



HAL
open science

**CONTRIBUTION A LA VALORISATION
ALIMENTAIRE DE LA GRENADE MAROCAINE
(Punica Granatum L.) : CARACTERISATION
PHYSICOCHIMIQUE, BIOCHIMIQUE ET
STABILITE DE LEUR JUS FRAIS**

Ilham Hmid

► **To cite this version:**

Ilham Hmid. CONTRIBUTION A LA VALORISATION ALIMENTAIRE DE LA GRENADE MAROCAINE (Punica Granatum L.) : CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE, BIOCHIMIQUE ET STABILITE DE LEUR JUS FRAIS. Alimentation et Nutrition. Université d'Angers, 2013. Français. NNT: . tel-01066442

HAL Id: tel-01066442

<https://theses.hal.science/tel-01066442>

Submitted on 20 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Ilham HMID

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc)

Discipline : Agroalimentaire
Spécialité : Sciences agronomiques
Soutenue le 27 Décembre 2013
École doctorale : ED VENAM

Thèse N° 1310

CONTRIBUTION A LA VALORISATION ALIMENTAIRE DE LA GRENADE MAROCAINE (*Punica Granatum L.*) : CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE, BIOCHIMIQUE ET STABILITE DE LEUR JUS FRAIS

JURY

- M. Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, Professeur des Universités, Université Mohammed V - Rabat - MAROC, Président
- M. Driss ELOTHMANI**, Professeur des Universités, Groupe ESA d'Angers, Directeur de thèse et Examinateur (France)
- Mme Hafida HANINE**, Professeur des Universités, Université de Béni Mellal, Co-Directeur de thèse et Examinateur (Maroc)
- M. Ahmed OUKABLI**, Doctorat d'Etat Ingénieur en Chef Principal CRRA – INRA, Meknès, Co-encadrant et Examinateur.
- M. Youness BELAHSEN**, Professeur des Universités, Université Ibn Zohr, Ouarzazate, Rapporteur
- M. Mostafa MAHROUZ**, Professeur des Universités, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Rapporteur
- M. Hassan LATRACHE**, Professeur des Universités, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, Rapporteur
- Mme. Emira MEHINAGIC**, HDR, Responsable de l'Unité de Recherche GRAPPE Groupe ESA, Angers, Examinateur
- Mme. Bouchra BELKADI**, Professeur des Universités, Université Mohammed V- Rabat, Examinateur

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes chers parents pour leur amour, leur soutien et leur sacrifice, en témoignage de ma grande estime et mon amour pour eux.

A ma sœur Fatima Ezzahra et mes frères Aissam et Mohamed

pour leur motivation et les encouragements

incessants qu'ils m'ont fournis en élaborant ce travail.

A mes ami(e)s

A tous ceux qui me sont cher(e)s.

Remerciements

Cette recherche a été développée au sein du laboratoire « GRAPPE » du Groupe E.S.A. d'Angers (France), du Laboratoire de Valorisation et Sécurité des Produits Agro- Alimentaires- F.S.T. (Béni Mellal) et de l'unité de recherche sur l'Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phytogénétiques- INRA (Meknès). Je remercie Mme Frédérique JOURJON, Directrice de la Recherche et de la Valorisation de l'ESA, Mme Emira MEHINAGIC, Responsable de l'Unité de Recherche Grappe et M. LATRACHE Hassan, Directeur du Laboratoire de Valorisation et Sécurité des Produits Agro- Alimentaires- F.S.T. (Béni Mellal) pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et pour la confiance qu'ils m'ont accordée. J'adresse également mes remerciements à Monsieur Ahmed OUKABLI pour avoir suivi ce projet de thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je remercie M. Driss ELOTHMANI, mon Directeur de thèse, qui a cru en moi et pour m'avoir encouragée tout au long de ces années de thèse. Il a stimulé la discussion scientifique et il m'a accompagné dans la synthèse des résultats et dans la rédaction du document. Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à Mme Hafida HANINE Co-directrice de thèse ainsi qu'à M. Ahmed OUKABLI Co-encadrant, pour leurs conseils et leur appui dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également aussi à l'honorable Jury d'avoir accepté d'examiner mon mémoire de thèse. Merci à Monsieur Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Professeur à l'Université Mohammed V – Rabat, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et à MM. les Professeurs LATRACHE Hassan (Professeur à l'Université Sultane Moulay Slimane- Faculté des Sciences et Techniques- Béni Mellal), Youness BELAHSEN (Professeur à l'Université Ibn Zohr- Faculté des Sciences de Ouarzazate) et Mostafa MAHROUZ (Professeur à l'Université Cadi Ayyad- Faculté des Sciences de Semlalia- Marrakech), d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit. Je remercie aussi Mme Bouchra BELKADI, professeur à la Faculté des Sciences de Rabat et Mme Emira MEHINAGIC, professeur au Groupe ESA- Angers d'avoir accepté d'être parmi les membres de ce jury.

Mes sincères remerciements à l'ensemble du personnel du Laboratoire GRAPPE (ESA France) et en particulier Dominique LE MEURLAY, Isabelle SAILLARD, Sophie et Laurence BEAUCHET pour leur remarquable soutien dans la résolution des problèmes Techniques et administratifs et pour leurs

sympathies. Je tiens à remercier aussi le personnel de l'Institut National de la Recherche Agronomique du centre Meknès pour leurs soutiens. Le personnel de la FST de Béni Mellal est remercié et spécialement les professeurs, les doctorants du laboratoire de Valorisation et Sécurité des Produits Agro-Alimentaires et Najat RIHANI pour leurs encouragements et leurs aides précieuses.

Je suis reconnaissante à la famille ELOTHMANI ; Annie, Amina, Amélie et Kevin de m'avoir accueilli chez eux pendant mes séjours à Angers, pour leur gentillesse et pour les bons moments de détente passés avec eux.

Je remercie M. Pablo MELGAREJO et Mme Francisca HERNANDEZ pour avoir accepté que j'effectue un stage d'un mois dans leur laboratoire, à l'Université Miguel Hernandez. Merci également à M. Mustapha OULAD ABDELGHANI pour son aide.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à l'ensemble des doctorants et je citerai Omar KHATTABI, Matteo Gatti, Hasna MEFTAH, Maryam ZIDOUH, Fatiha ABADI, Ilham TAOUAF et Mathilde CHARLE pour les moments inoubliables que nous avons pu vivre lors de ces fructueuses années de thèse. Je suis très reconnaissante à Salwa LISFI, étudiante en cycle d'ingénieur à l'ESA d'Angers, avec qui j'ai partagé de très bons moments.

J'adresse mes vifs remerciements à M. Kamal BENNOUNA, Directeur de l'Office de Mise en Valeur Agricole, M. Mohamed KHALLOUK, Chef de Département De Développement Agricole et M. Bouchaib YAMINI, Chef du Service de Vulgarisation et Organisations Professionnelles qui m'ont facilité les conditions pour la préparation de cette thèse. Merci également à mes collègues et particulièrement à Fatima ELFALKI, Khadija LAMNIAI, Ilham HOULLALI et Mohamed DIKI pour leur soutien moral, qu'ils trouvent ici l'expression de mon respect.

Je tiens à remercier mes parents, ma sœur et mes frères qui me donnent sans relâche la force pour aller de l'avant. Mes sincères remerciements à toutes les personnes, ami(e)s, collègues, qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon travail.

Résumé

Ces dernières années, le secteur agricole au Maroc 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. En effet, cette espèce est adaptée aux climats arides et semi-arides d'où l'intérêt d'étudier et valoriser ces fruits. La grenade possède de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires liées à la présence d'anthocyanes, de tanins et d'acide ellagique. Ce dernier est utilisé en thérapeutique pour sa capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Malgré ses bénéfices, ce fruit reste peu étudié au Maroc. Ainsi, pour répondre à cette problématique, ce travail de recherche a été structuré de la façon suivante, la première partie s'intéresse à la caractérisation physico-chimique, l'identification et quantification des polyphénols des jus en utilisant l'HPLC ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de dix-huit espèces collectionnées au niveau de l'INRA de Meknès. Cette étude a permis de démontrer les hypothèses fixées précédemment dans ce travail, qui sont : la variabilité statistiquement significative entre les différents cultivars étudiés pour l'ensemble des paramètres mesurés ainsi que la forte teneur en polyphénols totaux des jus qui varie entre 1385 to 9476 mg GAE/L. Dans la seconde partie du travail, qui traite l'effet de la température sur la stabilité des polyphénols et surtout des anthocyanes, a montré que la composition de ces composés diminue après chaque traitement thermique suite à leurs dégradations. Pour la troisième partie concernant l'étude de l'efficacité des pectinases et des protéases dans les traitements de clarification du jus de grenade. Le traitement par les pectinases à une réduction significative de la turbidité par rapport à la protéase. La combinaison de ces deux enzymes donne un bon résultat en termes de réduction de la turbidité. Dans la dernière partie consacrée à la modélisation de la croissance microbienne qui consiste à appliquer les modèles mathématiques fournis par la base de données ComBase sur le jus de grenade, les résultats obtenus ont montré qu'à des valeurs minimales de la température, pH et l'activité de l'eau assurent une longue durée de vie pouvant aller jusqu'à un mois et que le modèle ComBase est sécurisant en général pour ce type de jus.

Mots clés : Grenadier, *Punica granatum*, Cultivar, jus de fruit, Composition phénolique, Acide ellagique, Activité antioxydante, Valorisation, Microbiologie prédictive.

Abstract

The pomegranate (*Punica granatum*) is an important crop for the arid and semi-arid areas. For this reason, a greater interest has been observed in the last years for increasing their cultivation and diverse research has been carried out to enlarge the industrialization as much the fruit. On the other hand, the fruit possesses strong antioxidant and anti-inflammatory activities linked to the presence of anthocyanins, tannins, and ellagic acid which have an interesting therapeutic capacity to inhibit the proliferation of cancer cells. In this study, eighteen pomegranate (*Punica granatum*) cultivars collected at INRA in Meknes-Morocco were analyzed. The study also showed a statistically significant differences were observed between pomegranate cultivars investigated in all parameters measured. The antioxidant capacity and composition of phenolic compounds of pomegranate juices, which varied de 1385 to 9476 mg GAE/L, were influenced by the type of cultivar to a large extent. On the second part of this work, the stability of polyphenols and anthocyanins were determined as a function of temperature. The results showed that the composition of these compounds decreases after each thermal treatment due to their degradation. However, the third part analyzes the efficiency of pectinase and protease enzymes used in the clarification treatments of pomegranate juice. The pectinase treatment has a significant reduction of turbidity. The combination of both enzymes gives a good result in the term of reduction of turbidity. Finally the last part was devoted on modeling of microbial growth which consist to apply mathematical models provided by the data base ComBase on the pomegranate juice, the results showed that at the minimum values of temperature, pH and water activity ensure a long life of up to one month and the ComBase model is generally safe for this type of juice.

Key Words

Pomegranate, *Punica granatum*, Cultivar, Fruit juice, Phenolic composition, Ellagic acid, Antioxidant activity, valorization, predictive microbiology.

ملخص

في السنوات الأخيرة، عرفت زراعة الرمان تطورا مهما بفضل تأقلمه معالمناطق الجافة و الشبه الجافة و تحمله لفترات الجفاف. من أجل ذلك وجب دراسة و تثمين فاكهته التي تتميز كذلك بقدرة جد عالية ضد الأكسدة و ضد الالتهابات ، وذلك لإحتوائها على مركبات فينولية عديدة منها الـانثوسيانين، حمض الإيلاجيك. هذا الأخير له قدرة على منع انتشار الخلايا السرطانية. وهكذا فإن الهدف الأول من هذا البحث هو دراسة الخصائص الفيزيو- كيميائية و تحديد كمية أهم المركبات الفينولية لعصير الرمان المستخلص من 18 صنف المجمع في الضيعة التجريبية لعين تاوجطات التابعة للمعهد الوطني للبحث الزراعي بمكناس و كذا تقييم قدرة هذا العصير على منع الأكسدة. لقد أثبتت هذه الدراسة أن العينات تحتوي على كمية كبيرة من إجمالي البوليفينول التي تتراوح ما بين 1385 و 9476 ملغ/ لتر و أن إختلافا ما بين الأصناف المختلفة بالنسبة لجميع التحاليل. بينما اهتم الجزء الثاني من هذا العمل، بدراسة تأثير درجة الحرارة على المركبات الفينولية وخاصة الـانثوسيانين والتي بينت أن هذه المركبات تنقص بعد كل معالجة حرارية. بالنسبة للجزء الثالث المتعلق بدراسة فعالية المعالجة الأنزيمية (بكتناز و بروتياز). المعالجة ببكتناز ساهمت في خفض نسبة تعكر العصير بالمقارنة مع البروتياز. و تجدر الإشارة أن الجمع بين هذين الأنزيمين يعطي نتيجة أحسن من إستخدامهما كل على حدة. والجزء الأخير من هذا البحث يتطرق إلى تطوير نموذج للجودة الميكروبيولوجية لعصير الرمان عبر تطبيق النماذج الرياضية التي توفرها قاعدة البيانات (ComBase) ، وأظهرت النتائج أن القيم الدنيا لدرجة الحرارة و pH و a_w تضمن مدة استهلاك تصل إلى شهر واحد وعموما يمكن إعتبار استعمال نموذج أمانا بالنسبة لهذا العصير

كلمات البحث

الرمان ، الصنف ، عصير الفاكهة، المركبات الفينولية ، حمض إيلاجيك ، القدرة المضادة للأكسدة ، التثمين

INTRODUCTION GENERALE

Le grenadier est une espèce fruitière pérenne tolérante à la sécheresse et capable de valoriser les sols pauvres et salins. Il jouit de grandes capacités d'adaptation aux conditions de milieu caractérisé par une aridité climatique marquée (Melgarejo and Salazar, 2003). Sur le plan environnemental, il joue un rôle très important dans la protection, la restauration et la fixation des sols. Ses plantations ont connu une grande extension dans de différentes régions du monde et ont conduit à une augmentation de la production. Cette dernière a stimulé le développement des industries de transformation de jus de grenades et la prolifération des compagnies pharmaceutiques qui opèrent dans l'extraction des composés bénéfiques des fruits (Seeram et al., 2006)

L'importance économique du grenadier 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 and Valero, 2012). Au Maroc la production est évaluée à 76 327 tonnes pour une superficie de 8218 ha. La région Tadla Azilal est considérée comme la région ayant la plus grande production avec 28 800 tonnes produites sur 1460 ha (MAPM, 2012).

Dans le but de résorber l'excédent mondial de production de grenades et d'inciter à la consommation de ces fruits, les industries agroalimentaires ont procédé à la transformation de ces fruits avec comme objectif prioritaire de conserver le plus longtemps possible les caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du produit frais, d'élargir la gamme proposée et de fournir des dérivés de haute qualité, en améliorant les techniques de traitement. Il existe actuellement de nouvelles technologies utilisant des installations d'extraction des arilles des grenades qui sont opérationnelles dans 10 pays comme la Turquie, l'Espagne, les États-Unis... Une autre technologie consiste à la congélation des arilles tout en gardant la valeur nutritive des fruits. Une troisième technologie de production de jus s'est développée aux USA, en Turquie, en Espagne, en Inde et en France (Sarig and Galili, 2012) et qui repose sur l'extraction du jus soit à partir du fruit entier ou seulement à partir des arilles.

Le marché des fruits évolue vers les produits de qualité et le jus de grenade connaît aujourd'hui un énorme succès auprès des consommateurs. En Amérique, la consommation du jus de grenade a augmenté de 8 fois entre 2004 et 2008. Certaines données font état, en 2004, d'une forte consommation, de jus de grenade mélangé à moitié avec d'autres jus de fruits issus de pommes ou de raisins. Cette tendance s'est renversée en 2008 en faveur des jus de grenades purs à 100%. Au Maroc, le fruit du grenadier reste sous exploité et il est consommé généralement en tant que fruit frais. Quant à la valorisation par la transformation, elle est quasi absente et nécessite une grande attention de la part des industriels marocains afin de développer ce secteur très promoteur.

Ainsi, le présent travail constitue une contribution à la valorisation des grenades en s'appuyant sur plusieurs volets complémentaires et qui font appel à différentes approches.

La première partie porte sur l'évaluation de la composition physico-chimique nécessaire à la valorisation des grenades dans un contexte industriel. Il s'appuie sur une première étape relative à la caractérisation physico-chimique des jus des grenades appartenant aux cultivars installés au niveau du domaine expérimental de l'INRA à Ain Taoujdate-Meknès. La détermination de la composition phénolique, par spectrophotométrie et chromatographie liquide à haute performance, est nécessaire pour les quantifier et les identifier. Ces composés présentent des activités antioxydantes très importantes (Kanner et al., 2001 ; Pedreno et al., 2001). Les composés antioxydants peuvent, en effet, agir de différentes manières: soit par piégeage des radicaux libres, soit par décomposition des peroxydes et des chélateurs d'ions métalliques. La capacité antioxydante peut être évaluée, donc, par différents tests ayant des mécanismes chimiques différents (Kulkarni et al., 2004). Dans ce présent travail, nous avons mesuré aussi la capacité antioxydante par trois méthodes indépendantes : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH), Ferric reducing/ antioxidant power (FRAP) et Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

La deuxième partie qui est en relation avec la conservation des pigments au cours de la transformation des jus est d'une grande importance pour le maintien de la qualité organoleptique du produit final. Les pigments peuvent, en effet, être affectés par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation comme le pH, la température, l'oxygène, la lumière, la durée de stockage et l'activité de l'eau (Pedreno and Escribano, 2001). Pour étudier ces phénomènes, il est nécessaire de caractériser certaines propriétés

physicochimiques des pigments, telles que leur résistance aux traitements thermiques. Pour ce faire, nous allons étudier dans ce chapitre la stabilité des pigments anthocyanines contenus dans le jus des grenades, après avoir soumis le jus à différents traitements thermiques, pendant différentes durées d'incubation.

