateur qui intervient dans la régulation du sommeil, de l'appétit et de l'humeur ainsi que la mélatonine, connue sous le nom « d'hormone du sommeil » qui intervenant dans la régulation des rythmes chronobiologiques (Lansky et al., 2007).

Enfin, sa teneur en composés phénoliques et surtout en anthocyanines, puissantes molécules antioxydantes fournissant au jus de grenade sa couleur brillante, augmente jusqu'à maturité du fruit et diminue après la pression du fruit (Hernandez et al., 1999).

6.2.2. Graines:


L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, acides gras présentant au moins une double liaison, essentiellement représentée par l'acide punique, acide cis-9,trans-11,cis-15,octadécatriénoïque, mais également par les acides oléiques et linoléiques (Hornung et al., 2002). Cette huile se compose aussi d'acides

gras saturés, qui ne présentent aucune double liaison, comme les acides palmitiques et stéariques (Lansky et al., 2007).

Il a été mis en évidence l'existence d'hormones stéroïdiennes dans les graines de grenade (Tsuyuki et al., 1981). De plus, ces graines contiennent aussi de nombreux stérols, comme le cholestérol ou le stigmastérol. Enfin, elles renferment aussi un glycolipide entrant dans la composition des gaines de myéline des mammifères et le cérébroside (Lansky et al., 2007).

6.2.3. Ecorce de la grenade:

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (Lansky et al., 2007). Ces tanins représentent jusqu'à 28% de l'épiderme du fruit (Fournier, 1948). La pelletiérine pourrait aussi se trouver dans l'écorce de la grenade. En effet, la méthode de dosage des alcaloïdes est basée sur l'utilisation du réactif Dragendorff. Cette méthode répond positivement à la présence de pelletiérine (Lansky et al., 2007).



CHAPITRE II
LES COMPOSES PHENOLIQUES,
STRUCTURES ET PROPRIETES

2.1. Généralités:

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. Ils accumulent des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix et al., 2005). Ces métabolites secondaires sont répartis différemment dans le règne végétal avec des niveaux d'accumulation qualitative et quantitative variables. Parmi ces composés secondaires, on peut citer ; les alcaloïdes, les terpénoïdes, les composés phénoliques...etc. Les composés phénoliques ou polyphénols, représentent un groupe important de molécules chimiques, caractéristiques de végétaux, que nous étudierons dans ce chapitre.

2.2. Classification et structure chimique:

Les composés phénoliques peuvent être répartis selon, la complexité de leur squelette de base, le degré de modification de ce squelette et les liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules, en une dizaine de classes différentes (Macheix et al., 2005 ; Pietta, 2000). Ils ont pour structure de base, plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils vont de la simple structure avec un anneau aromatique à des substances polymériques hautement complexes tels que les tanins et les lignines. Les phénols sont des constituants importants de certaines plantes médicinales et sont utilisés dans l'industrie alimentaire.

2.2.1. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (Benhammou, 2011).

2.2.1.1. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. Les acides cinnamiques sont retrouvés dans les plantes sous forme d'esters d'acides quiniques, acide shikimique et acide tartrique. Par exemple, l'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique et l'acide quinique (Macheix et al., 2005).

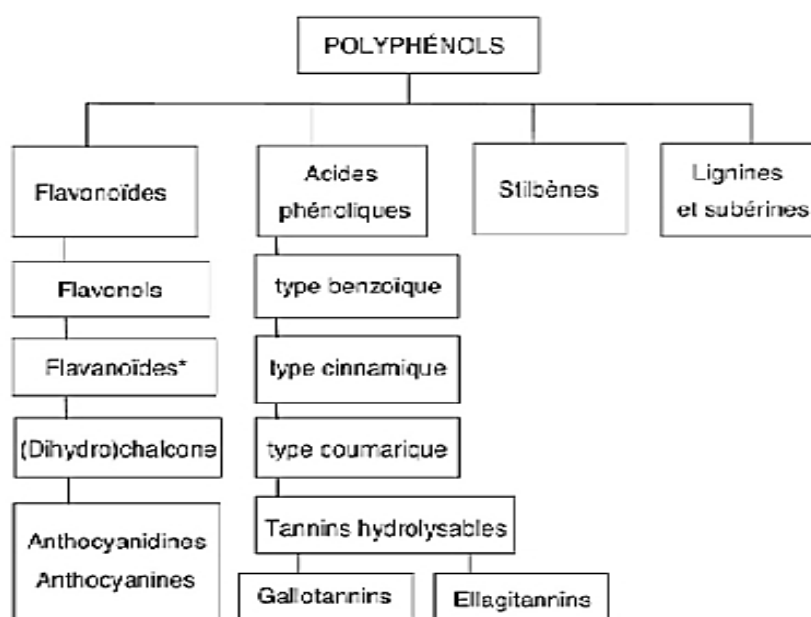
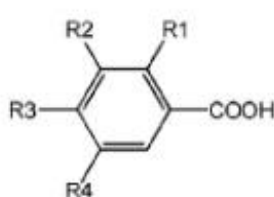


Figure 05 : Principales classes des composés phénoliques, * polymère de flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).

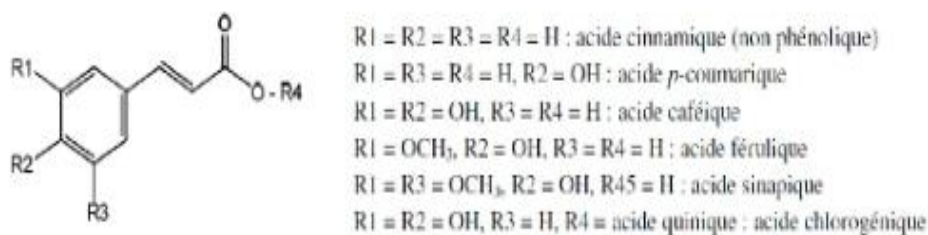
2.2.1.2. Acides hydroxybenzoïques

Les acides phénoliques en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (Bruneton, 1999). Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique(Figure05).



- R1 = R2 = R3 = R4 = H : acide benzoïque (non phénolique)
- R1 = R2 = R4 = H, R3 = OH : acide *p*-hydroxybenzoïque
- R1 = R4 = H, R2 = R3 = OH : acide protocatéchique
- R1 = R4 = H, R2 = OCH₃, R3 = OH : acide vanillique
- R1 = H, R2 = R3 = R4 = OH : acide gallique
- R1 = H, R2 = R4 = OCH₃, R3 = OH : acide syringique

Acides hydroxybenzoïques



Acides hydroxycinnamiques

Figure 06 : Structures chimiques des principaux acides phénoliques (Chanforan, 2010).

2.2.2. Acides coumariques

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Figure 07). Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du fruit (Cowan, 1999).