Les jus de fruits contiennent des colloïdes qui sont principalement des polysaccharides (les pectines, la cellulose, les hémicelluloses, la lignine et l'amidon), les protéines, les tanins et les métaux (Vaillant et al., 2001). L'un des principaux problèmes rencontrés pour les jus de fruits est lié aux troubles qui sont principalement causés par la présence de pectines. Le jus frais de grenade contient 14 mg de pectine par litre de jus (El Nemr et al., 1992). Les pectines peuvent être associées à des polymères végétaux et des débris cellulaires qui sont des structures moléculaires telles que les fibres. La turbidité causée par ces molécules est difficile à éliminer, sauf par une dépectinisation enzymatique. **La troisième partie** porte sur l'étude des effets de la pectinase et la protéase commerciale sur la turbidité et la clarté du jus de la grenade. Nous avons ciblé particulièrement une application utilisant des enzymes capables de catalyser la dégradation de la structure des protéines et la pectine.

La quatrième partie tente d'analyser les risques liés à l'exploitation systématique des informations disponibles pour identifier la mise en danger (sources potentielles de dommage) et pour estimer les risques. Elle consiste à utiliser l'information disponible pour établir des scénarios résultants en l'occurrence d'un aléa et déterminer la probabilité et l'amplitude de ses conséquences sur les individus et la population, les biens matériels et l'environnement, du fait des aléas. Cette démarche est conforme à la définition usuelle du vocable « analyse », c'est-à-dire un examen détaillé d'un phénomène complexe de manière à en comprendre la nature ou à déterminer les caractéristiques essentielles. L'analyse de risque requiert la décomposition du système et des sources de risques à l'échelle de leurs constituants élémentaires (Moez, 2005). Ce processus est constitué de trois volets : évaluation des risques, gestion des risques et communication sur les risques. L'objectif de cette partie consiste à utiliser les modèles mathématiques fournis par la base de données ComBase afin d'élaborer une modélisation de la qualité microbiologique du jus de la grenade « *Punica granatum* ». Cette modélisation permettra de réaliser un suivi de l'évolution de la croissance d'*Escherichia coli* dans des conditions de pH, de température et d'activité de l'eau bien spécifiées. Les résultats attendus permettent de :

- déduire les durées maximales et minimales de conservation de ces jus en fonction des paramètres tels que : le pH, l'activité de l'eau et la température;
- d'estimer, par la suite, une durée de vie de ces deux jus et ceci en considérant qu'E. coli est un indicateur de l'acceptabilité de ces deux produits.

1^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Généralités sur le grenadier

I.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).

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 génotypes 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).

I.2. Nomenclature

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



Figure1. Arbres du grenadier « Sefri » collectionné au domaine expérimental de l'INRA à Ain Taoujdate (500 m d'altitude).

I.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).

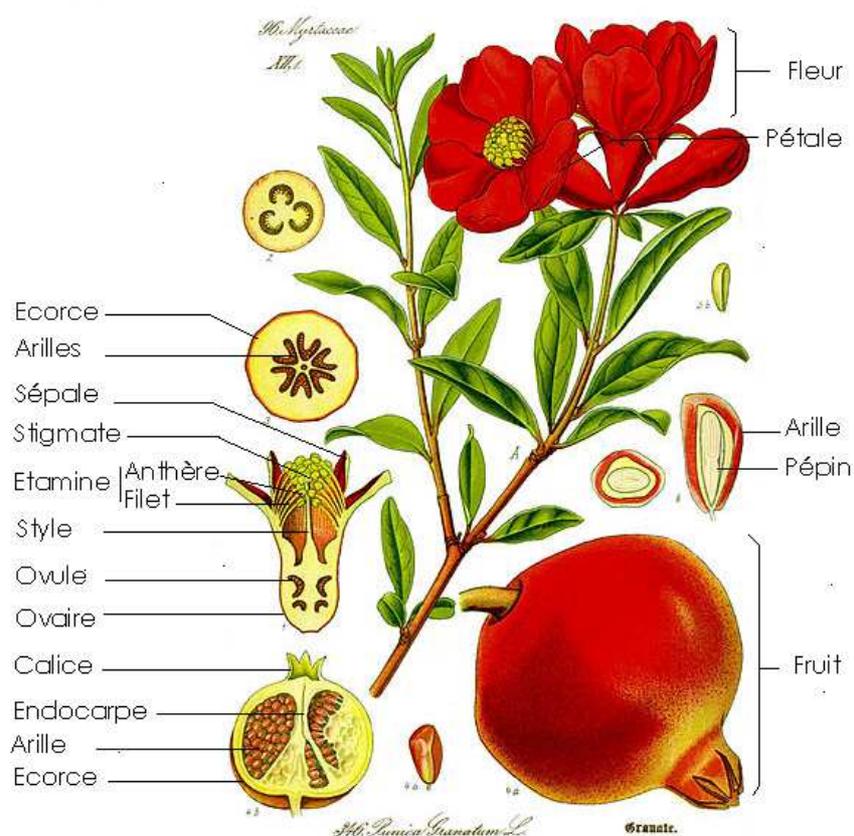


Figure 2. Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland and Schweiz. 1885).

I.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

d'avantage 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).

I.4.1. Fleurs

La période normale de la floraison de différents cultivars de grenadier se produit généralement entre mars- avril et juin- août. 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-pollinisés, 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).

I.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'août et de décembre (Melgarejo, 1993).



Figure 3. Fleur et fruits du grenadier 'Sefri' sur un arbre en collection à l'INRA.

I.5. Exigences écologiques du grenadier

I.5.1. Exigences climatiques

Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes. Cependant, c'est le climat austral subtropical, voire tropical, qui lui convient le mieux. Les meilleurs fruits sont obtenus dans les régions subtropicales, où la période des températures élevées concorde avec la maturité des grenades. L'espèce exige une petite dose de froid en période hivernale pour son évocation florale, mais il craint les conditions généralement froides des hautes altitudes (Melgarejo, 1993).

Il supporte très bien la sécheresse, mais cela compromet la qualité de ses fruits. Un climat chaud et sec sera bon pour le grenadier à condition que ses racines ne manquent pas d'eau (Afaq et al., 2005). Il est très intéressant pour les régions arides et semi-arides (Melgarejo and Salazar, 2003).

En dehors des régions subtropicales, le grenadier pousse bien dans toutes les régions où la température ne descend pas en dessous de -15 °C et certains cultivars acides d'Asie centrale peuvent même survivre à des températures de -25 °C ou -30 °C (Aleksandrov, 1950).

I.5.2. Exigences édaphiques

Le grenadier est une espèce connue pour sa tolérance au calcaire (Melgarejo and Salazar, 2003). Il donne un bon rendement dans les sols salins, et classé dans le groupe des espèces les plus résistantes à la salinité (4^{ème} groupe) (Sanchez- Capuchino, 1986) .Sa tolérance à la sécheresse est relative et se fait au détriment de sa croissance végétative et de sa fructification. Les meilleurs résultats d'installation de plantations sont obtenus en sols d'alluvions profondes avec des disponibilités satisfaisantes en eau

(bords des courants d'eau). Les sols argilo-limoneux irrigués conviennent aussi à la culture du grenadier.

I.6. Eléments de conduite technique de la culture

I.6.1. Entretien régulier

Un ameublissement du sol doit être procédé une fois par an et à la destruction des mauvaises herbes. Au cours de l'été, plusieurs sarclages sont nécessaires afin de maintenir les racines humides. Fructifiant sur le bouquet de mai, la taille du grenadier doit préserver ses productions en assurant un léger élagage et la suppression du bois mort. Il est peu exigeant en matière de conduite. Les apports d'engrais et des irrigations sont bénéfiques pour l'amélioration de la production tout en améliorant le calibre des fruits, leur rendement en jus et leur composition en sucres, polyphénols...

I.6.2. Engrais

La fertilisation organique est très négligée, c'est surtout l'azote et le phosphore qui sont apportés dans certains vergers. L'azote est réservé pour des arbres chétifs et en mauvaise santé, mais l'apport excessif risque de faire éclater les fruits sur l'arbre. En revanche le phosphore a une influence favorable sur l'enracinement des jeunes plants et sur la fructification des arbres adultes, et doit être apporté en hiver aux arbres conduits avec un système d'irrigation à la raie (Mars, 1995). Une enquête réalisée dans la région Tadla Azilal a pu montrer qu'un apport annuel de 400g d'azote, de 750g de potassium et de 500g de phosphore par arbre donne le meilleur rendement en fruits dans cette région (ORMVAT, 2001)

I.6.3. Irrigation

Les apports d'eau améliorent le calibre et la qualité des fruits. Ils doivent être copieux et peu espacés en été et à l'approche de la maturité (tous les 15 jours), pour éviter l'éclatement des fruits qui les rend impropres à la consommation et à la commercialisation (Wald, 2009).

I.6.4. Multiplication

La multiplication du grenadier peut se faire par semis, par boutures, par marcottage, par drageons ou par greffes.

I.6.4.1. Semis

Le semis a lieu au printemps, en pépinière, avec la graine récoltée la même année. Il faut choisir, pour cette opération, la graine des variétés à fruits acides et de maturité tardive. En effet, ces variétés sont, en général, plus rustiques que celles à fruits doux et donc mieux adaptés à ce mode de multiplication. Cependant, le semis est peu utilisé, car ce procédé est long et donne des résultats non homogènes (INRA de Béni Mellal, 2008).

I.6.4.2. Bouturage

La bouture est un mode de multiplication végétative. Le bouturage est simple sur le grenadier et donne, en général, de bons résultats (Mars, 1995). Des boutures de 20 à 30 cm sont prélevées en décembre et conservées en stratification avant leur plantation en pépinière, en février- mars ou prélevées directement et plantées en mars. Un traitement à l'acide indol-acétique (AIA) améliore l'émission des racines.

I.6.4.3. Marcottage

Le marcottage est un mode de multiplication végétative. La technique du marcottage consiste à multiplier une plante en provoquant l'enracinement d'un rameau, alors que celui-ci est toujours solidaire de la plante mère. La partie de la plante placée en terre émet alors des racines adventives. Lorsque ces racines sont suffisamment développées, la branche est coupée pour séparer le jeune plant de la plante mère. Le marcottage est une technique de multiplication simple, mais un peu longue : l'enracinement n'intervient parfois qu'au bout d'une année (Wald, 2009).

I.6.4.4. Drageon

Le drageon est également un mode de multiplication végétative, c'est un rejet issu de la racine d'une plante. Quand celui-ci a acquis suffisamment de vigueur, il est séparé de la plante mère et mis en terre. Cela donne un nouveau pied. La multiplication par drageons chez le grenadier est assez simple, car cet arbre en produit parfois abondamment. Ce procédé est assez souvent employé dans la région méditerranéenne.

I.6.4.5. Greffage

La greffe permet de reproduire authentiquement le matériel végétal, associant les caractéristiques du porte-greffe et du greffon. C'est une technique rarement employée chez le grenadier (INRA de Béni Mellal, 2008).

I.6.5. Bio-agresseurs du grenadier

Le grenadier et la grenade ont peu d'ennemis qui affectent la productivité du verger, la qualité des fruits et la rentabilité de la culture. La plupart des ravageurs du grenadier sont répandus dans les pays tropicaux ou les régions côtières et très peu présentes dans les régions continentales.

I.6.5.1. Pucerons

Les pucerons sont assez nuisibles surtout dans les zones côtières. Ces insectes dévorent les jeunes pousses. La lutte chimique nécessite des traitements répétés avec des produits variés (Mars, 1995).

I.6.5.2. Ectomyelois ceratoniae

C'est un lépidoptère considéré comme le plus grand ennemi des grenades, pouvant causer des dégâts considérables en affectant 90% des fruits d'une récolte (Tebassi, 1992). Les traitements chimiques n'ont pas donné grande satisfaction (Dhouibi, 1989). L'ensachage localisé des fruits s'est montré assez efficace, mais peu pratique (Tebassi, 1992).

I.6.5.3. Zeuzères (*Zeuzera pyrina* L.)

Ces insectes, à l'état de larve, creusent des galeries sur le tronc et les grosses branches, pouvant provoquer leur cassure. Les dégâts sont plus importants dans les zones côtières (Mars, 1995).

I.6.5.4. *Aspergillus castaneus*

Aspergillus castaneus est un champignon capable de décolorer les fruits et les graines du fruit qui en est infesté (Mars, 1995).

I.7. Répartition géographique

Selon le chercheur russe, Vavilov (1951) le grenadier appartient au centre du Moyen-Orient IV (Figure 4), qui comprend l'intérieur de l'Asie, l'Iran et le Turkmenistan, puis il s'est acclimaté à la région méditerranéenne depuis des

temps immémoriaux en raison de la propagation et la germination facile de ses graines, qui sont dispersées par l'homme, les oiseaux ou d'autres animaux (Sanchez-Monge, 1974).

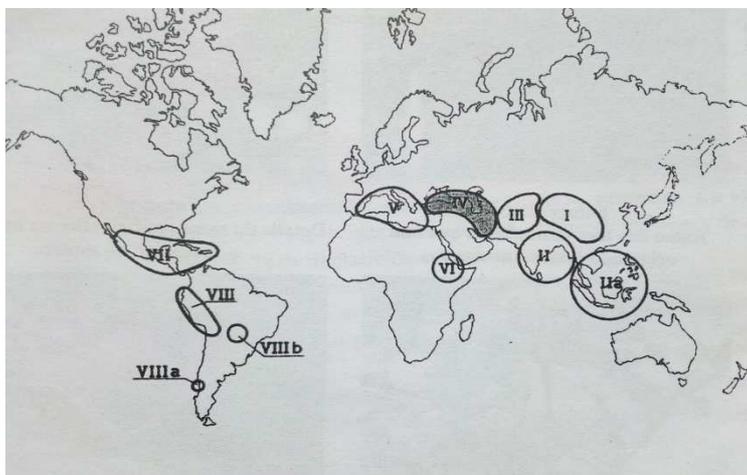


Figure 4. Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov (Sanchez-Monge, 1974).

La grande diversité de cette espèce est évidente dans différents pays. En fait, l'Espagne abrite la banque de matériel génétique en Europe avec plus de 104 variétés. De grandes collections existent aussi dans d'autres pays comme l'Inde, le Turkménistan, l'Iran, etc... La collection indienne est constituée de 760 variétés alors que la plus riche est celle de Turkménistan, où il y a la station expérimentale de ressources phylogénétiques, créée en 1934, avec 1 117 variétés (Mars, 1988).

Outre l'Iran, l'Inde, la Chine et la Turquie qui sont les pays les plus producteurs des grenades (Figure 5), il y a d'autres pays qui sont considérés comme de nouveaux producteurs, à l'instar du Chili, du Pérou et de l'Argentine qui exportent aux USA et en Europe et entrent ainsi en compétition avec l'Espagne qui exporte 18000 T (soit 70 % de sa production nationale). Parmi les pays exportateurs, les USA exportent 17 000 T au Japon, au Canada, au Mexique et en Angleterre, tandis que 80 % de sa production est destinée à la fabrication des jus (Simonian, 2007).

Pour la production mondiale, il n'y'a pas des données précises, car cette espèce est probablement considérée comme une culture secondaire, Melgarejo et Valero (2012) ont estimé la production mondiale à environ 3 086 000 tonnes tout en se basant sur les données élaborées par différents chercheurs et des associations à travers le monde. La figure 5 montre la

répartition de la production annuelle des plus grands pays producteurs des grenades au niveau mondial.

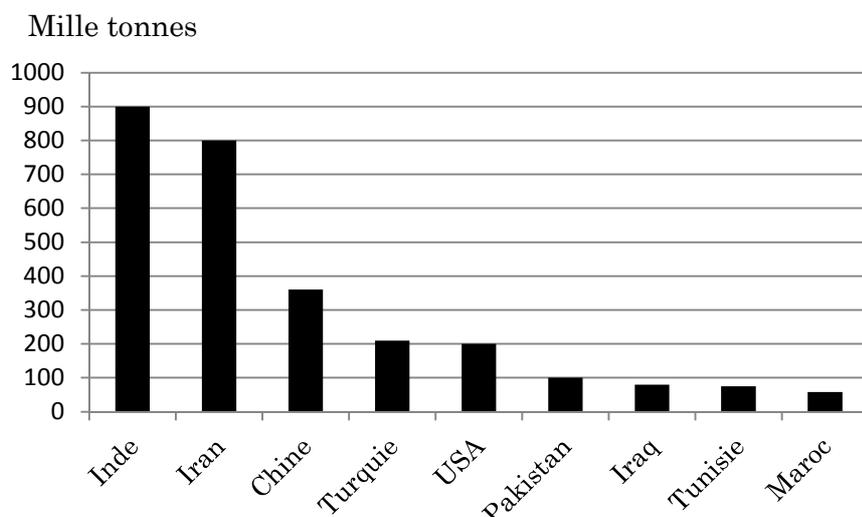


Figure 5. Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo and Valero, 2012).