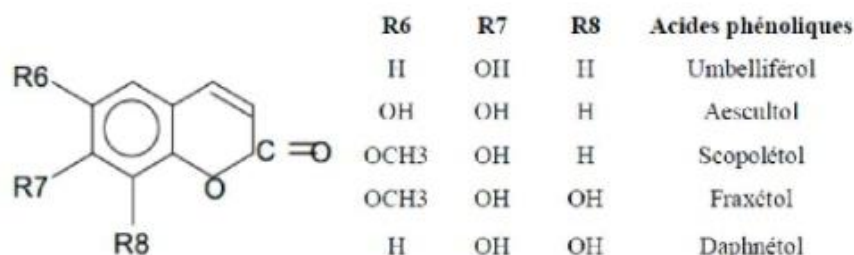
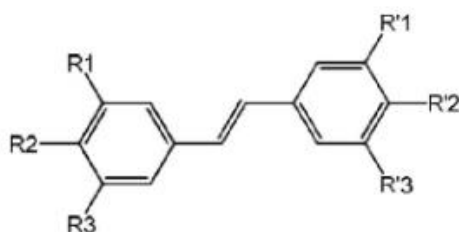


Figure 07 : Structure chimique des acides coumariques (Macheix et al., 2005)

2.2.3. Les Stilbènes

Les stilbènes répondent à une représentation structurale de type C₆-C₂-C₆ (Figure 08). Ils dérivent des acides hydroxycinnamiques et regroupent des dérivés hydroxy- et méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques et polymériques.



$R_1 = R_3 = R'_2 = OH, R_2 = R'_1 = R'_3 = H$: resvératrol
 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R'_2 = OH$: ptérostilbène
 $R_1 = \text{glucose}, R_2 = R'_3 = OH, R'_2 = R'_1 = OH, R'_2 = OCH_3$: rhapontine
 $R_1 = \text{glucose}, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R_3 = R'_2 = OH$: picéide

Figure 08 : Structures chimiques des stilbènes (Chanforan, 2010).

2.2.4. Lignines et lignanes

Les lignanes sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Ils sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique, par des réactions de couplage radicalaire (Bruneton, 2009). La lignine est le résultat de polymérisation d'unités en C6-C3 des lignanes, plus ou moins réticulé et d'une grande complexité structurale. C'est le deuxième biopolymère abondant sur la terre après la cellulose. Elle joue un rôle structural en conférant au bois sa rigidité (Buchanan et al., 2000 ; Bruneton, 2009).

2.2.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols, molécules connues pour leurs multiples activités biologiques. Les flavonoïdes sont omniprésents dans les plantes ; presque tous les tissus végétaux sont capables d'en synthétiser. Il existe également une grande variété naturelle. En effet, au début des années 90, le nombre de structures de flavonoïdes rapporté était d'environ 4000 (Harborne, 1993). La structure de base de ces composés regroupe un grand nombre de molécules. Elle est constituée d'un squelette carboné en C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Figure 06). Ces 15 atomes de carbone répartis sur deux noyaux benzéniques (A et B) sont reliés par une chaîne linéaire de 3 atomes de carbone, formant en général un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Harborne, 1993).

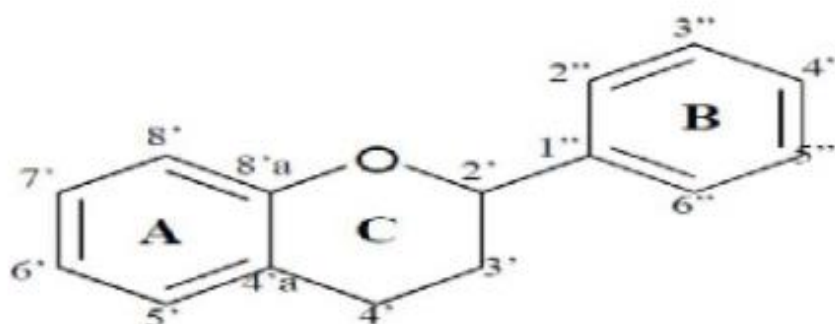


Figure 09 : Structure de base des flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).

Les flavonoïdes peuvent-être subdivisés en différents sous-groupes (Figure 07) en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel est fixé l'anneau B et du degré d'insaturation et d'oxydation de l'anneau C.

2.2.5.1. Flavones et flavonols

Les flavones ont une double liaison entre les C2 et C3 et une cétone en position C4 de l'anneau C (Figure 07). Ils ont un groupe hydroxyle en position 5 du cycle A, tandis que l'hydroxylation dans d'autres positions, pour la plupart se situe en position 7 du cycle A ou en 3 et 4' de l'anneau B. Les flavones ont un rôle moins important et sont beaucoup moins fréquentes que les flavonols dans les fruits et légumes. La glycosylation se produit principalement sur les positions 5 et 7. Les flavonols se différencient des flavones par l'existence d'un OH en position 3 qui peut être glycosylé. Ce sont les flavonoïdes les plus répandus ; les trois principales structures sont le kaempferol, la quercétine et la myricétine. La quercétine est sans doute le composé phénolique le plus répandu dans la nature (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Han et al., 2007). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides.

2.2.5.2. Flavanones et flavanonols

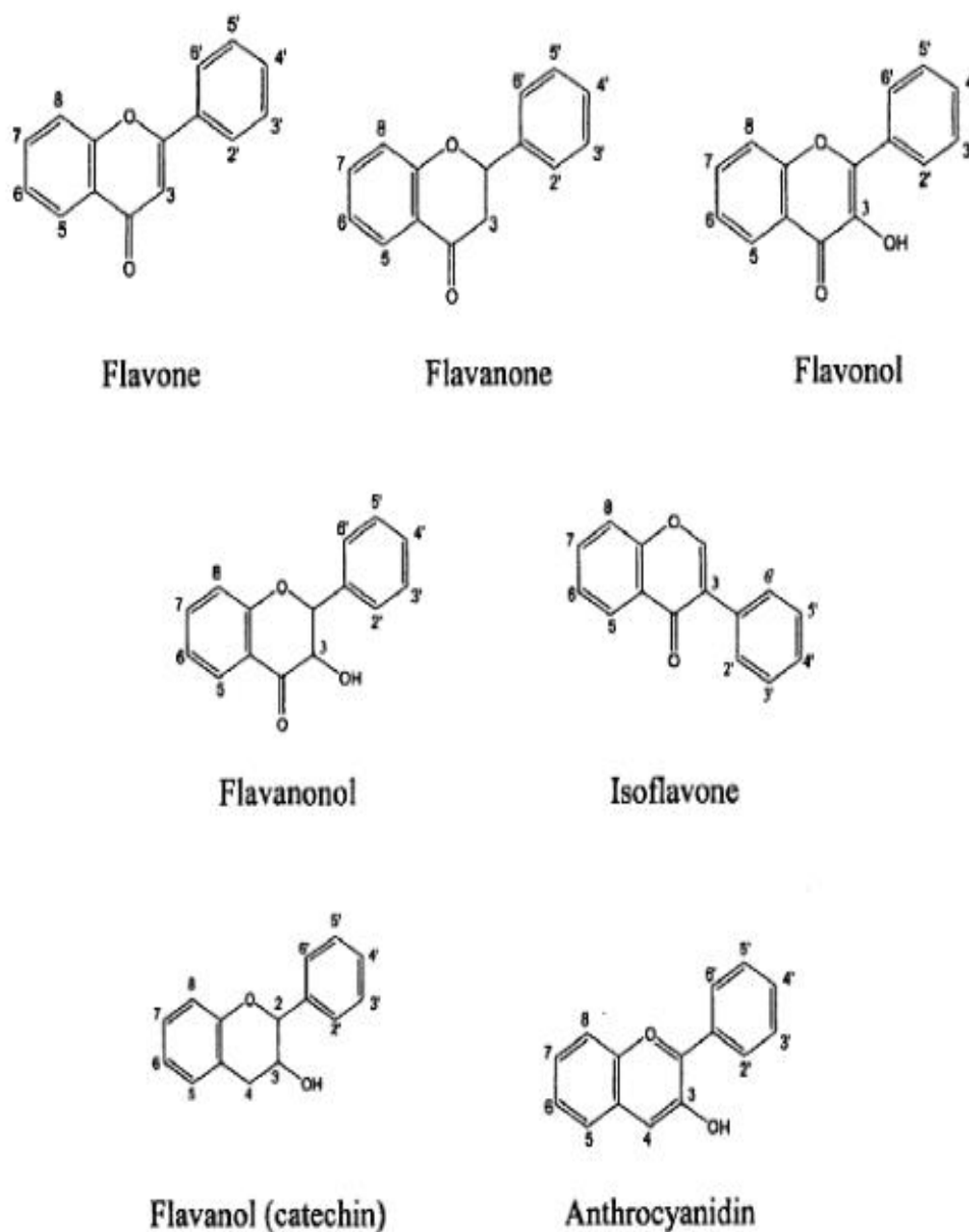


Figure 10: Structure des différentes familles des flavonoides.

Les flavanones, également appelés dihydroflavones, sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 (Figure 07). Les principaux aglycones sont l'ériodictyol, la naringénine et l'hésperitine. Ils peuvent être multihydroxylés, et plusieurs groupes hydroxyle peuvent être glycosylés ou méthylés (Tsao, 2010).

Les flavanonols, également appelés dihydroflavonols, sont les dérivés 3-hydroxy des flavanones.

2.2.5.3. Flavanols

Les flavanols sont également appelés flavan-3-ols, car le groupe hydroxyle est presque toujours lié à la position 3 du cycle C (Figure 07) ; on les appelle aussi catéchines. La (+) - catéchine et la (-) - épicatechine sont les deux isomères les plus souvent présents dans les plantes comestibles. Les flavanols, en particulier, la catéchine et l'épicatechine, ont la capacité à former des polymères, appelés proanthocyanidines ou tanins condensés. Le nom "proanthocyanidines" est dû au fait qu'un clivage catalysé par un acide produit des anthocyanidines (Manach et al., 2004 Tsao, 2010).

2.2.5.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C (Figure 07). Ce sont des composés responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violette et bleue observées dans la nature. Les anthocyanes interviennent directement dans les interactions plantes-animaux et surtout dans l'attraction des pollinisateurs par la couleur des fleurs (Buchanan et al., 2000). Plus de 500 composés anthocyanidines sont connus selon le degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle B. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine (Tsao, 2010).

2.2.5.5. Isoflavones

Les isoflavones telle que la génistéine n'ont pas la structure classique en C6-C3-C6 des autres flavonoïdes, possèdent des structures peu classiques, dans lesquelles, l'anneau B est attaché à la position 3 de l'anneau C et sont moins répandus (Ribéreau-Gayon, 1968). Ce sont des composés presque spécifiques de la famille des Fabacées. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone) (Chaouch, 2014). Ils ont des similitudes structurelles avec les oestrogènes, tel que l'oestradiol, et pour cette raison, ils sont également appelés phytoestrogènes.

2.2.5.6. Chalcones et Aurones

Les chalcones sont différent des autres types de flavonoïdes (figure 08) par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α , β -insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes(Hammoud,2009).

Les aurones dérivent directement des chalcones. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes.

2.2.6. Tanins

Les tanins constituent un groupe avec une diversité large en structure, qui partage leur capacité de lier et précipiter les protéines. Selon la structure (Figure 09), on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi proanthocyanidines (Han et al., 2007).

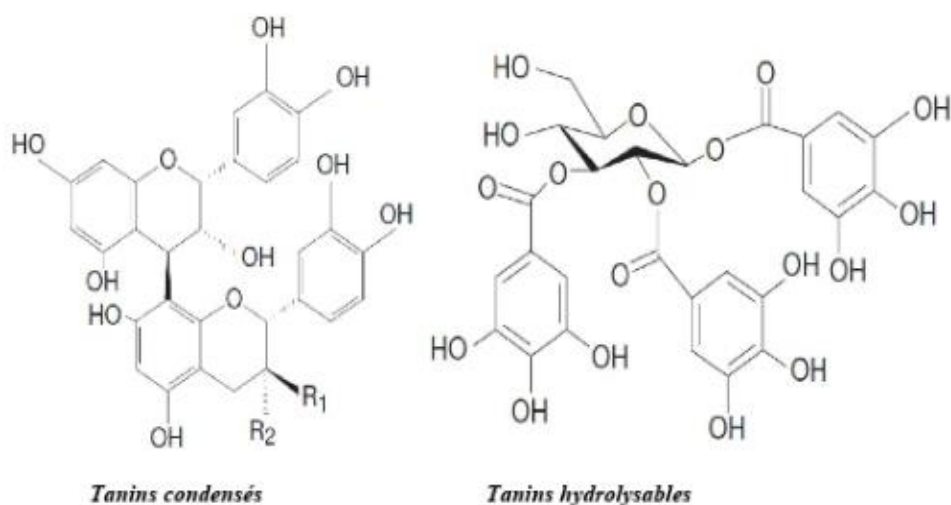
2.2.6.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters de glucides et d'un nombre variable d'acides phénols. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitanins (Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999). Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Vermerris & Nicholson, 2006).

2.2.6.2. Tanins condensés

Les proanthocyanidines, également connues sous le nom de tanins condensés, sont des dimères, des oligomères et des polymères de catéchine qui sont liés entre eux par des liaisons. Entre C4 et C8 (ou C6). Grâce à la formation de complexes avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables du caractère astringent des fruits et des boissons. Ils diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucres dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Manach et al., 2004).

Les polymères de ces tanins se forment sous l'action d'acides ou d'enzymes, ils sont constitués généralement de 2 à 50 unités monomériques (Vermerris & Nicholson, 2006).



Figures 11 : Structures chimiques typiques des tanins (Achat, 2013).