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76 % sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA). Cependant, l'Espagne, l'Egypte et l'Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (Quiroz, 2009). D'autres pays pratiquent également cette culture: Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (Melgarejo and Valero, 2012).

Au Maroc, la culture du grenadier s'étend sur une superficie de 8218 ha qui donne une production estimée à 76327 T, soit un rendement moyen de 12 T/ha (MAPM, 2012). Mais cette culture reste moins importante au Maroc par rapport à d'autres cultures telles que : les agrumes et l'abricotier, ayant une superficie respectivement de 44 500 ha et 16 200 ha et qui donnent une production respectivement de 1 400 000 et 115 000 Tonnes/An (MAPM, 2012).

Le grenadier est cultivé dans toutes les régions avec une certaine concentration dans la plaine du Tadla (35%) ; du Haouz (20%) ; de Settat (6,6%) ; de Taounate (5,8%) ; de Nador (5,3%) ; de Chafchaouen (4,5%) ; d'Azilal (3,3%) et dans certaines oasis du sud. Elle est conduite en plantation

régulière, seule ou associée à d'autres arbres fruitiers, mais aussi en plantations isolées à proximité des centres urbains (MAPM, 2012).

Au niveau de la région Tadla Azilal, les grenades Sefri Oulad Abdellah ont bénéficié d'une labellisation IGP (indication géographique protégée) afin de valoriser et protéger ce produit de terroir. Dans le même cadre de valorisation de ces grenades, il y'a aussi l'installation d'un projet de valorisation et de développement de la culture de grenadier dans cette région, qui consiste en la création, en 2011, d'un complexe de conditionnement et de stockage des grenades avec une capacité de 20.000 Tonnes. Ceci permettra d'organiser la commercialisation et réduire l'intervention des intermédiaires et augmenter de manière substantielle le revenu des producteurs. Ce complexe comportera aussi dans la future une unité d'extraction du jus des grenades et il est prévu aussi dans le cadre du Plan Maroc vert la réalisation d'un deuxième projet qui portera sur l'extension de la superficie cultivée à 400 Hectares.

I.8. Caractérisation morphologique et pomologique du matériel végétal à l'INRA Béni Mellal

Sur la base de la caractérisation pomologique et morphologique, deux groupes de variétés ont été caractérisés et présentés par l'INRA de Béni Mellal, selon leur destination à la consommation en frais ou à la transformation (Walali and Loudyi, 1995).

I.8.1. Grenades à consommation en frais

- Grenade rouge sélectionnée à Marrakech : Arbre à port retombant de moyenne vigueur. Le fruit est de forme ronde. Légèrement aplatie d'un poids moyen de 375 g, à écorce fine, de couleur jaunâtre lavé de rouge du côté ensoleillé. Les graines sont rouge juteux, sucrées, à pépins tendres et s'égrainent facilement. Le rendement moyen est de 68 kg par arbre en pleine production.
- Grenade jaune sélectionnée à Marrakech : Arbre à port retombant, légèrement plus vigoureux que le précédent. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie, d'un poids moyen de 380 g, à écorce fine, de couleur jaunâtre. Les graines sont rouges, juteuses, d'un calibre supérieur à celles de la variété précédente et à pépins très tendres. Le rendement moyen est de 61kg par arbre.
- Zhéri précoce : Variété tunisienne à port retombant de moyenne vigueur. Le fruit est de forme ronde, d'un calibre moyen de 300 g, à écorce épaisse, de couleur jaunâtre lavé de rouge à maturité. Les graines sont d'un rouge vif,

sucré, à pépins légèrement lignifiés. Le rendement moyen est de 71 kg par arbre.

- Zhéri d'automne : Arbre à port retombant de vigueur moyenne. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie et de petit calibre (275 g par fruit en moyenne), l'écorce est épaisse, jaune lavé de rouge du côté exposé au soleil. Les graines sont rouge foncé, de calibre moyen, sucré, à pépins tendres. Le rendement moyen est de 71 kg par arbre.

D'autres variétés sont d'intérêt plus local telle que :

- Kharazi, (région de Bzou), son écorce fine, ses graines juteuses, colorées et ses pépins tendres.
- Mesri (région de Meknès) ses fruits gros rouges, avec des graines sucrées parfumées, colorées, juteuses et à pépins tendres.
- Laroussi (région de Fès) ses fruits ont de très gros calibres, ses graines sont sucrées et ses pépins sont demi-durs.

I.8.2. Grenades à destination industrielle

Par ordre d'acidité croissante, nous distinguons : 'Wonderful', 'Negro', 'Monstruoso', 'Dwarf semi evergreen' (INRA-Béni Mellal, 2009). Ces cultivars sont de plus en plus plantés et destinés pour la production des sirops ou des jus.

I.9. Propriétés thérapeutiques des grenades (*Punica granatum L.*)

I.9.1. 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).

1.9.2. 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).

1.9.3. 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).

1.9.4. Action sur la dysfonction érectile

Azadzoï et al. (2005) ont réalisé une étude sur des lapins souffrant de dysfonctionnement érectile d'origine vasculaire avec une diminution de la circulation sanguine dans les corps caverneux, dysfonction érectile, moindre relâchement des muscles lisses, fibrose caverneuse diffuse et augmentation des taux de produits d'oxydation. La consommation de jus de grenade sur une longue durée permet d'augmenter la circulation sanguine dans les corps caverneux, d'améliorer la réponse érectile et le relâchement des muscles lisses aussi bien chez les animaux souffrants de dysfonction érectile que chez les animaux témoins. De plus, la consommation de jus de grenade a permis la prévention de la fibrose des tissus érectiles chez les animaux atteints de dysfonction érectile.

Une autre étude élaborée par Türk et al. (2008) ont montré, chez le rat, que la densité des cellules spermatogéniques et la qualité du sperme augmentent grâce à la capacité antioxydante. Celle-ci protège les spermatozoïdes des dommages peroxydatifs. Ce travail montre une corrélation positive entre la consommation du jus du grenadier et la qualité du sperme.

1.9.5. 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, anti-eicosanoïde, 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 (Kawaiï 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)

I.9 .6. 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*.

I.10. 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.

I.10.1. 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) (Tehraniifar et al., 2010).

I.10.2. Caractéristiques chimiques des fruits

I.10.2.1. 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 proportion comestible selon le codex alimentarius en 2009.

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

	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
	Manganese	0,12
	Magnésium	0, 15
	Cuivre	0,07
	Sélénium	0,60
	(codex alimentarius, 2009)	Vitamine B1
Vitamine B2		0,03
(Tehranifar et al., 2010)	Vitamine C	9,90- 17,60

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).

I.10.2.2. 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).

I.10.2.3. 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 ellagitannins 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 pelletierine 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 pelletierine (Lansky et al., 2007).

Chapitre II. Composés phénoliques

II.1. Généralités

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables selon les végétaux, à partir du préphénate (Guignard, 2000), ce dernier est formé par la voie de l'acide shikimique (Macheix et al., 2005).

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Desjardins, 2008). Par exemple la lignine est un composé essentiel des plantes qui permet leur maintien et la conduction de l'eau (Macheix et al., 2005). Les composés phénoliques contribuent également à la croissance et au développement de la plante par des actions diverses et variées. Ils interviennent par exemple dans le métabolisme et le transport de l'auxine (Treutter, 2006) et dans celui de l'éthylène (Vendrell, 2003). Les flavonoïdes conditionnent même la formation des grains de pollen chez le pétunia (Napoli et al., 1999).

Il y a quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Les composés phénoliques sont des éléments importants dans la qualité sensorielle (couleur et astringence) et nutritionnelle des végétaux : lutte contre certains cancers et possèdent une activité antioxydante (contre le vieillissement cellulaire).

II.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (Salunkhe, 1990). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les

saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Figure 6).

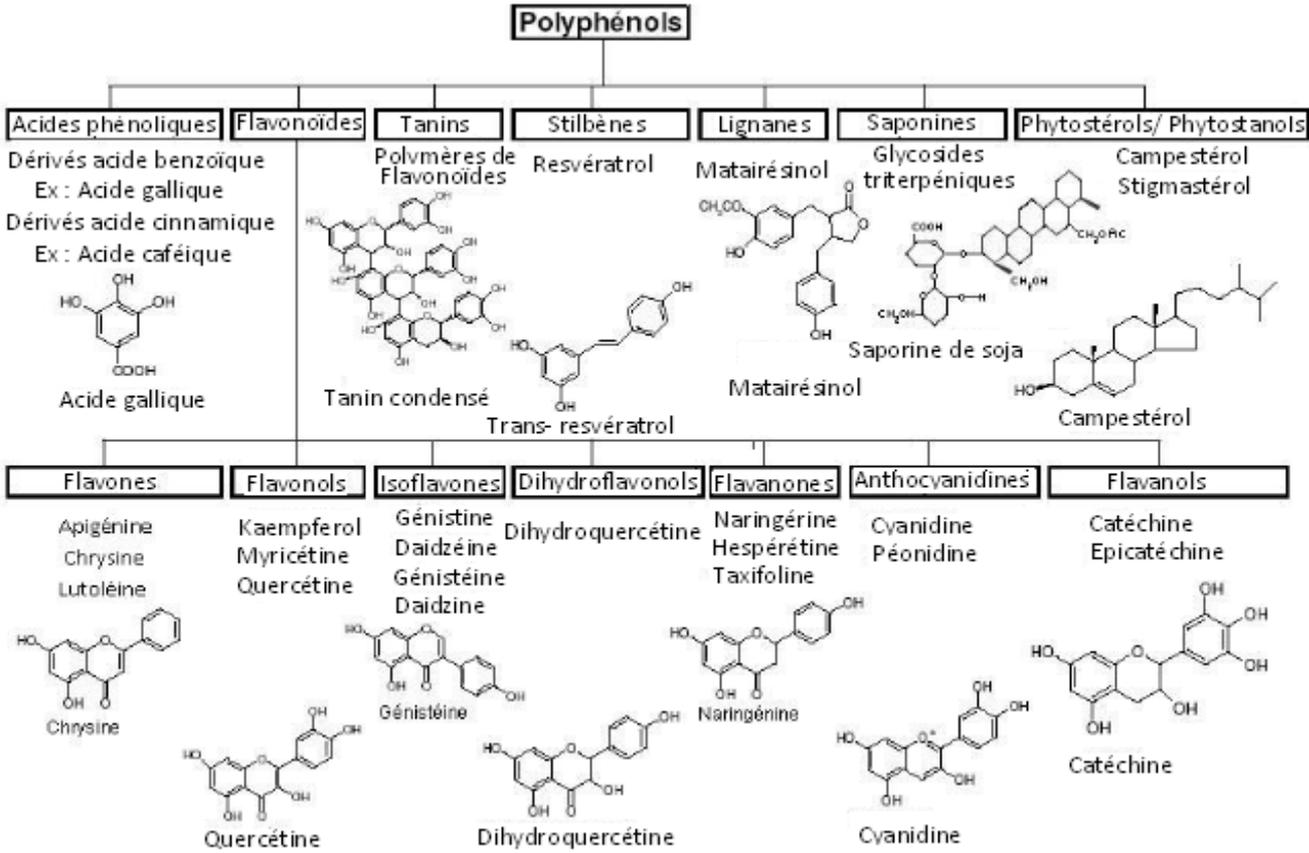
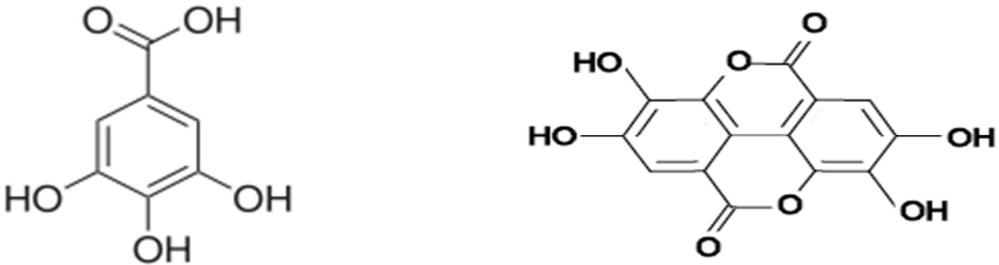


Figure 6. Différentes classes des composés phénoliques.

II.2.1. Acides phénols et les coumarines

II.2.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotova et al., 2003). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (Amakura et al., 2000b).



Acide gallique

Acide ellagique

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996) et les dérivés de l'acide cinnamique (Malagas, 1992). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (Fleuriet et al., 2005).

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques (Figure 7).

Les acides protocatéchiques et galliques ont des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, il est rencontré dans la nature surtout sous forme de dimère (Ribereau-Gayon, 1968).

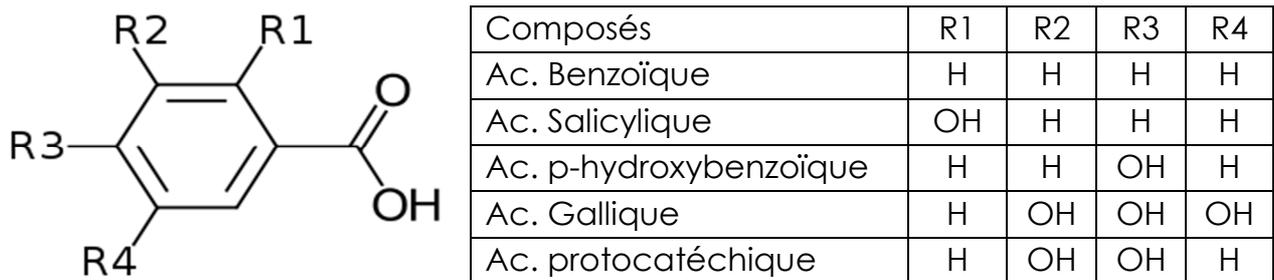


Figure 7. Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996).

II.2.1.2. Acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide o-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique (Figure 8) (Ribereau-Gayon, 1968)

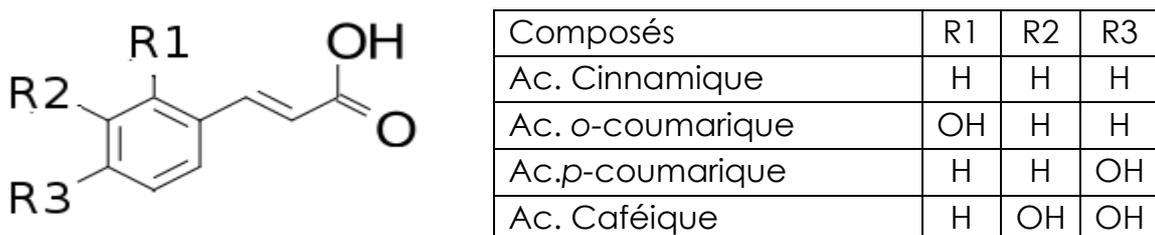


Figure 8. Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques (Malagas, 1992).

II.2.1.3. Coumarines

Nous pouvons considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (voir figure 9) (Dean, 1963).

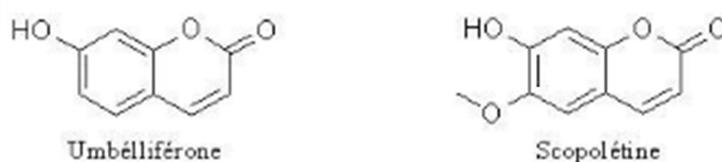


Figure 9. Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

II.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus* : jaune) sont des substances généralement colorées répandues chez les végétaux ; elles sont trouvées dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guigniard, 1996).

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (Gabor, 1988).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (Figure 10) (Bruneton, 1999).

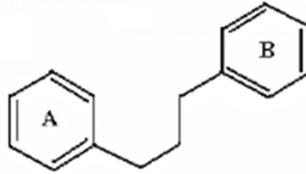


Figure 10. Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963).

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graine et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus, comme par exemple les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaune et orangée).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical pour leurs activités antivirales, antitumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses (Meddleton and Kardasnam, 1993). La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medic-Sanic et al., 2004). Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure des flavonoïdes, il convient de citer notamment:

➤ Flavonols

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores, ils sont caractérisés par la présence d'un carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère (Guignard, 1996).

Parmi les flavonols les plus répandus, nous trouvons le kaempférol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7). Ces deux flavonols sont incolores; le myricétol est l'isorhamétol (Figure 11). Pour le grenadier nous trouvons le kaempférol dans les feuilles et la quercétine dans le jus (Artik, 1998 ; Van Elswijk et al., 2004).

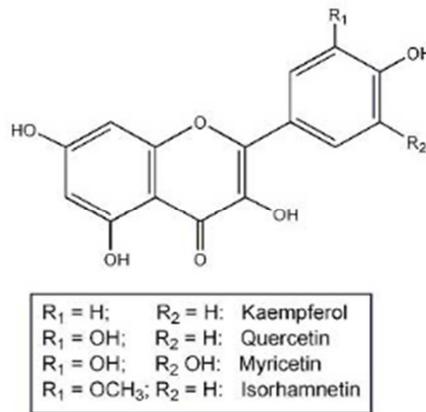


Figure 11. Structures chimiques de quelques flavonols (Van Elswijk et al., 2004).

➤ Flavanones

Ces composés ne comportent pas des groupements OH en position 3 et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citron, orange : la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose), l'hespéridine (Alais and Linden, 1997). La naringine est détectée aussi dans les feuilles du grenadier (Kim et al., 2002).

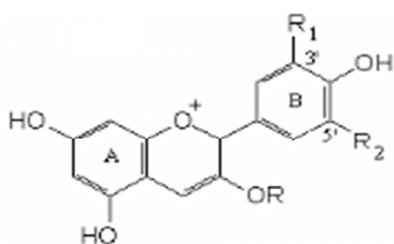
➤ Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (Guignard, 1996). Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capable d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Brouillard, 1986). Toutefois, Hernandez et al. (1999) a permis de détecter cinq types d'anthocyanines : Cyanidin 3-O-glucoside, Cyanidin 3,5-di-O-glucoside, Delphinidin 3-O-glucoside, Delphinidin 3,5-di-O-glucoside et Pelargonidin 3-O-glucoside.

Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu, elles donnent de la couleur aux fleurs et aux fruits, et elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (Harbone and Grayer, 1988).

Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, nous trouvons également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C₃ (Ribereau-Gayon, 1968). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 12).



Anthocyanidines R=H	R ₁	R ₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

Si la forme est monoglucoside : R = glucose

Figure 12. Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau-Gayon, 1968).

II.2.3. Tanins

Les tanins sont des polyphénols que nous trouvons dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao,...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides-phénols et de glucose.

II.2.3.1. Tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes,...).

Il a été rapporté par Haslam (1998) que les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits). Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison

inter monomérique (Porter et al., 1986). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués, mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (Guignard, 1996).

(Haslam, 1998) a montré que seuls des monomères flavan-3-ol (catéchine) et flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidine) constituent les tanins condensés. La figure 13 présente les principales unités des tanins condensés.

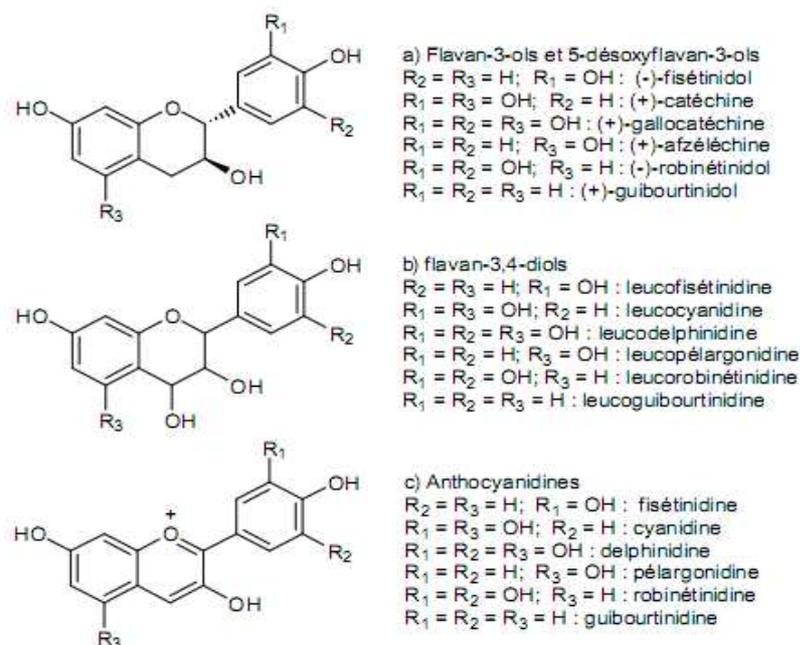


Figure 13. Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-déoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3,4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

La plupart des proanthocyanidines oligomères, qui sont les vrais tanins condensés, sont presque retrouvées accompagnées par un des flavan-3-ols. La (+)-catéchine et la (-)-épicatechine sont les plus fréquentes, surtout quand il s'agit d'oligomères de type B (Haslam, 1998). D'un point de vue structural les procyanidines dimères de type B sont formées par liaison entre le carbone 4 d'un monomère et le carbone 8 de l'autre. Les dimères catéchiques sont à la base des tanins de type phloroglucinol (d'après l'hydroxylation du cycle A, y compris l'oxygène du pont chromane). Les dimères de type A sont constitués d'unités 5-déoxyflavan-3-ol (par exemple fisétinidol, robinétinidol) qui sont liés de préférence par des liaisons C4-C6. Ces dimères sont à la base des tanins condensés de type résorcinol. Il est donc probable que la substitution préférentielle dans les positions 6 et 8 (soit des liaisons 4-6 ou 4-8) dépende de l'accessibilité à chacune de ces positions. Les tanins condensés de type A proviennent

essentiellement de deux espèces : les légumineuses et les anacardiées. On classe les tanins condensés dont la structure repose sur les 5-déoxyflavan-3ols en proguibourtinidines, profisetinidines et prorobinétidines ; les profisetinidines étant les plus communs.

Les tanins condensés de type B sont omniprésents dans les arbres. Ils sont trouvés comme procyanidines pures (tanins condensés à base de catéchine et d'épicatéchine) et ils accompagnent les tanins de type résorcinol dans les familles mentionnées précédemment.

II.2.3.2. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides-phénols, ou de dérivés d'acides-phénols. La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (Ribereau-Gayon, 1968), ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones ; nous le rencontrons notamment chez les rosidae dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (Guignard, 1996).

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide-phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisé par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dite les tanins ellagiques (Guignard, 1996).

II.3. Voie de biosynthèse des principaux polyphénols

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues (Figure 14) (Dixon et Paiva, 1995). Leur étude relève de trois approches complémentaires dont la dernière a pu être développée au cours des dernières années : identification et dosage des intermédiaires des voies métaboliques, caractérisation et purification des enzymes qui catalysent les réactions de biosynthèse, clonage et étude de l'expression des gènes impliqués. Par ailleurs, l'utilisation de mutants obtenus soit à l'aide des techniques traditionnelles soit grâce aux apports de la biologie moléculaire et du génie génétique ont permis de mieux comprendre

la régulation du métabolisme phénolique. Dans tous les cas, de nombreuses informations ont été apportées en étudiant simultanément la modulation de ce métabolisme par les facteurs externes, biotiques ou abiotiques.

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines, mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés, à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie bien connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine qui, par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques (Figure 14) : acides coumariques, caféique, férulique et sinapique, généralement présents dans le matériel végétal sous forme d'esters (esters quiniques comme l'acide chlorogénique, esters glucosés...) ou de glucosides. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

- Vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique...) par β oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tanins hydrolysables (tanins galliques et ellagiques) ;
- Vers les esters de type chlorogénique par estérification avec un acide-alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...)
- Vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosylations, prénylations,...)
- Vers les flavonoïdes dont le squelette moléculaire de base (Figure 14) a une double origine: 3 molécules de l'acétyl CoA (CoA= coenzyme A) pour le cycle A, une molécule de *p*-coumaryl CoA pour le cycle B et l'hétérocycle C. C'est alors à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoïdes appartenant aux diverses classes, en particulier des pigments comme les anthocyanes et les flavonols ou encore certains monomères de type flavanols dont la polymérisation conduira aux tanins condensés.
- Vers les lignines, par deux réductions successives conduisant aux monolignols qui sont ensuite intégrés dans la lignine par polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases (Bouheroum, 2007).

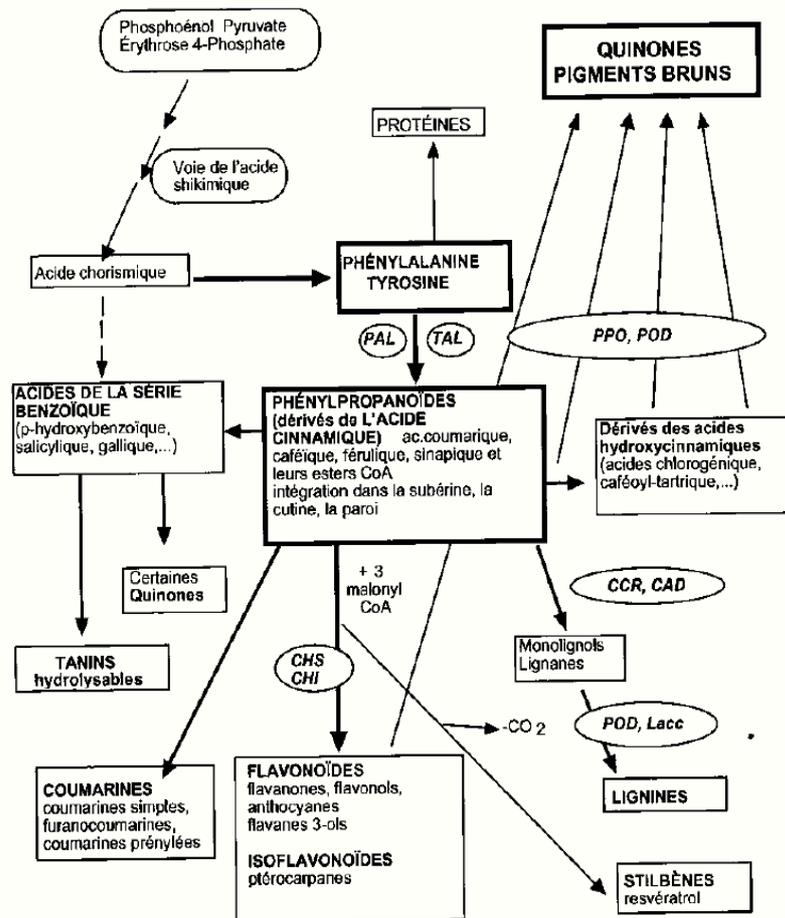


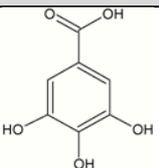
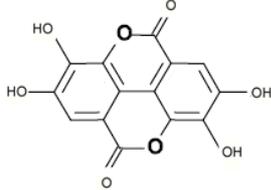
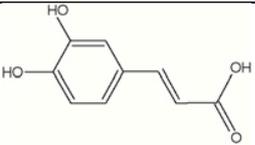
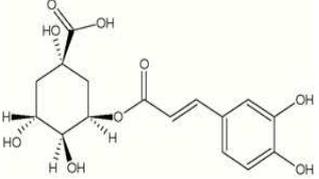
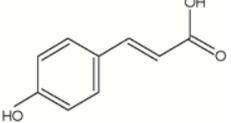
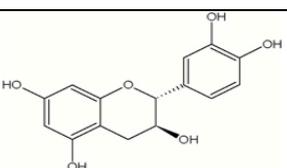
Figure 14. Grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix, 1996). PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; CCR : cinnamate CoA réductase ; CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone flavanone isomérase ; PPO : polyphénoloxydases ; POD : peroxydases ; Lacc : laccases.

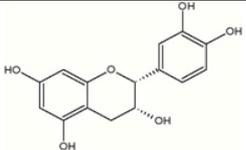
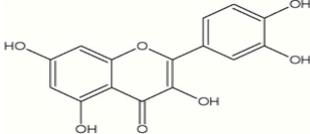
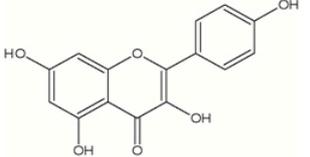
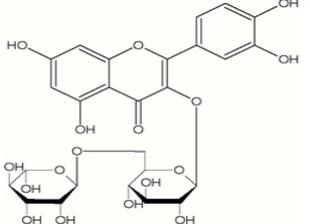
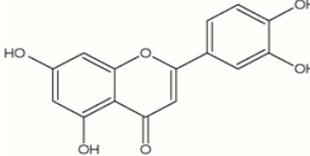
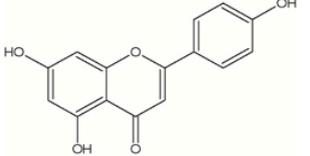
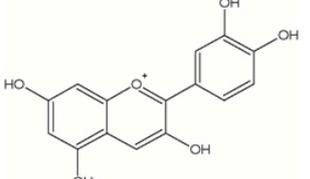
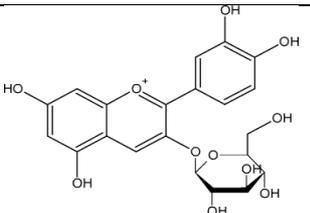
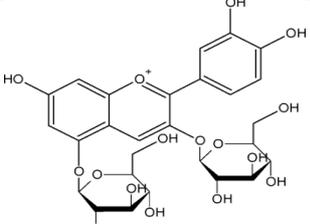
II.4. Répartition de ces classes dans le fruit du grenadier

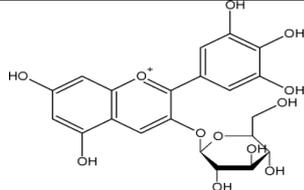
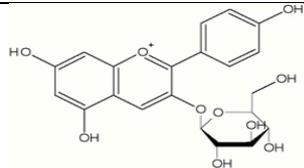
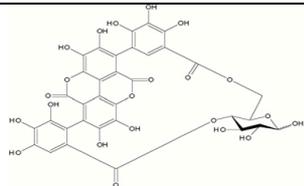
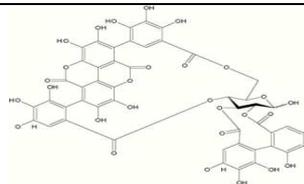
Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (Cheynier and Sarni-Manchado, 2006).

Les tableaux 2 et 3 représentent la majorité des composés phénoliques présents dans les différents organes du grenadier ainsi que leurs activités pharmacologiques qui permettent soit la prévention soit le traitement contre la croissance des cellules malignes. Cependant, de multiples mécanismes reflètent une complexité chimique du fruit qui est généralement responsable de l'augmentation de l'apoptose, diminution de l'inflammation, diminution de la métastase et l'invasion. Par exemple les composés tels que l'acide ellagique, acide ursolique, quercétine, ellagitanins, lutioline et l'apegénine sont associés avec l'apoptose des cellules tumorales (Lansky and Newman, 2007).

Tableau 2. Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

Classe chimique	Nom du composé	Structure chimique	Organes	Références
Acides Hydroxybenzoïques	Acide gallique		Jus - fleurs – feuilles	Amakura et al.(2000b) Huang et al. (2005b)
Acides Hydroxybenzoïques	Acide Ellagique		Jus - feuilles – Pépins	Amakura et al. (2000b) Wang et al. (2004)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide Cafféique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide Chlorogénique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide <i>p</i> -Coumarique		Jus- feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Flavan-3-ols	Catéchine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa et al. (2000)

Flavan-3-ols	Epicatechine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa et al.(2000)
Flavonols	Quercetine		Jus Feuilles	Artik (1998)
Flavonols	Kaempferol		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavonol glycosides	Rutine		Jus - feuilles	Artik (1998)
Flavones	Luteoline		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavones	Apigénine		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Anthocyanidines	Cyanidin		Feuilles	Noda et al. (2002)
Anthocyanidines	Cyanidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Cyanidin 3,5-di-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)

Anthocyanines	Delphinidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Pelargonidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Ellagitannins	Punicalin		Ecorce de l'arbre - écorce des racines - feuilles	Gil et al. (2000)
Ellagitannins	Punicalagin		-Ecorce de l'arbre, écorce des racines et feuilles	Gil et al. (2000)

Toutefois, afin d'expliquer l'activité antioxydante élevée des jus de la grenade et aussi la différence observée entre les jus commerciaux et celui élaboré expérimentalement, Gil et al. (2000) a analysé les composés phénoliques de ces jus par CLHP et elle a montré que la couleur rouge typique des deux jus est due aux anthocyanes qui représentent une différence quantitative significative du delphinidine, cyanidine et pelargonidine 3-glucosides et 3,5-diglucosides, ces composés sont facilement détectables par CLHP. Pelargonidine 3,5-diglucosides est présent en traces dans les différents jus, ce qui entrave sa quantification. En outre, la principale différence observée entre ces deux jus est la composition élevée en punicalagins et les dérivés d'acide ellagique des jus commerciaux, tandis que les tanins hydrosolubles demeurent constants dans les différents jus.

Dans la même étude, la composition phénolique mesurée par la méthode du Folin Ciocalteu des jus de grenade (expérimental et commercial) est presque la même trouvée pour le vin rouge et deux fois plus élevée que celle du thé vert. Toutefois cette composition reste plus élevée pour le jus commercial (plus que 2500 mg/L) que celui extrait expérimentalement (1800- 2100 mg/L)

Les principaux composés antioxydants dans le jus de grenade sont les tanins hydrolysables contenant les punicalagins, la capacité antioxydante de ces grosses molécules (tanins) est 15 à 30 fois plus efficace que les simples polyphénols ou le Trolox, concernant la neutralisation des radicaux libres. Les anthocyanes et les dérivés de l'acide ellagique contribuent aussi à la capacité antioxydante totale (Gil et al., 2000).