2.3. Toxicité des composés phénoliques de la grenade

La grenade est largement consommée par de nombreuses civilisations depuis des milliers d'années, et aucun incident n'est signalé et donc elle ne représente aucun danger pour la santé humaine. Cependant, la consommation de la décoction de l'écorce de l'arbre et aussi du péricarpe 46 du fruit peut provoquer une toxicité qui reste à confirmer. Cette toxicité se manifeste par une inflammation sévère aiguë de l'estomac et même la mort de la personne, cela est dû à la présence des tanins et des alcaloïdes à la fois (Squillaci and Di Maggio, 1946). Une autre étude élaborée par Vidal et al. (2003) a montré que les Extraits phénoliques de fruits entiers causent une congestion des organes internes et une élévation de la créatinine in vivo. L'huile de pépins de grenade n'était pas toxique pour les larves de crevettes de saumure (Fatope et al., 2002), mais des réactions allergiques graves et cancer d'œsophage (Hegde et al., 2002) suite à une consommation très élevée de grain de grenades (Ghadirian et al., 1992) ont été mentionnées. Le jus de grenade contient des taux élevés en polyphénols (≥ 2 g/L), et il était considéré comme aliment toxique pour le bétail, une étude a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ces composés via un régime enrichi en punicalagine à une concentration de 6% administré sur une période de 37 jours. La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet toxique significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa faible appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (Cerda et al., 2003).

2.4 Différentes utilisations de *Punica granatum L*

Le grenadier est utilisé principalement dans l'alimentation humaine, dans les traitements thérapeutiques ainsi que dans les activités ornementales et industrielles (tannerie du cuir et Teinture).

2.4.1. Usage culinaire

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

La grenade peut être utilisée comme fruit de table. Les grains de grenade peuvent servir à garnir une salade de fruits, lui apportant une saveur sucrée acidulée.

D'après Saad, (2013) le sirop de grenadine était autrefois réalisé avec des grenades fraîches. La vraie grenadine de couleur rouge vif, est un sirop concentré de suc de graines de grenade. La grenade peut aussi être employée pour la confection de sorbets ou coulis, en passant les grains pulpeux au moulin à légumes, afin d'obtenir un jus épais, sombre et parfumé, qui servira de base à ces préparations. Le suc de grenade, qui est riche en pectines, peut être utilisé dans la préparation de gelées alimentaires.

2.4.2. Utilisation industrielle

2.4.2.1. Les teintures naturelles

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, des gris, bruns et noirs. Les parties utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce du fruit, les fleurs, les écorces des racines, des tiges et du tronc (Wald, 2009).

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).

2.4.2.2. Le tannage et la teinture des cuirs

D'après Wald, (2009) l'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs. Ainsi, c'est l'écorce du fruit qui était employée, pour donner la couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des chaussures " babouche".

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).

2.4.3 Utilisation médicinale

Le grenadier a été largement utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures (Lansky et *al.*, 2000). L'ancienne science médicinale indienne l'a identifiée comme une plante médicinale, (Kulkarni et *al.*, 2004).

Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge, 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 l'avortement, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et de brûlures (Lansky et *al.*, 2000).

Enfin, la pharmacopée chinoise référence aussi la fleur du grenadier, *Shi Liu Hua*, pour soulager les épistaxis, otites et hémorragies. Il est alors conseillé, en usage interne, de consommer de 3,5 à 7g par jour de décoction de fleurs. Ces fleurs peuvent aussi être employées en application locale (Guillaume G., 1987).

2.4.4 Utilisation de la grenade dans des produits cosmétiques

Plusieurs tests démontrent la capacité des polyphénols et particulièrement de l'acide ellagique et de ses dérivés, composés présents dans le jus et la peau des grenades, à lutter contre la pollution urbaine (Juliano et Magrini, 2017).

Il a ainsi été démontré que l'acide ellagique et ses dérivés, utilisés en application topique, protègent la peau et les matières kératinisées de façon à prévenir, atténuer et/ou supprimer les effets délétères des gaz toxiques tels que l'ozone, des métaux et des composés organiques présents dans la pollution urbaine. C'est pourquoi le groupe cosmétique l'Oréal a demandé le dépôt d'un brevet afin de développer une gamme cosmétique, contenant entre autre de l'acide ellagique, afin de réaliser des agents cosmétiques « anti-pollution » (Duchet *al.*, 2004).

Une étude a permis de montrer que l'application d'un extrait d'écorce de grenade, suite à une coloration capillaire, tend à optimiser son maintien au cours de lavages successifs. Il semble que la richesse de l'écorce de grenade en tanins, environ 60% de l'extrait, soit responsable de cette capacité à préserver les couleurs et ainsi d'éviter l'usage trop fréquent de colorants sur les cheveux (Wald, 2009).

Une autre étude, réalisée par une équipe de chercheurs indiens, a étudié les effets d'extraits méthanoliques de peau de grenades sur la cicatrisation de plaies cutanées chez des rats de la variété Wistar. Cette étude a montré que la peau de grenade permet d'aider à la cicatrisation de blessures cutanées. Des examens plus complets, utilisant la technique de chromatographie liquide haute performance, CLHP, ont montré que ces extraits de grenade, aux propriétés cicatrisantes, sont riches en catéchine et acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murthy et *al.*, 2004).

2.4.5 Usage ornemental

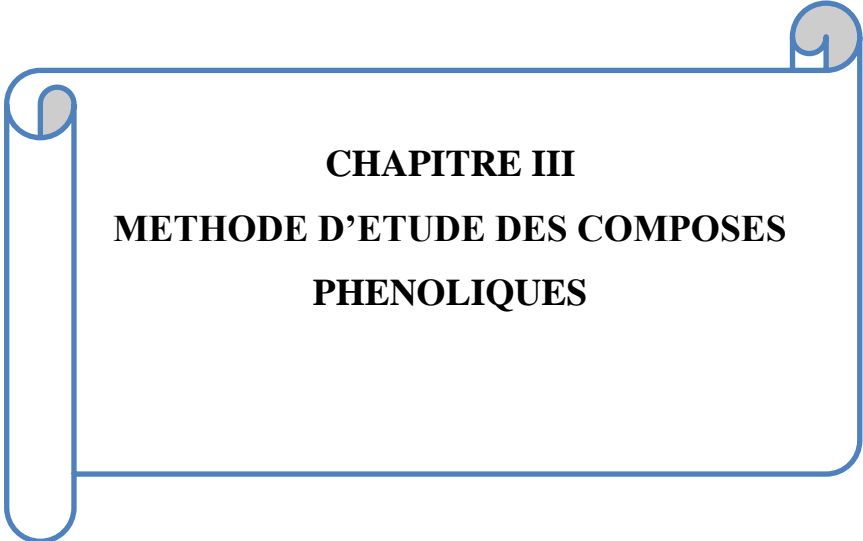
Utilisés pour décorer les jardins ou former des haies. En effet, le grenadier possède de très belles fleurs colorées d'une grande valeur ornementale.

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



**PARTIE
PRATIQUE**



CHAPITRE III
METHODE D'ETUDE DES COMPOSES
PHENOLIQUES

Deux facteurs majeurs jouent un rôle essentiel dans la recherche des produits naturels. Ce sont la séparation et la purification des constituants bioactifs dans les échantillons de plantes brutes ou leurs fractions obtenues à partir de différentes sources naturelles, et leur identification structurale précise (Patel et *al.*, 2010).