Tableau 3. Quelques composés phénoliques clés et leurs actions anti-cancérogènes et anti-inflammatoires

Composés	Activités thérapeutiques	Références
Acides hydroxybenzoïques (acides ellagique et gallique)	-Induisent l'expression p53/p21. l'arrêt en G1 et l'apoptose des cellules cancéreuses de la vessie.	Li et al. (2005)
	-Causes l'inhibition de la croissance et l'apoptose des cellules (DU-145)	Veluri et al. (2006)
	-Réduisent l'inflammation des cellules pancréatiques stellaires.	Masamune et al. (2005)
	-Favorisent l'apoptose des cellules de leucémie	Madlener et al. (2006)
Acides Hydroxycinnamiques (e.g. acide caféique)	-Réduisent la métastase des cellules cancéreuses grâce à la régulation négative de l'expression des métalloprotéinases	Hwang et al. (2005)
	-Puissant inhibiteur de métalloprotéinase-9 et l'invasion des cellules tumorales	Jin et al. (2005)
Pro-anthocyanidines et anthocyanidines	-Activités Anti-angiogéniques, antioxydantes et anticancéreuses	Bagchi et al. (2004)
	-Activité Anti-multigénique	Galvano et al. (2004)
Quercétine	Inhibition de la carcinogénèse	Lambert et al. (2005)
	Effets anti-tumoraux des flavonoïdes	Kanadaswami et al. (2005)
	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du poumon via l'arrêt G2/M et l'arrêt de l'induction de l'apoptose.	Yang et al. (2006)
Ellagitannins (punicalin et punicalagine)	Diminution de la signalisation des cellules inflammatoires dans le cancer du côlon	Adams et al. (2006)
	Les activités apoptotiques, antioxydantes et antiprolifératives	Seeram et al. (2005)

II.5. 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

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 mentionnés.

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 (Cerdá et al., 2003)

II.6. Méthodes de caractérisation des composés phénoliques

II.6.1. Dosage des composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques peuvent être dosés soit dans leur totalité soit individuellement après extraction du matériel végétal. Les méthodes de dosage des composés totaux sont généralement basées sur l'oxydation de ces composés et le développement d'une coloration.

La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Toutefois, plusieurs travaux concernant la composition phénolique de certains fruits ont trouvé des teneurs assez importantes en polyphénols totaux. Cette composition varie d'un fruit à un autre (Tableau 4).

Tableau 4. Teneur des polyphénols totaux de quelques fruits quantifiée par des mesures spectrophotométriques.

Fruits	Polyphénols totaux*	Références
Acai (frais)	454,00	Rufino et al. (2010)
Acerola frais	1063,00	Rufino et al. (2010)
Banane (frais)	475,00	Kevers et al. (2007)
Mûre (frais)	226,00	Wang and Lin (2000)
Figue (frais)	463,00	Solomon et al. (2006)
Raisin (frais)	234,80	Orak (2007)
Kiwi (frais)	112,00	Kevers et al. (2007)
Mûre	1515,90	Lin and Tang (2007)
Framboise	267,00	Wang and Lin (2000)
Fraise	363,70	Lin and Tang (2007)

*Les polyphénols totaux sont exprimés en mg GAE /100 g de poids frais.

II.6.2. Dosage des composés individuels par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La méthode de dosage la plus largement utilisée pour séparer les composés phénoliques est la séparation par CLHP souvent en phase inverse (la plus utilisée étant l'octadécylsilice ou C18) (Robards et al., 1999). Les gradients d'éluion comportent en général des proportions croissantes de méthanol ou d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée par de l'acide formique ou acétique. Les composés sont élués par ordre de polarité croissante : les acides hydroxycinnamiques sont donc généralement élués avant les flavonoïdes. Pour ces derniers, les aglycones sortent généralement après leurs dérivés glycosylés.

La détection est basée sur l'absorption caractéristique des polyphénols dans l'UV. La plupart des flavonoïdes sont identifiés dans deux bandes d'absorption majeures : une à 320-385 nm, caractéristique de l'absorption du cycle B et une à 280-285 nm, caractéristique de l'absorption du cycle A. Ces bandes varient cependant en fonction des substitutions possibles sur les cycles. Les flavonols présentent un maximum d'absorption dans le jaune (350 à 360 nm) et les anthocyanes dans le rouge (520-530 nm). Pour les acides hydroxycinnamiques, ce maximum est à 320 nm. La détection en UV-visible par barrette de diode, à longueur d'onde multiple, permet ainsi de distinguer les classes de composés.

Ce système peut être couplé à la spectrométrie de masse. Cette technique permet de mesurer la masse d'une molécule et de fournir des informations

structurales d'après les ions fragments formés au cours de l'analyse. Un spectromètre de masse est composé d'un système d'induction de l'échantillon, d'une source d'ionisation (formation et éventuellement fragmentation des ions), d'un analyseur dont la fonction est de séparer les ions selon leur rapport masse/charge (m/z) et d'un détecteur. La source d'ionisation par électrospray est la plus utilisée pour les polyphénols.

II.7. Détermination de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Marc et al., 2004)

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (Bartosz et al., 2003).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva et al., 1991); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie and Strain 1996); ou les radicaux ABTS \cdot (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re et al., 1999), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH \cdot (diphényl-picrylhydrazyle) (Sharma-Om et al., 2009).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Tabart et al., 2009 ; Hua et al., 2008).

II.7.1. Méthode ORAC

Oxygen radical absorbance capacity. La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant. La méthode est réalisée en microplaque dans lesquelles nous mesurons en parallèle, le déclin de la fluorescéine au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox (une molécule de référence, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E), et des échantillons à tester à différentes concentrations. Le but est d'obtenir une réponse comparable à celle de la gamme. On peut ainsi après traitement des données, de calculer l'équivalent Trolox. La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de la capacité se fait par l'intermédiaire du calcul des aires sous la courbe. C'est la seule méthode qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule mesure. Elle donne une mesure globale de la capacité antioxydante. L'avantage majeur du test ORAC est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée.

II.7.2. Méthode DPPH

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH- groupes (Salah et al., 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques (Hatzidimitriou et al., 2007)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure- activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams et al., 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure15). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515 - 518 nm.

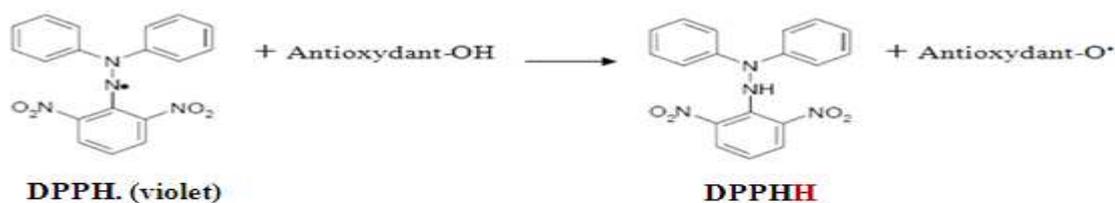


Figure 15. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre le radical DPPH• et un antioxydant (AH).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes: (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques); (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylés et des anthocyanes) (Huang et al., 2005).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH (Molyneux, 2004 ; Sanchez-Moreno et al., 1998):



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus au moins stables :



La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (Molyneux, 2004).

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées: d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Sanchez-Moreno et al., 1998 ; Scherer et al., 2009)

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger

Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t : $[\%RSA = (Abs_{\text{contrôle}} - Abs_t) / Abs_{\text{contrôle}} \times 100\%]$.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux, 2004)

L'indice relative %RSA montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno et al., 1998).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective CE_{50} (ou l'inverse $1/CE_{50}$) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE_{50} est petite. L'indice CE_{50} montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH• ou mg Antioxydant/g DPPH•), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction (Sanchez-Moreno et al., 1998).

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps T_{EC50} nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE_{50} , la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique (Scherer et al., 2009). L'estimation de T_{CE50} permet d'introduire la classification suivante: $T_{CE50} < 5$ min (réaction rapide), 5-30 min (réaction intermédiaire) et $T_{CE50} > 30$ min (réaction lente) (Scherer et al., 2009). L'indice de l'efficacité anti-radicalaire $[EAR = 1/(CE_{50} \cdot T_{CE50})]$ relie la concentration du DPPH• et le temps T_{EC50} dans l'essai avec la concentration effective CE_{50} de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait.

II.7.3. Méthode TEAC

Dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{\bullet+}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine (Miller et al., 1997) d'un oxydant (dioxyde de manganèse (Benavente-Garcia et al., 2000) ou persulfate de potassium (Re et al., 1999)). Le radical $ABTS^{\bullet+}$, en contact avec un donneur de H^{\bullet} conduit à l' $ABTS^+$ (Figure 16) et à la décoloration à 734 nm de la solution (Lien et al., 1999). D'autres auteurs utilisent l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ou $ABTS^{\bullet-}$, à la place de son sel d'ammonium et analysent l'inhibition du radical $ABTS^{\bullet-}$, produit par un initiateur de radicaux thermolabiles, l'ABAP (2,2'-azobis-(2-amidino-propane) HCl) (Van Den Berg et al., 2000). La cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction. La capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester, jus de fruit par exemple (Miller et al., 1997).

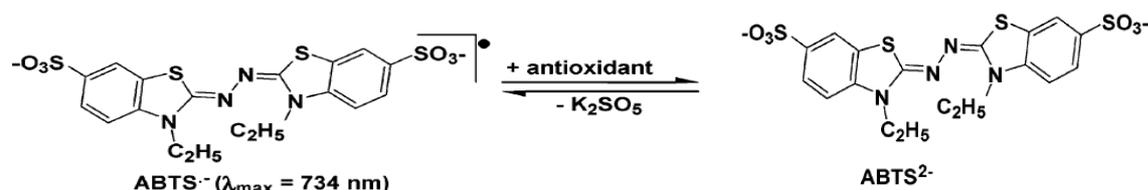


Figure 16. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le radical $ABTS^{\bullet-}$ et un antioxydant (AH).

II.7.4. Méthode FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power

La méthode FRAP développée par Benzie and Strain (1996) correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)₂] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer (Figure 17).

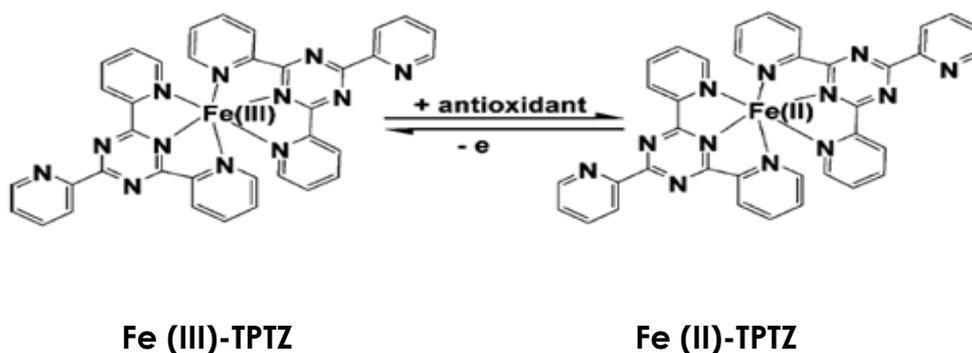


Figure 17. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleu intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm. Pour s'assurer de la linéarité de la méthode et calculer les résultats, une gamme étalon est d'abord réalisée avec une solution aqueuse de sulfate de fer heptahydraté (FeSO₄·7H₂O).

Chapitre III. Procédés de transformation et Sécurité microbiologique

III.1. Généralités

Les fruits et leur jus constituent une part essentielle du régime alimentaire humain. Au cours des vingt dernières années, la recherche en nutrition humaine a prouvé qu'un régime équilibré, riche en fruits ainsi que leur jus, garantit une bonne santé et peut réduire les risques de certaines maladies. Par conséquent l'un des secteurs agroalimentaires qui connaissent la plus forte croissance est celui des produits. Le contrôle de la qualité nutritionnelle et sanitaire lors des procédés de transformation s'avère très nécessaire afin de garantir la qualité de ces produits.

Ainsi, le contrôle des microorganismes dans les aliments passe par la prévention et la réduction de la contamination, l'élimination des microorganismes par différents traitements, le contrôle des conditions de stockage et la maîtrise de la physiologie des légumes.

Les principaux problèmes des fabrications des jus des fruits sont la maîtrise de la pasteurisation et du conditionnement. Souvent, les microbes sont réintroduits au cours du conditionnement en raison d'une mauvaise maîtrise de l'hygiène.

III.2. Procédé de fabrication du jus frais extrait à partir des fruits entiers

La figure 18 présente en détail un procédé de fabrication de jus frais de la grenade qui comprend les étapes suivantes :

- **Lavage**

Le lavage s'effectue à l'eau potable, afin d'éliminer la terre, les microorganismes, les traces de traitement phytosanitaire. Un lavage soigneux est important : celui-ci étant pressé avec sa peau, les risques de contamination sont élevés.

- **Pressurage mécanique**

Broyage des fruits et récupération du produit sur les claies de la vis de presse. Le réglage de la presse doit être optimum pour obtenir une purée homogène, grossière, mais sans morceaux. Les paramètres à régler sont la vitesse de rotation, l'écartement des meules, le diamètre des tamis, etc.

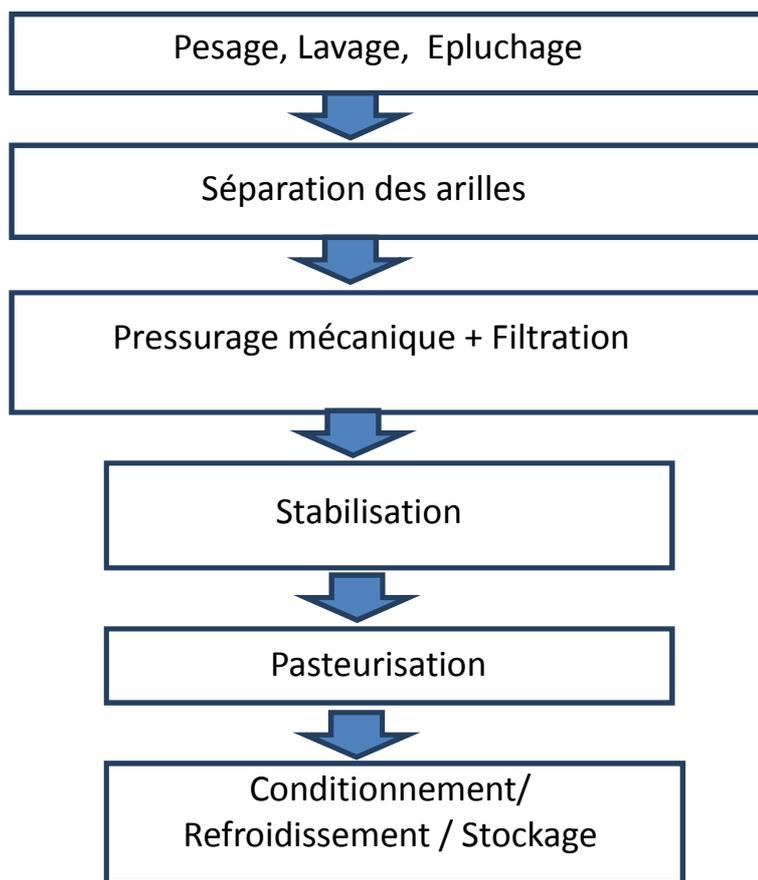


Figure 18. Procédé de fabrication de jus frais de la grenade

- **Extraction du jus**

La presse à vis permet de presser les fruits sans les éplucher (gain de temps important). Tout en faisant attention à la force de pressage : une pression excessive écrase la peau et libère des quantités très élevées en tanins qui sont responsables de l'astringence du jus de grenade. Un pressurage homogène assure un bon rendement : répartir les fruits broyés en couches régulières (5 à 7 cm d'épaisseur maximum) sur les claies de la presse.

- **Filtration**

La filtration permet d'éliminer les particules diverses en suspension dans le liquide. Le jus pulpeux est passé dans le filtre et les particules trop grosses (pépins, fragments d'albedo) sont éliminées par le centre, creux, du piston (Baron, 2002). L'étape de filtration ne doit pas durer plus d'une heure. La plupart des jus de fruits tropicaux sont très fragiles et fermentent quelques heures. Le jus prend ensuite un goût de vin qui oblige à jeter tout le lot

contaminé. Pour éviter ce genre de problème, il faut rapidement pasteuriser les jus après le pressurage.

- **Stabilisation**

En transformation semi-industrielle, les opérations de transformation sont parfois longues et il est souvent nécessaire de stabiliser les jus pour éviter les problèmes de fermentation et de dégradation. Un traitement thermique léger permet de détruire les micro-organismes et les enzymes responsables de la dénaturation de la qualité. Pour stabiliser le jus, on le chauffe à 50 ou 60°C durant 5 à 10 min. Il est ensuite conditionné dans des fûts plastiques de 50 à 100 l étanches.

- **Pasteurisation**

La pasteurisation vise à tuer les micro-organismes et à inactiver les enzymes (comme la pectine méthylestérase (PME) ou la polyphénoloxydase) pouvant altérer le produit ou le rendre impropre à la consommation humaine (Chen et al., 1993). La température et le temps de pasteurisation dépendent du fruit à pasteuriser, du type de pasteurisateur (tubulaire, type cocotte...), du milieu ambiant, du niveau de filtration.

- **Les différentes technologies de pasteurisation**

La pasteurisation est effectuée selon un barème temps-température qui peut varier, mais qui généralement dure de 30 à 60 secondes. Pour le jus pur, la température est rapidement portée à 90-96°C dans des échangeurs de chaleur tubulaires puis elle descend en une trentaine de secondes jusqu'à une basse température, c'est la « flash pasteurisation ».

Dans le cas des emballages métalliques ou en verre, il est possible d'inverser les deux étapes de pasteurisation et de conditionnement. On conditionne les produits à froid avant la pasteurisation. La pasteurisation est alors faite dans un pasteurisateur par immersion ou aspersion d'eau brûlante sur les emballages. Le barème de pasteurisation est allongé, les échanges thermiques étant plus lents par ce procédé. Cette technique est plus longue, plus consommatrice d'énergie et, mais elle permet de mieux maîtriser les risques sanitaires, car le jus est pasteurisé dans son emballage.