3.1. Méthodes d'extraction

L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété des composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (Antolovich et *al.*, 2000).

Ainsi, afin de protéger les composés phénoliques contre les processus de détérioration pendant l'extraction, l'ajout d'antioxydants et le travail dans des conditions d'atmosphère inerte sont proposés comme solution. La fidélité entre le profil phénolique du produit de départ et celui de l'extrait obtenu est un paramètre important qui doit-être pris en considération. Par conséquent, les conditions utilisées devraient être douces afin d'éviter l'oxydation, la dégradation thermique et d'autres changements chimiques et biochimiques dans les échantillons naturels. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des polyphénols à partir des plantes :

3.1.1. Méthodes classiques

La macération, comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Cette procédure, malgré les temps long d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques qui sont sensibles aux changements de température (Spigno & De Faveri, 2007). L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Elle est relativement peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients.

3.1.2. Méthodes alternatives

Actuellement il y a une demande croissante concernant la mise au point de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution. Des procédés d'extraction alternative existent, comme l'extraction assistée par ultrason, l'extraction assistée par micro-onde, l'extraction accélérée par solvant et l'extraction par fluide supercritique, sont considérées comme des eco-extractions (D'Alessandro, 2013).

3.2. Méthodes de dosage et d'identification des composés phénoliques

Les extraits végétaux bruts contiennent généralement un mélange complexe de différents constituants bioactifs. Parmi eux, les métabolites secondaires sont largement utilisés pour la préparation de médicaments à base de plantes. La détection rapide et précise des composés phytochimiques bioactifs est cruciale dans l'étude phytochimique des échantillons des plantes brutes. De nombreuses méthodes spectrophotométriques ont été développées pour la quantification des composés phénoliques. La méthode de Folin-Denis est la méthode la plus largement utilisée pour la quantification des composés phénoliques totaux dans les plantes, mais la méthode de Folin-Ciocalteu est aussi largement utilisée (Naczk & Shahidi, 2006). La méthode de la vanilline est d'usage pour la quantification des proanthocyanidines totaux dans les plantes.

Les réactifs des méthodes de Folin et de la vanilline ne sont pas spécifiques et peuvent interférer avec des substances absorbant dans l'UV telles que des protéines, des acides nucléiques et des acides aminés. Les méthodes spectroscopiques traditionnelles peuvent conduire à une surestimation des composés phénoliques présents dans les extraits en raison du chevauchement des réponses spectrales (Naczk & Shahidi, 2006). Les techniques chromatographiques contribuent de manière significative dans le domaine des produits naturels, notamment en ce qui concerne l'identification, la séparation et la caractérisation des composés bioactifs d'origine végétale. Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance, les séparations chromatographiques sur papier, couches minces ou sur colonnes avaient été largement développées pour l'analyse des composés phénoliques, ainsi que la séparation par électrophorèse sur papier. Ces techniques gardent encore un certain intérêt pour réaliser une première approche qualitative concernant un matériel végétal inconnu (Macheix et *al.*, 2005).

L'application de la chromatographie liquide est l'estimation qualitative ou quantitative d'une composition particulière d'échantillons obtenus à partir de sources naturelles. C'est une technique analytique robuste principalement utilisée pour l'analyse qualitative de classes non volatiles de composés tels que les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes (Harborne, 1998). Elle est très efficace et offre une séparation analytique (Chen et *al.*, 2012 ; Long et *al.*, 2014).

Un criblage efficace des extraits des plantes peut être effectué avec des dosages biologiques et des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en combinaison avec diverses méthodes de détection. La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-SM) est une variante de cette technique, offrant une identification efficace et typique des composés phénoliques. La plupart des méthodes LC-MS pour la séparation des composés phénoliques dans les échantillons de plantes sont basées sur la séparation en phase inverse (RP-LC ou RP-HPLC), en utilisant principalement la colonne C18 et les phases mobiles aqueuses (Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2010).