Différents pasteurisateurs existent : bac de pasteurisation, tunnel de pasteurisation.

Pour les petites productions, la pasteurisation peut s'effectuer par chauffage du jus en vrac dans des marmites pendant 20 min à 85°C.). Le conditionnement suit immédiatement la pasteurisation et se fait à chaud (82 à 85°C).

• **Conditionnement**

Les deux procédés de conditionnement aujourd'hui utilisés dans les industries de production de jus après le traitement de la pasteurisation sont :

- le remplissage à chaud,
- le remplissage aseptique à froid.

Lors du remplissage à chaud, après la flash-pasteurisation le jus est refroidi jusqu'à 82-85°C. Il est introduit immédiatement à cette température dans les récipients, ceux-ci sont aussitôt fermés, retournés ou agités de sorte que le liquide chaud vienne au contact de toute la surface intérieure du récipient et l'aseptise. Le remplissage aseptique à froid est une autre technique de remplissage qui consiste à refroidir le jus jusqu'à température ambiante (17-22 °C) après la flash-pasteurisation et à remplir et fermer les récipients en conditions aseptiques. L'opération dure entre 20 et 30 minutes entre le remplissage et le refroidissement. Les bouteilles ont au préalable été décontaminées par lavage avec une solution de peroxyde d'hydrogène puis rinçage à l'eau.

Le refroidissement évite la sur-cuisson des jus, à l'origine d'un brunissement et d'un goût de brûlé (réaction de Maillard). Mais dans le cas des bouteilles en verre, le refroidissement doit être progressif, les bouteilles risquant de se briser sous l'effet du choc thermique. Enfin les jus sont stockés dans des endroits frais, sec, aéré et à l'abri de la lumière.

III.3. Extraction du jus à partir des arilles

Pour l'élaboration du jus de grenade à partir des arilles, les mêmes étapes sont pratiquées sauf qu'il faut procéder à une extraction des arilles par de nouvelles technologies.

III.4. Procédé de fabrication du jus à base de concentré

III.4.1. Pasteurisation après extraction et raffinage

Pour la fabrication du concentré, le jus est extrait comme déjà signalé précédemment. La pasteurisation est ensuite réalisée et la plus utilisée c'est

une flash-pasteurisation (environ 95 °C pendant une trentaine de secondes) puis la descente de température est plus longue que pour le jus pur, de l'ordre de 10 minutes et le jus n'est pas complètement refroidi, il reste chaud jusqu'à l'étape suivante de concentration.

III.4.2. Concentration et congélation

La concentration et la congélation du concentré ont lieu sur les sites de production (Brésil, États-Unis et Turkey) après l'étape de la pasteurisation. L'opération de concentration consiste à éliminer environ 80 % de l'eau contenue dans le jus, en altérant le moins possible les pulpes ainsi que les composés aromatiques. Le procédé le plus couramment utilisé est la concentration par les effets combinés de la chaleur et du vide (évaporation) dans des échangeurs thermiques qui sépare les vapeurs formées du produit liquide concentré. Cette technologie d'évaporateurs est connue sous le nom de TASTE (Thermally Accelerated Short Time Evaporator). D'autres procédés sont également décrits comme la cryoconcentration (concentration par le froid) et l'osmose inverse. L'osmose inverse est un procédé de séparation en phase liquide par perméation à travers des membranes semi-sélectives sous l'effet d'un gradient de pression. Ces procédés sont connus pour être plus respectueux de la qualité du jus, mais ils restent 2 à 3 fois plus coûteux (Fox, 2000).

Les arômes étant très volatils, ils sont rapidement entraînés avec l'eau d'évaporation. Cet effet d'entraînement à la vapeur provoque un appauvrissement très net de la solution concentrée en composés d'arôme. Pour pallier ce problème, les concentrateurs sont équipés de récupérateurs d'arômes : les composés aromatiques du jus extrait avec la vapeur sont séparés par distillation et concentrés. Les extraits, une phase aromatique aqueuse et une phase aromatique huileuse sont vendus aux industriels de l'aromatique qui les revendront aux conditionneurs après transformation. Ces derniers les réincorporeront lors de la fabrication du jus à base de concentré. La phase aqueuse contient les composés d'arôme les plus volatils, des aldéhydes de faible poids moléculaire et des alcools. La phase huileuse contient les composés les plus hydrophobes, comme les terpènes, les alcools terpéniques, les aldéhydes et les esters.

Les concentrés de jus de grenade obtenus sont d'abord refroidis rapidement jusqu'à 0 °C, puis congelés dans des échangeurs de chaleur ; la masse pâteuse obtenue est refroidie à -40 °C, puis entreposée à une température ne dépassant pas -18 °C.

III.5. Contrôle de la qualité

Malgré les avantages liés à la consommation des fruits et leur jus frais, celle-ci pose un problème de sécurité alimentaire dans la mesure où ces aliments consommés sans aucun traitement de conservation sont depuis longtemps reconnus comme sources de transmission de maladies infectieuses. Même si la majorité des intoxications alimentaires sont dues à la consommation d'aliments d'origine animale contaminés, le nombre de cas associés aux fruits et leur jus frais a progressé au cours des dix dernières années. Ainsi une large gamme de ces produits contaminés a récemment causé d'importantes épidémies d'infections microbiennes.

Deux types de contrôles en cours de fabrication ont été évoqués ci-dessous : le contrôle de l'acidité avant la pasteurisation (mesure du pH au crayon pH) et le contrôle de la teneur en sucre de la boisson (mesure du degré Brix au réfractomètre). Ces contrôles doivent être complétés par le suivi de deux paramètres :

- ***La qualité sanitaire de l'eau : taux de chlore, d'ions***

La production de jus de fruit utilise une eau potable en grande quantité aussi bien pour la fabrication du produit lui-même que pour le nettoyage des fruits, des locaux et des équipements. Ainsi, il faut faire une analyse régulière de l'eau et mettre en place éventuellement un système de filtration.

- ***La qualité bactériologique des produits finis : une fois par semestre***

Les analyses microbiologiques ont pour objectif de vérifier que les micro-organismes ont été détruits au cours de la pasteurisation. En cas de problème de fabrication, les contrôles doivent être intensifiés.

2^{EME} PARTIE : DEMARCHE SCIENTIFIQUE

I.1. Contexte

Au Maroc et en France, la consommation des fruits augmente depuis le début des années 90, surtout grâce aux produits transformés, en particulier les jus. 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, pourra faire évoluer le linéaire des boissons à base de fruits (pomme, raisin, banane, ananas, litchi, kiwi, orange, etc.) et surprendre les consommateurs. La consommation en fruits et légumes est considérée comme un enjeu de santé publique. C'est également un enjeu économique pour les producteurs et les transformateurs marocains. Pour mieux réussir l'objectif de la maîtrise du procédé de transformation des jus, l'étude de l'extraction des jus par pressage. Ce projet pourra valoriser les jus de grenadier comme étant un produit typique et de production locale et méditerranéenne.

I.2. Problématiques

- Le grenadier est mal valorisé au Maroc.
- La caractérisation chimique et biochimique est incomplète (identification des polyphénols, activité antioxydante...), et les études sur le pouvoir antioxydant sont rares
- La stabilisation de jus des grenades est mal maîtrisée.
- La transformation du grenadier est peu développée, les études de l'impact de la transformation sur la qualité des produits finis sont quasi inexistantes.
- La microbiologie des jus des grenades est non étudiée jusqu'à maintenant.

I.3. Objectifs

Une fois la problématique scientifique et les hypothèses seront fixées, la recherche se déroulera selon plusieurs étapes qui sont représentées par les objectifs scientifiques suivants :

- Le premier objectif de ce travail est de valoriser les ressources génétiques du grenadier marocain et de mettre en évidence sa richesse et sa diversité. L'analyse de cette diversité fait intervenir l'étude des caractéristiques morphologiques qui sera complétée par la suite par une étude physicochimique et biochimique.

- Le deuxième objectif est d'élaborer un processus de conservation des jus des grenades permettant d'obtenir : un produit stable et 'clair'. Acceptable d'un point de vue organoleptique, microbiologique et avec une meilleure conservation de la composition phénolique afin de préserver le pouvoir antioxydant/ antiradicalaire de ces jus.

I.4. Axes de recherche

La démarche générale adoptée dans le cadre de cette recherche est basée sur les 4 axes : 1) Evaluer la diversité pomologique, biochimique et physicochimique du grenadier au Maroc afin de le comparer avec celui de l'étranger, 2) Etudier la stabilité des pigments anthocyanines contenus dans le jus des grenades, après avoir soumis le jus à différents processus de conservation, 3) Etudier l'effet de la clarification enzymatique sur le jus de grenade, 4) Etudier la microbiologie prédictive du jus.

Premier axe - Evaluer la diversité pomologique et biochimique du grenadier au Maroc afin de le comparer avec celui de l'étranger.

Les études morphologiques ont été menées dans différents pays tels que l'Espagne et la Tunisie concernant la variabilité du grenadier en se basant sur les caractéristiques morphologiques afin de révéler sa large diversité génétique (Mars and Marrakchi, 1999).

Concernant la caractérisation physico-chimique des grenades et le dosage des polyphénols totaux, tous les travaux publiés jusqu'à maintenant ont identifié les sucres et les acides organiques contenus dans le jus ainsi que leurs concentrations en polyphénols totaux (Legua et al., 2012). D'autres études ont pu identifier dans le jus de grenade l'acide citrique, malique, oxalique, tartrique, fumarique et lactique, tandis que pour les sucres, plusieurs études ont montré que le fructose est détecté en quantité plus élevée que le glucose (Melgarejo et al., 2000 ; Poyrazoglu, 2001 ; Al-Maiman and Ahmad, 2002). Ces travaux ont permis aussi de mettre en évidence une activité antioxydante élevée du jus de grenade par le dosage des polyphénols totaux et des anthocyanes et l'évaluation de l'activité antioxydante des jus de grenades (Caliskan and Bayazit, 2012 ; Gil et al., 2000)

Au Maroc, l'étude morphologique est faite juste pour certains clones locaux et de variétés étrangères conduites dans la région de Meknès (Oukabli et al., 2004). L'article fait état aussi de données biochimiques aussi, mais sommaires et qui restent insuffisantes pour une valorisation commerciale de jus.

Une autre étude a été réalisée par Martinez et al. (2012) concernant quelques paramètres morphologique et physico-chimique de six cultivars marocains récoltés de différentes régions du Maroc. L'objectif du présent travail est de compléter cette étude en analysant d'autres cultivars collectionnés au niveau de l'INRA de Meknès tout en faisant une classification basée sur les paramètres analysés. Ensuite, une comparaison entre le matériel végétal local et étranger sera faite.

Deuxième axe – Concerne l'étude de la stabilité des pigments anthocyanines contenus dans le jus des grenades, après avoir soumis le jus à différents paramètres de pasteurisation.

Après avoir déterminé les caractéristiques physico-chimiques des cultivars marocains de grenadier, nous allons procéder au développement d'autres produits à base des grenades afin de prolonger la durée de consommation de ces fruits qui peut aller jusqu'à des semaines et voire des mois.

Le jus ainsi élaboré, à subir différents températures (65, 77 et 95°C°) et à différentes périodes. Cette étude permettra la détermination de l'effet de température sur la qualité du jus de grenade notamment sa composition phénolique et surtout les anthocyanes, son activité antioxydante ainsi que sa qualité microbiologique.

Troisième axe - Etudier l'effet de la clarification enzymatique sur le jus de grenade.

Plusieurs chercheurs ont rapporté que l'utilisation pectinase pourrait effectivement clarifier les jus de fruits (Alvarez et al, 1998 ; Ceci and Lozano, 1998; Vaillant et al, 1999 ; Yusof and Ibrahim, 1994). L'hydrolyse des pectines par des pectinases conduit à la floculation des complexes pectine-protéines. Le jus obtenu présente une quantité légèrement faible de pectines et une viscosité plus faible, ce qui facilite le processus de filtration ultérieure.

Quatrième axe - Etudier la microbiologie prédictive du jus.

Le secteur de l'industrie agroalimentaire occupe une place stratégique dans l'économie nationale. Ainsi, il représente 25% de l'ensemble des grands secteurs industriels marocains vu les grandes capacités d'agriculture de notre pays. Quant à l'industrie de fabrication des jus, il s'avère que cette activité est dirigée de plus en plus vers le marché intérieur. Ce marché est devenu capital et attrayant pour les différents opérateurs et professionnels. Cependant, avec l'ouverture du marché, les industriels marocains seront

obligés d'assurer un haut niveau de qualité, notamment microbiologique, de leurs produits afin de faire face à la rude concurrence qui en résulte. Récemment l'analyse des risques et ses composantes ont été adoptées comme nouvelle approche pour évaluer et maîtriser les risques microbiologiques, dans le but de protéger la santé des consommateurs et d'assurer des pratiques loyales dans le commerce des aliments (Anonyme, 2007).

La modélisation de la croissance microbienne est l'un des points clés de l'appréciation quantitative des risques. Les modèles permettent, lorsqu'il n'est pas possible de mesurer directement l'exposition, de la prédire en fonction de la contamination primaire, des conditions d'environnement ou du traitement subi tout au long de la chaîne de production et de distribution de l'aliment (Moez, 2002). Ainsi, mon travail consiste à appliquer les modèles mathématiques fournis par la base de données ComBase sur le jus de grenade « *Punica granatum* », afin d'élaborer une modélisation de la qualité microbiologique qui permettra par la suite de caractériser et analyser le risque microbiologique lié à une éventuelle contamination de ces deux jus par E.coli. Alors, on peut tirer une estimation de la durée de vie de ces produits dans différentes conditions du pH, température et d'activité de l'eau.

3^{EME} PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I . Caractérisation pomologique, physico-chimique et biochimique de dix-huit cultivars collectionnés à l'INRA de Meknès

I.1. Généralités

Dans l'objectif d'aider les agriculteurs marocains dans le choix et la sélection du meilleur cultivar ayant des caractéristiques physico-chimiques intéressantes, notamment en termes de rendement en jus, de teneur en sucres, de composition phénolique et aussi activité antioxydante, de nombreuses études ont joué un rôle très implorant pour une meilleure sélection des cultivars ayant des propriétés technologiques assez importantes. Toutefois, pour un cultivar donné et dans des conditions bien définies, la composition physicochimique du fruit varie en fonction du stade de maturité, des conditions édapho-climatiques et de fertilisation qui influencent considérablement ou légèrement les caractéristiques du fruit. Ces variations sont plus ou moins significatives, mais très rarement minimales d'un cultivar à un autre (Melgarejo et al., 2000 ; Ozkan, 2002).

Il existe un grand nombre de variétés de grenades qui ne se différencient pas seulement par leur morphologie, mais aussi par leur composition physico-chimique, en particulier par leur teneur en sucre, en acide, vitamine C, en polyphénols et leur rendement en jus. Selon cette composition en sucre et en acide, les variétés sont souvent réparties en grenades aigres, aigres-douces et douces (Cemeroglu et al., 1992 ; Melgarejo et al., 2000).

Toutefois, le but de ce travail est d'analyser et de comparer les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques ainsi qu'évaluer l'activité antioxydante des cultivars collectionnés à l'INRA de Meknès. Et par la suite cet aspect contribue dans la sélection des cultivars ayant des caractéristiques spécifiques qui peuvent être intéressantes pour des industries agroalimentaires.

I.2. Matériels et méthodes

I.2.1. Matériel végétal utilisé

Le matériel végétal évalué est constitué de 18 cultivars (dont 10 locaux et 8 étrangers) installés en collection au domaine expérimental à Ain Taoujdate – Meknès, situé dans la plaine du Saïs à 550m d'altitude. Le sol en légère pente est argileux, brun calcaire. La pluviométrie moyenne annuelle est de 460 mm. Les températures moyennes présentent un maximum en juillet (37°C) et un minimum en janvier (2.8°C)(Figure 18).

Les variétés ont été plantées en 1996 à un écartement de 5 x 3m, à raison de 3 arbres/ génotype, répartis d'une manière aléatoire. Le verger est conduit en irrigué à raison de 2500 m³/Ha répartis du mois de mai à mi-octobre. Les arbres sont conduits en forme libre avec élimination des rejets. Tous les cultivars étaient dans les mêmes conditions géographiques et subissant les mêmes pratiques horticoles de conduite. Les cultivars étrangers sont connus mondialement et très cultivés dans les pays d'origine d'où leur collection par l'INRA. L'ensemble des fruits de 18 cultivars sont présentés dans la figure 20 et tableau 5.

- Echantillonnage

Vingt fruits de chaque cultivar sont recueillis à maturité début d'octobre en 2009. Nous avons récolté cinq fruits au hasard de chacune des quatre orientations géographiques des arbres, tout en évitant les fruits les plus exposés au soleil et aussi ceux qui existent carrément en bas de l'arbre. Après la récolte, les fruits sont immédiatement envoyés au laboratoire pour analyse.



Figure 19. Carte montrant la localisation du domaine expérimental à Ain Taoujdate – Meknès.

1.2.2. Caractérisation physique et qualité organoleptique des graines

Les fruits, les graines et les pépins sont pesés à l'aide d'une balance de précision, alors que la longueur et le diamètre du fruit sont déterminés à l'aide d'un pied à coulisse digital. Après la séparation manuelle des graines des écorces, nous avons déterminé le pourcentage en graines, en pépins, en écorces et enfin en jus. La mesure de l'épaisseur de l'écorce, de la

dimension des graines et des pépins sont mesurés aussi par pied à coulisse digital.

La dureté des pépins, le goût et la couleur des graines sont évalués par un groupe composé de 8 agents du personnel de l'unité de l'amélioration des plantes et conservation des ressources phylogénétiques à l'INRA de Meknès.

I.2.3. Préparation des échantillons pour analyse

Une fois les fruits sont lavés et pelés, les graines sont séparées manuellement de l'écorce, ensuite, le jus est extrait à partir des arilles à l'aide d'une presse mécanique, centrifugé afin d'éliminer la pulpe et enfin stocké à -20 °C. Une idée sur la couleur des jus élaborés est présentée au niveau de la figure 21.

Tableau 5 : Origine géographique des 18 cultivars installés en collection au Domaine expérimental de l'INRA à Meknès.

Cultivars	Code	Nom du cultivar	Origine géographique
Locaux	L1	Grenade jaune	Maroc
	L2	Grenade rouge	Maroc
	L3	Chioukhi	Maroc
	L4	Ounk Hmam	Maroc
	L5	Gjebali	Maroc
	L6	Djeibi	Maroc
	L7	Chelfi	Maroc
	L8	Bzou	Maroc
	L9	Sefri	Maroc
	L10	Sefri2	Maroc
Etrangers	F1	Gordo de Jativa	Espagne
	F2	Negro Monstrioso	Espagne
	F3	Wonderful	USA
	F4	Ruby	USA
	F5	Dwarf semi Evergreen	USA
	F6	Mollar Osin Hueso	Chine
	F7	Zherie précoce	Tunisie
	F8	Zherie d'Automne	Tunisie



Grenade jaune



Grenade rouge



Chioukhi



Ounk Hmam



Gjebali



Djeibi



Chelfi



Bzou



Sefri



Sefri 2



Gordo de Jativa



Negro Monstrioso



Wonderful



Ruby



Dwarf semi Evergreen



Mollar Osin Hueso



Zherie précoce



Zherie d'Automne

Figure 20. Aspects mophologique des fruits de 18 cultivars collectionnés au niveau du

domaine expérimental Aïn Taoujdate -INRA- Meknès.

I.2.4. Acidité titrable, pH, degré °Brix, Indice de maturité et matière sèche

L'acidité titrable (AT) est déterminée par titration jusqu'au pH 8.1 avec une solution de NaOH 0.1 M. L'AT est exprimée en gramme d'acide citrique par 100 ml de jus (AOAC, 1984). La mesure du pH est réalisée par un pH-mètre (Thermo Orien 3 Star). Le degré Brix est une valeur qui est à peu près égale au pourcentage des sucres présents dans un jus, il est déterminé par un refractomètre digital (Metteler- Toledo GmbH, 30PX, Switzerland) et sa calibration est effectuée par de l'eau distillée. L'indice de maturité est donné par le rapport entre le degré Brix et l'acidité du jus. La matière sèche est déterminée par étuvage des échantillons de jus à une température de 103 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante.



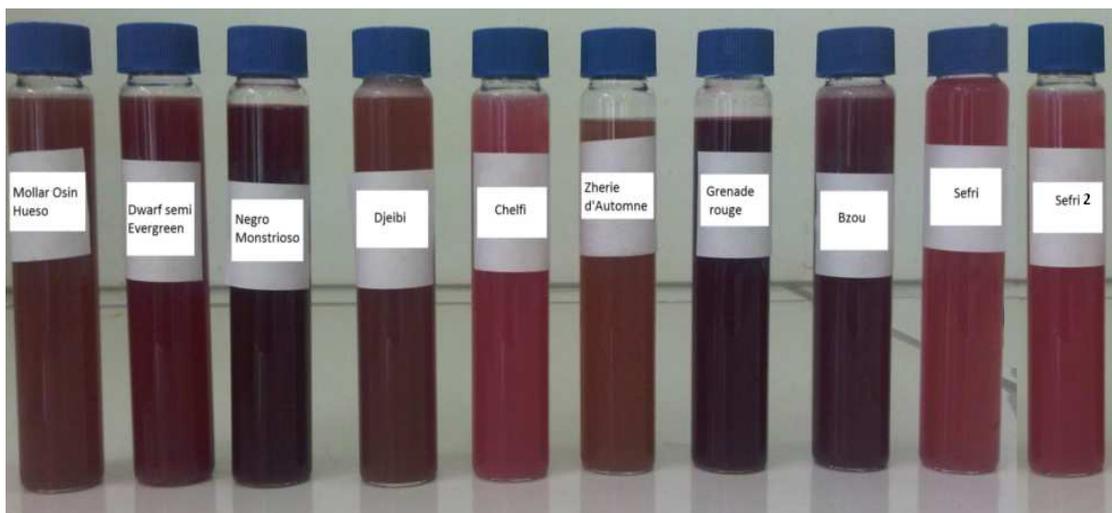


Figure 21 : Couleur de Jus élaboré à partir des 18 cultivars

I.2.5. Composition en protéines totaux

La composition en protéines totaux (CPT) est déterminée par la méthode de Lowry et al. (1951). Cette méthode a rendu le dosage des protéines plus sensible et moins tributaire de la teneur en tyrosine et tryptophane en effectuant d'abord un prétraitement cupro-alcalin des protéines à doser, s'inspirant de l'ancienne méthode de biuret (Complexation du cuivre avec les liaisons peptidiques donnant une coloration violette absorbant la lumière à 670 nm). Les ions Cu^+ et les radicaux du tryptophane, tyrosine et Cystéine réduisent le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique (couleur jaune) contenu dans le réactif Folin-Ciocalteu, produisant ainsi une couleur bleue.

Ainsi, 1 ml d'échantillon du jus dilué 1/20 avec de l'eau distillée et 1 ml de réactif A sont mélangés et laissés au repos pendant 10 min à température ambiante. Ensuite quatre millilitres de réactif de Folin dilué, préparé par dilution de 0,5 ml de réactif de Folin 1 N avec 4 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange.

La solution a été incubée pendant 5 min à 55 ± 1 °C et laissée refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 670 nm. La teneur totale en protéines du jus a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage préparée avec du Sérum Albumine Bovine.

Le réactif A contient 20 g d'hydroxyde de sodium, 100 g de carbonate de sodium, 2 g de Tartrate de Potassium et de Sodium et 0,5 g de sulfate de cuivre II pentahydraté par 1000 ml d'eau distillée.

I.2.6. Dosage des polyphénols des jus

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et qui est décrite par Singleton and Rossi (1965). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses. 300 µl du jus dilué 1/100 avec du méthanol/eau (6 :4) est mélangé avec 1,5 mL du réactif Folin Ciocalteu dilué 1/10 et 1,2 ml de 7,5% du carbonate de sodium. Le mélange est incubé pendant 90 min à l'obscurité et à température ambiante après l'absorbance est mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Safas UV-visible. Les résultats sont exprimés en mg d'acide gallique par litre de jus.

I.2.7. Détermination des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes des jus est déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Lamaison and Carnat (1990). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe d'aluminium-flavonoïde, ayant une absorption maximale à 430 nm. La rutine est utilisée pour élaborer la courbe d'étalonnage. Ainsi, 1 ml de l'échantillon est dilué séparément, ensuite mélangé avec 1 ml d'une solution méthanolique contenant 2% de chlorure d'aluminium. Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre Safas UV-visible et le contenu des flavonoïdes est exprimé en mg d'équivalents de rutine par litre de jus.

I.2.8. Composition en anthocyanes totaux

La composition en anthocyanine totaux (CAT) est estimée par la méthode du pH différentielle en utilisant deux tampons : tampon chlorure de potassium à pH 1,0 (25 mM) et le tampon acétate de sodium à pH 4,5 (0.4 M) (Lako et al, 2007). Ensuite, 0,4 mL de jus est mélangé séparément avec 3,6 mL de chacun des deux tampons et mesurer l'absorbance à 510 nm et 700 nm, ensuite l'absorbance Abs est calculée comme suit :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}_{1,0}} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}_{4,5}}$$

Les anthocyanes totaux des échantillons, exprimées en mg de cyanidine-3-glucoside/100ml de jus, sont calculés selon l'équation suivante :

Composition en Anthocyanines Totaux = $(\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 100 / \text{CAM})$

Avec Abs : absorbance ; PM : Poids moléculaire (449,2) ; FD : Facteur de dilution (20) ; CAM : Coefficient d'absorption molaire de Cyanidine-3-glucoside (26.900).

I.2.9. Détermination des tanins hydrosolubles

Les tanins hydrolysables sont déterminés par la méthode de Willis and Allen (1998), avec des modifications minimales. Une mixture d'un millilitre du jus dilué 1/20 et de 5 ml de 2,5 % de KIO₃ sont mélangées à l'aide d'un vortex pendant dix secondes. Une absorbance maximale est obtenue après 2 min pour le jus et l'optimum de la réaction et 4 min pour la solution standard de l'acide tannique. L'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas UV-visible). Les résultats sont exprimés en mg d'acide tannique par litre de jus et pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage nous avons pris 6 différentes concentrations de l'acide tannique (500-2000 mg/L).

I.2.10. Détermination des tanins condensés

Les tanins condensés sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin Denis, décrite par Joslyn (1970). La réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin en présence de tanins donne une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm. Bref, dans une fiole de 100 ml, nous introduisons : 75 ml d'eau distillée, 1 ml du jus dilué 1/20, 5 ml du réactif de Folin Denis et 10 ml de la solution saturée de CO₃Na.

Cette solution saturée est préparée à partir de 43,75 g de carbonate de sodium dissous dans 100 ml d'eau chaude (70° à 80°C). Après refroidissement, la solution est filtrée puis ajustée à 125 ml. Après agitation mécanique, la préparation repose pendant 30 minutes, la mesure de la densité optique est faite à 760 nm. Une gamme étalon d'acide tannique est préparée dans les mêmes conditions, dont les concentrations allant de 0 à 0,1 g/L, alors que le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sauf que l'eau distillée est mise à la place du jus.

- Préparation du Folin Denis

Ce réactif est préparé à partir de 10 g de tungstate de sodium, 2 g d'acide phosphomolybdique et 5ml d'acide phosphorique concentré. Ces produits sont ajoutés à 75 ml d'eau dans un ballon à col rodé. Le tout est porté à reflux

pendant 2 heures. Après refroidissement, nous transvasons dans une fiole jaugée de 100 ml, que nous complétons à volume avec l'eau distillée.

L'acide phosphomolybdique est réduit lors d'une oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une large bande d'absorption entre 620 et 750 nm ; elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

I.2.11. Identification et quantification des composés phénoliques des jus extraits des arilles par CLHP :

Les analyses CLHP sont réalisées sur une chaîne HPLC de marque Agilent (HP 1100 Waldbronn, Allemagne) équipée d'un système de dégazage, d'une pompe quaternaire, d'un système d'injection automatique thermostaté et d'un détecteur à barrettes de diodes. Les composés phénoliques sont séparés en appliquant un gradient d'élution sur une colonne en phase inverse Nucleodur® C18 Gravity (250 x 4,6 mm, ayant des particules de 5 µm et des pores de 110 Å) (Macherey Nagel, Allemagne), thermostatée à 30°C. Les solvants (A) et (B) correspondent respectivement aux solutions eau/acide formique 95/5 (v/v) et acétonitrile/eau/acide formique 80/15/5 (v/v/v). Une fois le jus est dilué au ½ en mélangeant 600µL de jus et 600µL de (6 :4) v/v méthanol/eau, le mélange est centrifugé à 8000 tours/min pendant 5 min à 4°C. Ensuite le surnageant est filtré à l'aide d'un un filtre PTFE 0,45µm. L'extrait de composés phénoliques est injecté (10 µL) et l'élution des composés phénoliques se fait pendant 90 min après application du gradient présenté dans le Tableau 6. L'analyse des composés phénoliques de chaque cultivar est analysée.

Tableau 6. Gradient d'élution des composés phénoliques par CLHP.

Temps en minutes	% solvant B	% solvant A
0	3	97
19	4	96
30	4	96
31	6	94
38	14	86
50	14	86
55	30	70
65	35	65
68	50	50
70	80	20
75	80	20
80	3	97

90	3	97
----	---	----

Légende : solvant A : eau/acide formique 95/5 (v/v) ; solvant B : acétonitrile/eau/acide formique 80/15/5 (v/v/v).

Les chromatogrammes ont été enregistrés et leur traitement a été exploité en utilisant le logiciel ChemStation (Agilent, Allemagne).

Les composés phénoliques sont identifiés à partir de leurs longueurs d'onde et de leurs temps de rétention. L'identification des composés phénoliques est effectuée en comparant les pics trouvés à des étalons de références bien déterminés. Le pic de chaque molécule est intégré et sa surface est ainsi notée en tenant compte des solutions standard qui nous ont permis d'étalonner l'appareil CLHP. Les 11 composés sélectionnés pour la calibration sont analysés à leur longueur d'onde d'absorption maximale. Chaque gamme comporte six concentrations différentes qui seront analysées en CLHP afin d'obtenir une droite de calibration.

Dans ces conditions, les temps de rétention des substances étudiées à 20°C sont reportés dans le tableau 7.

Tableau 7. Temps de rétention à la température de 20°C et longueur d'onde (λ) de détection des composés phénoliques étudiés.

Longueur d'onde	Composés phénoliques	Temps de rétention (min)
280	Acide gallique	4,40
	Catéchine	19,80
	Epicatéchine	40,10
	Acide ellagique	54,38
	Phloridzine	60,30
320	Acide chlorogénique	27,70
	Acide caféique	28,50
	Acide p-coumarique	42,76
	Acide férulique	50,95
360	Rutine	57,00
	Quercétine	65,30

I.2.12. Détermination de l'activité antioxydante

I.2.12.1. Méthode DPPH

La capacité antioxydante des jus de grenade (JG) est étudiée en utilisant l'évaluation de l'effet antiradicalaire libre des antioxydants, existant dans ces jus, sur le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH). Cette méthode est

proposée par Brand-Williams et al. (1995). En bref, 100 µl de jus de grenade diluée 1:100 avec du méthanol: eau (6:4) ensuite, mélangé avec 2 ml de 0,1 mM DPPH préparé dans le méthanol. L'Absorbance de la solution résultante est mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre SAFAS UV-Visible après une incubation à l'obscurité pendant 30 min. Le mélange réactionnel sans DPPH est utilisé pour la correction de fond. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH•, comme suit :

Capacité antioxydante (%) = $[1 - (\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ échantillon} / \text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ contrôle})] \times 100$.

I.2.12.2. Méthode FRAP

La méthode FRAP décrite par Benzie and Strain (1996), est basée sur la capacité des jus à réduire le fer. Le mode opératoire est résumé comme suit : 40 µl de jus dilué 1:20 avec du méthanol: eau (6:4) ensuite, mélangé avec 0,2 ml d'eau distillée et 1,8 ml de réactif FRAP. Après incubation à 37 °C pendant 10 min, l'absorbance du mélange est mesurée par un spectrophotomètre SAFAS UV-Visible à 593 nm. Le Réactif FRAP doit être préchauffé à 37 °C et doit toujours être fraîchement préparé. Une courbe d'étalonnage a été préparée, en utilisant de différentes concentrations d'une solution aqueuse de sulfate ferreux $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (300- 1100 µmole / L). Les résultats sont exprimés en mmole de Fe^{2+} / L.

-Préparation du réactif FRAP

Cette solution doit être préparée fraîchement :

- 25ml du tampon acétate de sodium 300 mM, pH 3,6(3,1 g de l'acétate de sodium et 16ml de l'acide acétique dans 1000ml d'eau distillée
- 2,5 ml de la solution 10 mM 2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine dans 40mM HCL
- 2,5 ml de la solution 20mM de $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillée.

I.2.12.3. Méthode ABTS

La méthode utilisée a été décrite par Re et al. (1999), basée sur la capacité de l'échantillon à inhiber les radicaux ABTS •+ par rapport à un composé antioxydant de référence (Trolox ®). La solution ABTS• est préparée par dissolution de 30 mg d'ABTS dans 7,8 ml de 2,46 mM peroxodisulfate de potassium. Après 16 heures, cette solution est diluée avec 100 mM de tampon phosphate (pH 7,6) pour donner une absorbance égale à $0,700 \pm 0,05$ à une

longueur d'onde de 734 nm. Les échantillons sont également dilués avec le même tampon au 1/20 (v:v). Ensuite, 50 µl d'échantillons dilués sont mélangés avec 1950 µl de solution d'ABTS • et l'absorbance est mesurée après 6 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en mg TEAC par litre de jus de grenade.

I.2.13. L'analyse statistique

Toutes les analyses sont réalisées par le logiciel SAS (Statistical Analysis System) 917 Instituto Cay NC (USA). En utilisant une analyse de variance (ANOVA) les différences entre les moyennes sont déterminées pour un niveau de probabilité de 5% en utilisant la procédure GLM PROC. Ensuite, les données relatives aux différents cultivars et aux différents paramètres sont soumises à une analyse en composantes principales (ACP) puis à une analyse de groupes.