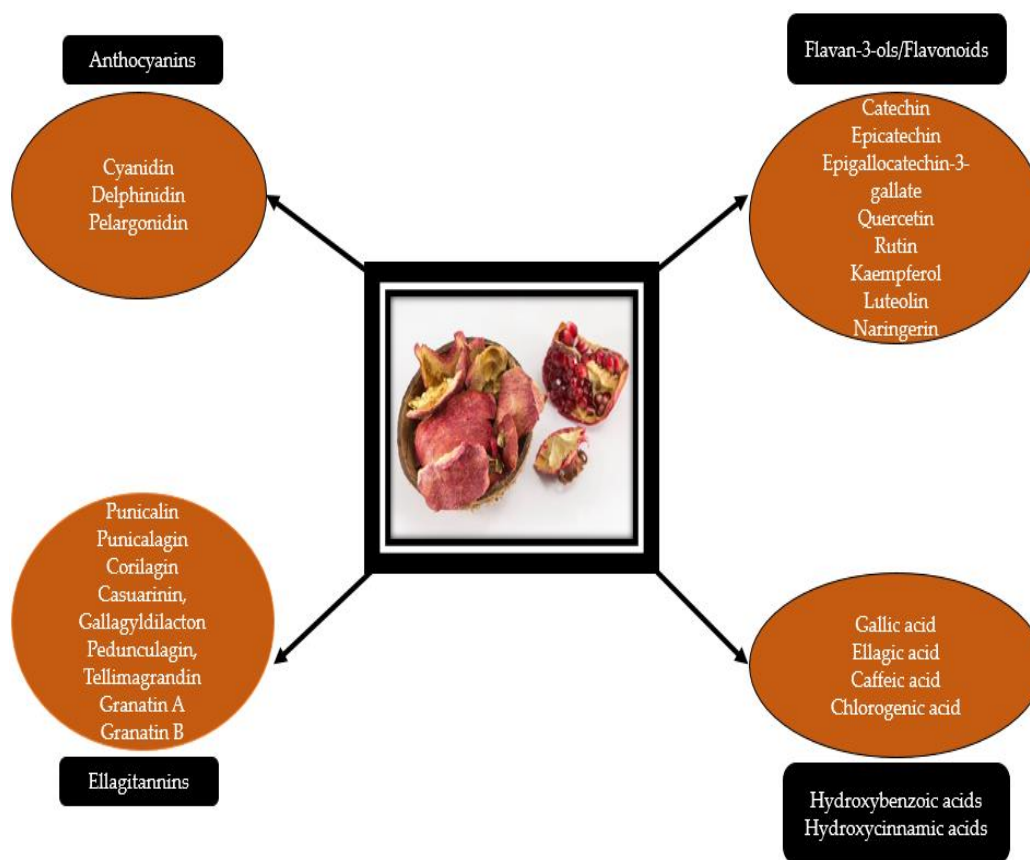


Figure 12. Composition biochimique de l'écorce de grenade

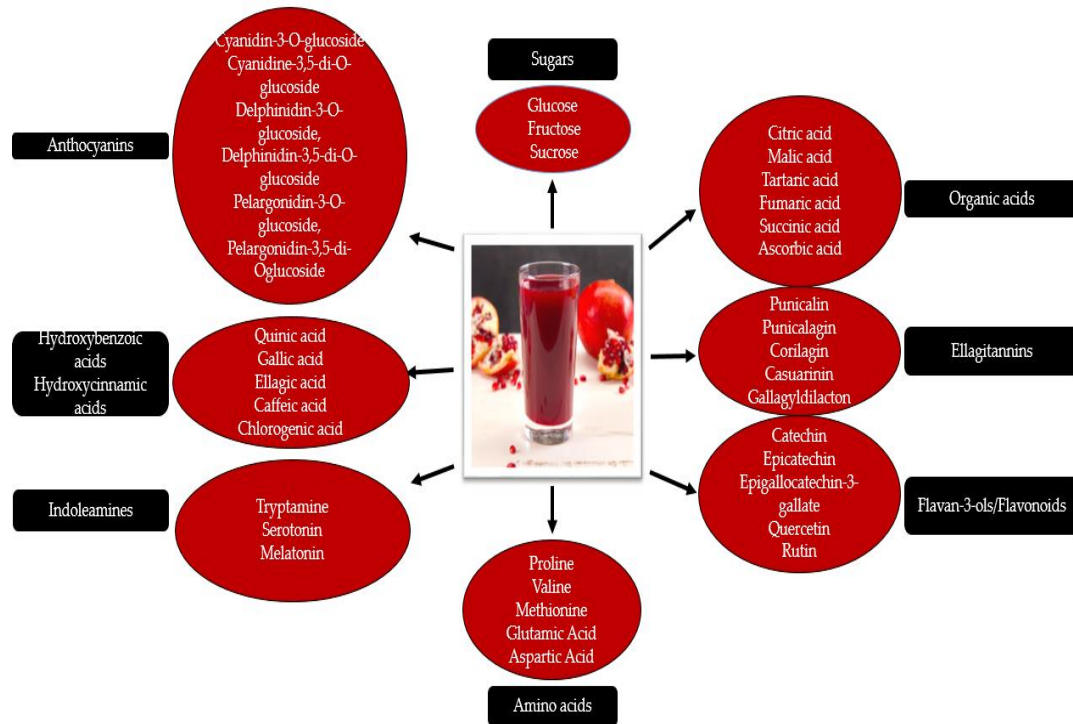


Figure 13 . Composition biochimique de jus de grenade

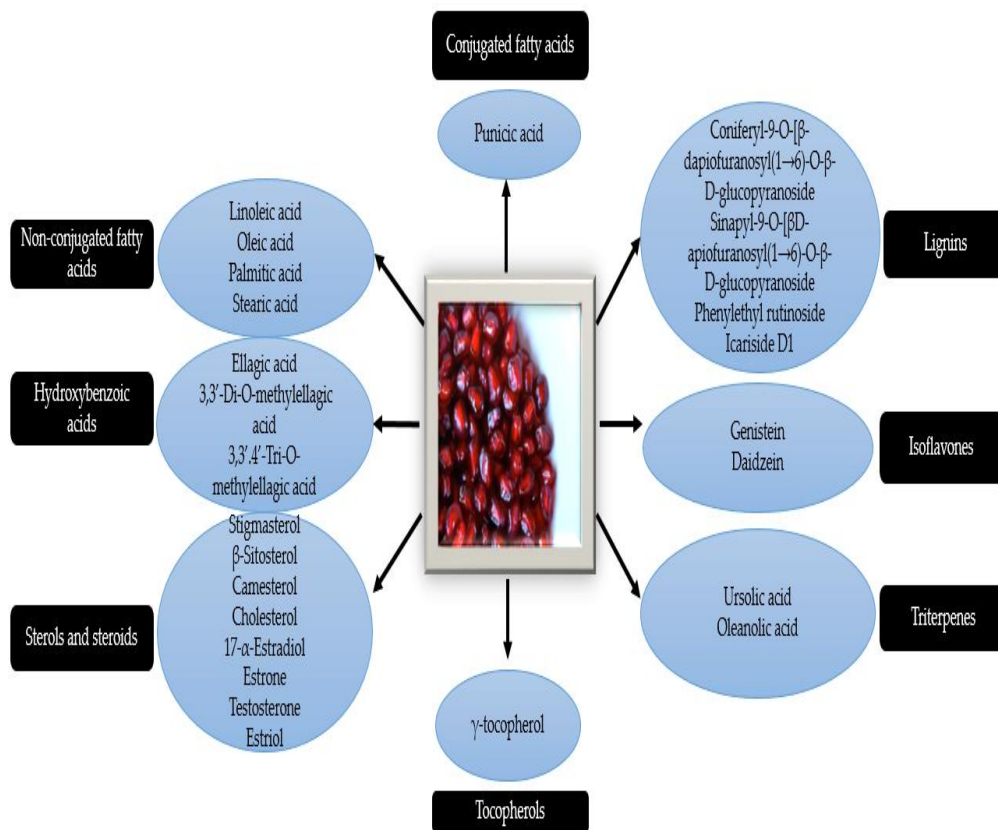


Figure 14. Composition biochimique des grains de grenade

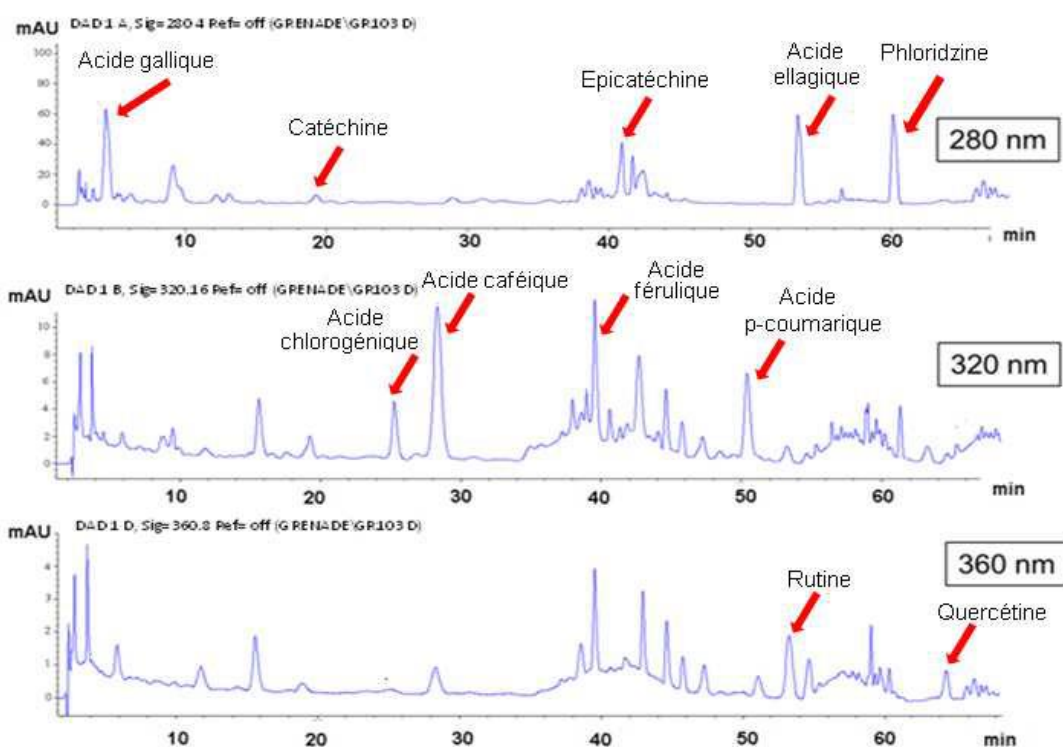
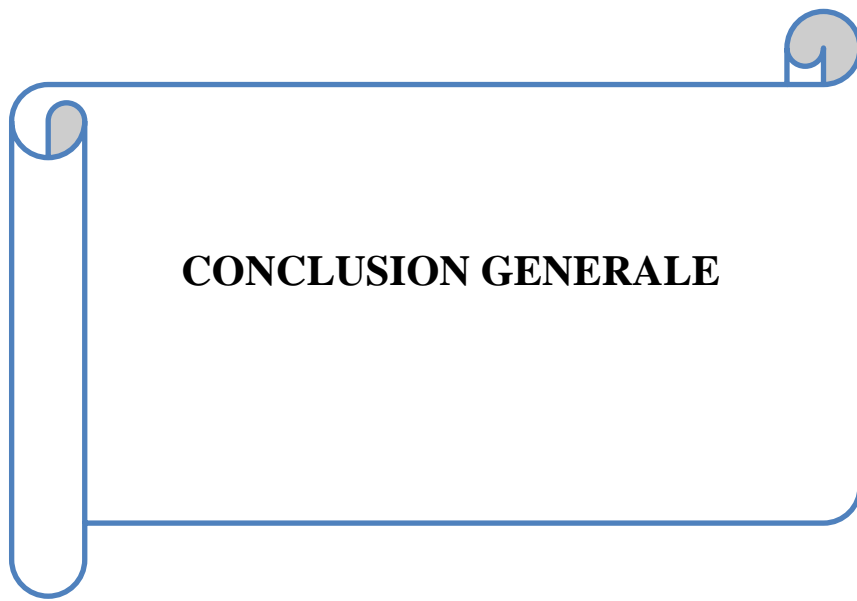


Figure 15 . Chromatogramme des composés phénoliques dans le jus de grenade (L5) cultivé au Maroc.

Chaque composé phénolique identifié dans les jus de grenade est trouvé en quantités mineures, sauf acides ellagique, gallique et p-coumarique. Toutefois, les concentrations de composés phénoliques sont les suivantes: l'acide gallique (12,42 'F4' - 88,51 mg/L 'F6'), la catechine (1,31 'F5' - 6,84 mg/L 'F3'), l'epicatechine (1,14 'F5' - 13,88 mg/L 'L9'), l'acide ellagique (23,43 'L9' - 95,02 mg/L 'L3'), l'acide chlorogénique ((0,9 'L9' - 2,63 mg/L 'F1'), l'acide p-coumarique (1,65 'L2' - 5,88 mg/L 'L7'), l'acide caféique (0,16 'F5' - 1,64 'F8' mg / L), l'acide férulique (0,41 'F4' - 4,78 mg / L 'L8'), la quercétine (0,60 'L7' - 5,61 mg/L 'L10'), la phloridzine (0,07 'F2' - 0,62 mg/L 'L7'), la rutine (0,68 'F2' - 3,12 mg/L 'L5'). L'acide férulique n'est pas détecté dans le cultivar Godo de Jativa 'F1', tandis que le cultivar Ruby 'F4' ne contient pas de quercétine et de la rutine. Il faut mentionner que les concentrations indiquées dans ce travail ne représentent que les formes libres des composés phénoliques, car aucune hydrolyse n'a été appliquée aux échantillons avant analyse HPLC.

En outre, des études antérieures ont montré la présence d'acide gallique, la quercétine, la catechine, l'acide chlorogénique et o-coumarique dans les jus de grenade (Artik et al., 1998). Poyrazoglu et al (2002) ont trouvé les concentrations de composés phénoliques suivantes: l'acide gallique 4,55 • } 8,55 mg/L, la catechine 3,72 • } 2,29 mg / L, l'acide

chlorogénique 1,24 • } 1,42 mg / L, l'acide caféique 0,78 • } 0,79 mg / L, l'acide férulique 0,01 • } 0,02 mg / L, la phloridzine 0,99 • } 1,47 mg / L et la quercétine 2,50 • } 1,96 mg / L. concernant d'autres fruits, Radi et al. (2004) ont pu montrer que l'abricot est très riche en acide chlorogénique, catéchine, épicatechine et rutine.



CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les plantes médicinales jouent un rôle majeur dans la vie humaine. Elles sont les principales sources d'alimentation d'une part et d'autre part, ces plantes sont largement utilisées dans le traitement et la prévention des maladies, surtout dans les pays en voie de développement.

La recherche scientifique a montré que les aliments naturels en plus de leurs effets nutritionnels ont des activités médicinales importantes. La consommation d'aliments fonctionnels peut prévenir un certain nombre de maladies, et la connaissance de ces avantages étant diffusée à la population pourrait encourager la consommation de ces aliments en raison de leurs avantages pour la santé.

Ce fruit améliore la santé. Ces effets physiologiques bénéfiques peuvent également avoir des applications préventives dans une variété de pathologies. Les avantages pour la santé de la grenade ont été attribués à sa large gamme de composés phytochimiques, qui sont principalement des polyphénols, y compris principalement des ellagitanins hydrolysables (punicalagin, punicalin, acide ellagique, gallotannins etc.), flavonoids (rutine, quercetine, et luteoline glycosides), des anthocyanines (cyanidine, delphinidine et pélargonidine glycosides) et d'autres polyphénols.

La teneur en antioxydants et les bienfaits potentiels sur la santé associés à la consommation de grenade et des produits à base de grenade ont entraîné une augmentation de la demande des consommateurs pour cette culture, ce qui en fait une culture à valeur élevée. Les avantages potentiels pour la santé et la haute teneur en antioxydants de ce fruit sont attribués aux composés polyphénoliques qu'il contient, y compris les acides phénoliques omniprésents, l'acide gallique et l'acide ellagique, et punicalagin A et punicalagin B, deux polyphénoliques uniques à ce fruit.

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...

Au final et comme perspectives de recherche sur les propriétés biologiques de la grenade, il sera peut-être intéressant de s'interroger sur les nouvelles molécules naturelles liées aux activités anti oxydantes et antimicrobienne qui peuvent éventuellement être utilisées dans l'industrie pharmaceutique afin d'améliorer l'efficacité des antibiotiques.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackland, M.L., van de Waarsenburg, S., Jones, R., 2005. Synergistic antiproliferative action of the avonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*. 19, 69–76.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer*. 113(3), 423-433.
- Alighourchi, H., Barzegar, M., Abbasi, S., 2008. Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food chem*. 110, 1036-1040.
- Al-Maiman, S.A., Ahmad, D., 2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum*L.) fruit maturation. *Food Chem*. 76, 437–441.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hofman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T., Fuhrman, B., 2002. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Under Exp. Clin. Res*. 28, 49–62.
- Ben-Arie, R., Segal, N., Guelfat-Reich, S., 1984. The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 109(6), 898-902.
 - Caliskan, O., Bayazit, S., 2012. Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Sci. Hortic*. 147, 81-88.
 - Cerdá, B., Cerón, J.J., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2003. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric. Food Chem*. vol. 51, no 11.
 - Chaudhari, S.M., Desai, U.T., 1993. Effects of plant growth regulators on flower sex in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 63(1), 34-35.
 - El-Nemr, S. E., Ismail, I. A., & Ragab, M. (1992). The chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruits. *Fluessiges-obst*.59(11). *Fruit processing*, 2(11), 162–164.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fatope, M.O., Al Burtomani, S.K., Takeda, Y., 2002. Monoacylglycerol from *Punica granatum* seed oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 357–360.
- Flora von Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D., 1885. Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany.
- Fournier, P., 1948. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editeur Paul Lechevalier. Tome II. 504 pages. Pages 286 - 291.
- Ghadirian, P., Ekoe, J.M., Thouez, J.P., 1992. Food habits and esophageal cancer: an overview. *Cancer Detect. Prev.* 16, 163–168.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant capacity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48 (10), 4581-4589.
- Guillaume G., Mach-Chieu. (1987). Pharmacopée et médecine traditionnelle chinoise - Plantes chinoises, plantes occidentales ; in : « Le grenadier (*Punicagranatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009
- Harbone, J.B., Grayer, R.J., 1988. The flavonoids, *Advances. In: research since 1980.* Harborne J B, Chapman and Hall, London, 1-20 p.
- Haslam, E., 1998. *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 422.
- Hegde, V.L., Mahesh, P.A., Venkatesh, Y.P., 2002. Anaphylaxis caused by mannitol in pomegranate (*Punica granatum*). *Allergy Clin. Immunol. Int.* 14, 37–39.
- Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F.A., Artes, F., 1999. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 39–42.
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, vol (35).
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., 2009. Pomegranate: botany. Horticulture. breeding. *Horticultural Reviews.* 35, 127-191.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Holland, D., Hatip, K. & Bar-YA'akov, I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture and Breeding. In: Janick J (eds) Horticultural Reviews. John Wiley & Sons Inc, pp. 127-191. in Food Science and Food Safety 2010;9:635–654.
- Hornung, E., Pernstich, C., Feussner, I., 2002. Formation of conjugated 1,3-diene double bonds by Δ^6 -linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. Eur. J. Biochem. 269, 4852–4859.
- Juliano C Et Magrini G.A. (2017).Cosmetic ingredients as emerging pollutants of environmental and health concern. Cosmetics, 4 (2): 11.
- Kawaii, S., Lansky, E.P., 2004. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells. J. Med. Food. 7 (1), 13 -8.
- 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
- Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., Divakar, S., 2004. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. Food Chem. 87, 551–557.
- 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.P., Harrison, G., Froom, P., Jiang, W.G., 2005. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. Investigational New Drugs. 23, 121-2.
- Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. ethnopharm. N°109. Pages 177-206.
- Lloyd J. U. (1897). *Punica granatum*. The western druggist, Chicago, 9 p
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., 2006. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* (Epub ahead of print).
- Martinez, J.J., Hernandez, F., Haddioui A., Legua, P., Martinez R., Ajal, A., Melgarejo, P., 2012. Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. *Sci. Hortic.* 140, 100-106.
- Melgarejo, P., 1993. Selección y tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).
- Melgarejo, P., Salazar, D.M., Artés, F., 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 185-190
- Melgarejo, P., Salazar, D.M.S., 2003. *Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiáridas*. Vol. 2: Algarr. 416 p.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D., Bartual, J., Saura, D., Martí, N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1893–1906.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D., Bartual, J., Saura, D., Martí, N., 2011. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1893–1906.
- Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., Martins, D., 2004. Anthocyanin concentration of “Assaria” pomegranate fruits during different cold storage conditions. *J. Biomedicine Biotechnol.* 338–342.
- Molyneux, P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.
- Morton J. (1987). Pomegranate. In: *Fruits of warm climates*. Miami, Florida. p. 352–355.
- Neurath, A.R., Strick N., Li Y.Y., Debnath A.K., 2004. *Punica granatum* (Pomegranate) juice pro-vides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect. Dis.* 4, 41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Oukabli, A., Bellaji, M., Chahbar, A., Elkacemi, A., Lahlou, M., Allabou, M., 2004. Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum* L.) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama*. 3, 111.
- Oukabli, A., Bellaji, M., Chahbar, A., Elkacemi, A., Lahlou, M., Allabou, M., 2004. Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum* L.) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama*. 3, 111.
- Ozkan, M., 2002. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chem.* 78 (4), 499–504.
- Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. N°72. Pages 171-173.
- Sambamoorthi, N., 2007. Hierarchical Cluster Analysis- Some Basics and Algorithms. In CRM portals Inc. USA.
- Sambamoorthi, N., 2007. Hierarchical Cluster Analysis- Some Basics and Algorithms. In CRM portals Inc. USA.
- Sarkhosh, A., Zamani. Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Sci. Hortic.* 111(1), 24-29.
- 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.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., 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. *J. Nutr. Biochem.* 16, 360–367.
- Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D., 2006. *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Squillaci, G., Di Maggio, G., 1946. Acute morbidity and mortality from decoctions of the bark of *Punica granatum*. *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1946, 1095–1096.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sumner, M.D., Elliott-Eller, M., Weidner, G., Daubenmier, J.J., Chew, M.H., Marlin, R., Raisin, C.J., Ornish, D., 2005. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 96 (6), 810-814.
- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., Vazifeshenas, M.R., 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant capacity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* 126(2), 180-185.
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 2008. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. *Technology and Nutrition* No. 157. CEBAS (CSIC). Spain .
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., 2008. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. *Technology and Nutrition* No. 157. CEBAS (CSIC). Spain
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P.M., 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J. Ethnopharm.* 89, 295–300.
- Walali Loudyi, D., 1995. Quelques espèces fruitières d'intérêts secondaires cultivées au Maroc, Zaragoza : CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes ; n, 13, pages 47- 62
- Wald, E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum* L.): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse. doc. Fac. Phar., Univ. Henri Poincaré-Nancy, 147 p.
- Wald, E. (2009). Le grenadier *Punica granatum* : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincare. Thèse. 158p.
- Wald, E., 2009. Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat. Faculté De Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1.