I.3. Résultats et discussion

I.3.1. Caractérisation physique des fruits

Les caractères pomologiques des différentes variétés, présentés au niveau du tableau 8, ont montré une différence significative. Le poids moyen des fruits s'est situé entre 206,6 g 'Chelfi' (L7) et 506,67 g 'Sefri2' (L10) (Tableau 8). Shulman et al. (1984) a montré que la variation du poids de fruit dépend du cultivar et du climat. En plus la longueur du fruit varie entre 58,93 'Chelfi' (L7)-86,07 mm 'Sefri2' (L10) et son diamètre entre 72,13 'Chelfi' (L7)-96,33 mm 'Sefri2' (L10), la longueur du calice est de 12,40 'Wonderful' (F3) à 21,93 mm 'Ounk Hmam' (L4), tandis que le diamètre varie entre 16,81 'Negro Monstrioso' (F2)-26,33 mm 'Ounk Hmam' (L4). Les travaux réalisés par Oukabli et al. (2004) sur la même collection, ont trouvé un poids moyen qui varie de 262 'Ruby' à 520,7g 'Sefri 2' et le cultivar 'Chelfi' ayant le poids bas dans nos résultats, à un poids moyen de 338,3 g. La petite différence observée entre nos travaux et ceux d'Oukabli et al., (2004) peut être expliquée par la variabilité des conditions climatiques. De même, nos résultats sont généralement en accord avec des travaux réalisés par Martinez et al. (2012) sur cinq cultivars marocains (Sefri, Ounk Hmam, Ruby, Rouge Marrakech, Bouâdime et Jaune Marrakech) et un cultivar étranger qui sont tous cultivés dans de différentes régions du Maroc, ainsi, dans cette étude le poids, le diamètre et la longueur du fruit, le diamètre et la longueur du calice des fruits varient respectivement entre 206,6 'Chelfi' (L7)-535,1 g 'Séfri 2' (L10); 72,13 'Chelfi' (L7)-96,33 mm 'Séfri 2' (L10) ; 58,93 'Chelfi' (L7)-86,06 mm Séfri 2 (L10); 16,81 'Negro

Monstrioso' (F2)–23,3 mm et 12,4 'Wonderful' (F3)–21,93 mm 'Ounk Hmam'(L4).

Les valeurs obtenues pour le nombre des carpelles se situent entre 5,87 'Negro Monstrioso'(F2) et 7,5 'Grenade rouge'(L2). Martinez et al. (2012) a trouvé aussi une variation de carpelles qui se situe entre 5,9 et 7,1. Et en ce qui concerne l'épaisseur et le pourcentage de l'écorce du fruit des cultivars étudiés, ils varient respectivement entre 1,24 'Gordo de Jativa'(F1)-2,79 mm 'Ruby'(F4) et 22,09 (F7)- 60,78 % (L9). Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues par Tehranifar et al. (2010). Le tableau 9 montre une variation importante pour les pourcentages en graines, en jus et en pépins qui varient respectivement entre 56,45 'Grenade rouge'(L2) - 69,41% 'Bzou'(L8) ; 29,73% 'Grenade jaune'(L1) - 54,42% 'Gordo de Jativa'(F1); 9,36 'Dwarf semi Evergreen'(F5)- 18,56% 'Grenade jaune' (L1).

Tableau 8. Caractéristiques physiques des dix-huit cultivars de grenadier collectionnés à Ain Taoujdate-INRA Meknès

Cultivars	Poids du fruit (g)	Diamètre du fruit (mm)	Diamètre du calice (mm)	Hauteur du fruit (mm)	hauteur du calice (mm)	N° de carpelles	Poids d'écorce (g)	Epaisseur de l'écorce
L1	466,00 ± 86,12 ^{ab}	93,33 ± 7,74 ^{0a}	20,80 ± 2,11 ^{bcd}	80,73 ± 6,23	13,20 ± 3,65	7,00 ± 0,71	130,00 ± 30,21	2,33 ± 0,56
L2	317,66 ± 65,46 ^{de}	83,60 ± 5,91 ^c	19,66 ± 2,92 ^{cde}	73,46 ± 5,71	16,53 ± 2,42	7,50 ± 0,55	106,66 ± 41,19	1,83 ± 0,59
L3	359,00 ± 76,98 ^{cd}	85,41 ± 6,62 ^{bc}	21,73 ± 1,29 ^{bc}	74,26 ± 4,91	17,26 ± 3,97	7,11 ± 0,78	121,11 ± 19,49	2,16 ± 0,51
L4	392,66 ± 52,12 ^c	88,80 ± 6,09 ^b	26,33 ± 4,11 ^a	75,86 ± 5,39	21,93 ± 5,45	7,40 ± 1,34	117,00 ± 48,16	2,51 ± 0,93
L5	237,00 ± 29,02 ^g	75,86 ± 3,96 ^{ef}	19,46 ± 1,77 ^{cdef}	61,93 ± 3,13	14,80 ± 2,43	6,71 ± 0,76	64,48 ± 11,70	2,00 ± 0,60
L6	300,66 ± 52,91 ^e	80,80 ± 4,93 ^{cd}	17,93 ± 2,91 ^{efg}	71,80 ± 5,02	13,40 ± 2,06	6,71 ± 0,95	66,42 ± 10,29	1,91 ± 0,20
L7	206,60 ± 54,02 ^g	72,13 ± 6,73 ^f	18,73 ± 2,02 ^{defg}	58,93 ± 5,48	14,80 ± 2,78	6,85 ± 1,07	75,01 ± 19,15	2,70 ± 0,86
L8	394,33 ± 83,04 ^c	88,53 ± 6,28 ^b	18,61 ± 2,67 ^{defg}	78,53 ± 5,21	15,13 ± 2,72	7,01 ± 0,71	118,81 ± 31,78	2,05 ± 0,42
L9	446,01 ± 77,67 ^b	95,21 ± 7,78 ^a	25,66 ± 5,26 ^a	82,82 ± 4,97	18,62 ± 6,02	6,83 ± 0,41	190,02 ± 35,07	2,65 ± 0,36
L10	506,66 ± 91,45 ^a	96,33 ± 4,61 ^a	20,33 ± 2,41 ^{bcde}	86,06 ± 4,01	14,00 ± 3,30	7,16 ± 0,41	164,16 ± 41,28	2,05 ± 0,51
F1	222,66 ± 42,59 ^g	74,53 ± 4,64 ^{ef}	18,00 ± 3,98 ^{efg}	62,80 ± 5,43	14,80 ± 3,23	6,50 ± 0,84	70,00 ± 25,12	1,24 ± 0,24
f2	309,02 ± 62,85 ^{de}	80,81 ± 5,70 ^{cd}	16,81 ± 2,24 ^g	70,66 ± 4,85	14,66 ± 3,75	5,87 ± 0,75	95,03 ± 21,38	2,79 ± 1,20
F3	314,00 ± 80,65 ^{de}	83,86 ± 6,81 ^c	17,06 ± 2,81 ^{fg}	74,26 ± 6,94	12,40 ± 7,60	6,16 ± 0,41	88,33 ± 12,11	2,25 ± 0,20
F4	331,66 ± 41,09 ^{de}	84,86 ± 4,43 ^{bc}	20,86 ± 3,42 ^{bcd}	76,00 ± 4,46	15,60 ± 3,62	6,88 ± 0,78	117,77 ± 46,64	2,79 ± 0,71
F5	311,33 ± 30,85 ^{de}	81,66 ± 3,29 ^{cd}	22,40 ± 3,87 ^b	73,60 ± 4,19	16,53 ± 3,16	7,00 ± 0,82	83,57 ± 15,74	2,29 ± 0,41
F6	308,66 ± 49,84 ^{de}	83,86 ± 5,21 ^c	18,02 ± 2,86 ^{efg}	71,80 ± 3,55	13,86 ± 3,29	7,16 ± 0,75	99,01 ± 28,81	1,96 ± 0,46
F7	289,33 ± 28,15 ^{ef}	83,80 ± 2,57 ^c	20,73 ± 2,19 ^{bcd}	68,93 ± 3,35	13,40 ± 2,67	7,42 ± 0,53	64,28 ± 7,87	2,08 ± 0,69
F8	243,66 ± 22,79 ^{fg}	78,46 ± 3,51 ^{ed}	18,93 ± 1,94 ^{defg}	64,80 ± 3,17	15,53 ± 3,34	6,55 ± 0,53	68,88 ± 19,49	2,49 ± 0,73

L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'Automne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres (a-h) ne sont pas significativement différentes à (P<0,05)

Nos résultats concernant le pourcentage en jus sont conformes avec ceux rapportés par Tehranifar et al. (2010) (26,95- 46,55 ml/100g du fruit). Le plus grand volume de jus pour 100 g de fruits est observé pour les cultivars 'Gordo de Jativa' (F1), 'Mollar Osin Hueso' (F6), 'Djeibi' (L6) et 'Sefri 2' (L10). Ces cultivars peuvent être intéressants pour la production du jus. Toutefois, la production industrielle de jus (rendement de jus 30-70% (Cemeroglu et al., 1992) a longtemps été faible en raison de problèmes technologiques lors de la fabrication et des prix élevés des matières premières. Mais grâce à ses bénéfices sur la santé, sa demande a énormément augmenté ces dernières années. Il existe aussi des élixirs de grenades qui contiennent souvent des jus concentrés, et des extraits de pépins des grenades.

Tableau 9. Rendement, en graines, en pépins et en jus pour les 18 cultivars.

Cultivars	Rendement en graine(%)	Rendement en pépins (%)	Rendement en jus v/p(%)
L1	59,72 ± 4,30 ^{bc}	18,56 ± 2,73	29,73 ± 6,31 ^{cd}
L2	56,45 ± 9,60 ^{cd}	13,15 ± 1,93	34,08 ± 2,87 ^d
L3	68,65 ± 9,41 ^a	13,76 ± 5,33	39,64 ± 6,11 ^{ab}
L4	59,71 ± 6,43 ^{bcd}	12,68 ± 3,95	38,73 ± 4,84 ^{bcd}
L5	64,16 ± 3,77 ^{cd}	16,61 ± 1,56	44,28 ± 2,71 ^{ab}
L6	63,46 ± 8,73 ^d	15,21 ± 3,45	46,07 ± 3,16 ^b
L7	61,15 ± 3,47 ^d	16,17 ± 1,91	38,09 ± 3,11 ^{bcd}
L8	69,41 ± 1,60 ^{bcd}	16,48 ± 4,42	43,71 ± 7,74 ^{ab}
L9	61,52 ± 2,62 ^{bc}	11,26 ± 1,37	32,85 ± 3,35 ^{bcd}
L10	67,57 ± 7,51 ^d	9,45 ± 2,16	45,97 ± 9,29 ^{ab}
F1	65,51 ± 7,80 ^{cd}	10,45 ± 5,61	54,42 ± 8,45 ^a
f2	64,92 ± 6,28 ^{bcd}	15,19 ± 3,37	45,87 ± 8,23 ^b
F3	63,73 ± 2,89 ^d	14,92 ± 1,73	39,98 ± 2,07 ^{bc}
F4	66,30 ± 12,44 ^{cd}	11,97 ± 0,42	42,51 ± 5,51 ^b
F5	58,56 ± 4,27 ^d	9,36 ± 1,48	42,41 ± 4,73 ^b
F6	67,04 ± 13,43 ^{bcd}	15,78 ± 2,57	47,51 ± 8,73 ^{ab}
F7	61,74 ± 4,04 ^d	13,23 ± 2,35	38,79 ± 4,08 ^{bc}
F8	62,06 ± 9,81 ^{bcd}	13,97 ± 2,72	43,44 ± 2,88 ^{ab}

L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'Automne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres (a-h) ne sont pas significativement différentes à (P<0,05).

1.3.2. Caractérisation physique des graines et pépins

Les caractéristiques physiques des graines et pépins montrent une variabilité significative entre les dix-huit cultivars étudiés à l'exception de la longueur des graines et le poids des pépins. Toutefois, le poids, la longueur et le diamètre

des pépins varient respectivement entre 0,027 'Gjebali'(L5)- 0,055 g 'Sefri'(L9) ; 5,983 'Gjebali'(L5)- 7,772 mm 'Ruby'(F4) ; 2,183 'Chelfi'(L7)- 2,903 mm 'Mollar Osin Hueso'(F6) (tableau 10). Ces paramètres sont considérés moins importants que la teneur en fibres brutes et la dureté des pépins puisque ces derniers donnent une bonne idée sur l'inappétence des graines, car ils correspondent à la quantité de matière ligneuse par rapport au poids total de la graine (Melgarejo, 1993).

Tableau 10. Caractérisation physique des graines des dix-huit cultivars étudiés.

Cultivars	PG (g)	LG (mm)	DG (mm)	PP (g)	LP (mm)	DP (mm)
L1	0,344 ± 0,045 ^{gh}	10,876 ± 0,776 ^b	6,746 ± 0,834 ^{fg}	0,045 ± 0,008 ^b	7,540 ± 0,738 ^a	2,345 ± 0,296 ^{hi}
L2	0,383 ± 0,041 ^{ef}	10,492 ± 0,711 ^b	7,274 ± 0,628 ^{de}	0,038 ± 0,013 ^b	6,491 ± 0,491 ^{de}	2,612 ± 0,317 ^{defg}
L3	0,477 ± 0,048 ^c	11,499 ± 0,793 ^b	7,535 ± 0,755 ^{cd}	0,045 ± 0,056 ^b	7,014 ± 0,701 ^{bc}	2,543 ± 0,350 ^{efgh}
L4	0,261 ± 0,025 ^m	9,649 ± 0,907 ^a	5,913 ± 0,745 ⁱ	0,035 ± 0,006 ^b	6,918 ± 0,806 ^{cd}	2,501 ± 0,415 ^{bcde}
L5	0,284 ± 0,033 ^{kl}	9,461 ± 0,629 ^b	6,553 ± 0,492 ^{gh}	0,027 ± 0,003 ^b	5,983 ± 0,586 ^f	2,193 ± 0,378 ⁱ
L6	0,385 ± 0,088 ^e	10,708 ± 2,043 ^b	6,676 ± 1,321 ^{fgh}	0,039 ± 0,009 ^b	6,784 ± 1,351 ^{cd}	2,445 ± 0,509 ^{hi}
L7	0,267 ± 0,034 ^{lm}	9,566 ± 0,594 ^b	6,306 ± 0,567 ^{hi}	0,031 ± 0,005 ^b	6,151 ± 0,299 ^{ef}	2,183 ± 0,282 ^{efg}
L8	0,363 ± 0,027 ^{efg}	10,613 ± 0,497 ^b	7,033 ± 0,683 ^{ef}	0,043 ± 0,007 ^b	7,016 ± 0,404 ^{bc}	2,673 ± 0,336 ^{bcde}
L9	0,508 ± 0,037 ^a	11,953 ± 0,671 ^b	8,256 ± 0,777 ^a	0,055 ± 0,011 ^a	7,313 ± 0,544 ^{ab}	2,871 ± 0,493 ^a
L10	0,401 ± 0,043 ^b	11,201 ± 0,659 ^b	7,006 ± 0,875 ^b	0,039 ± 0,004 ^b	7,269 ± 0,706 ^{ab}	2,581 ± 0,293 ^{bc}
F1	0,356 ± 0,068 ^{fgh}	11,304 ± 0,409 ^b	7,082 ± 0,979 ^{ef}	0,035 ± 0,006 ^b	6,937 ± 0,737 ^{bc}	2,400 ± 0,249 ^{fghi}
F2	0,313 ± 0,035 ^{ij}	10,599 ± 0,743 ^b	6,649 ± 0,646 ^{fgh}	0,049 ± 0,073 ^b	7,061 ± 0,422 ^{cd}	2,701 ± 0,265 ^{efg}
F3	0,305 ± 0,031 ^{jk}	10,101 ± 0,646 ^b	6,661 ± 0,592 ^{fgh}	0,035 ± 0,004 ^b	6,726 ± 0,638 ^{cd}	2,551 ± 0,388 ^{efgh}
F4	0,368 ± 0,039 ^{efg}	10,913 ± 0,691 ^b	7,601 ± 0,561 ^{cd}	0,048 ± 0,057 ^b	6,772 ± 0,681 ^{cd}	2,831 ± 0,424 ^{bcd}
F5	0,335 ± 0,027 ^{hi}	10,381 ± 0,663 ^b	7,085 ± 0,877 ^{ef}	0,042 ± 0,011 ^b	6,832 ± 0,622 ^{cd}	2,705 ± 0,475 ^{hi}
F6	0,451 ± 0,045 ^d	11,691 ± 0,824 ^b	7,932 ± 0,811 ^{bc}	0,037 ± 0,006 ^b	7,434 ± 0,643 ^a	2,903 ± 0,491 ^b
F7	0,209 ± 0,117 ⁿ	12,42 ± 0,767 ^b	8,102 ± 0,983 ^b	0,032 ± 0,006 ^b	7,312 ± 0,602 ^{ab}	2,380 ± 0,369 ^{ghi}
F8	0,464 ± 0,064 ^{cd}	11,912 ± 0,987 ^b	7,661 ± 0,785 ^{cd}	0,028 ± 0,006 ^b	6,676 ± 0,951 ^{cd}	2,286 ± 0,349 ⁱ

Légende : PG : Poids des graines ; LG : Longueur des graines ; DG : Diamètre des graines ; PP : Poids des pépins ; LP : Longueur des pépins ; DP : Diamètre des pépins ; L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'automne.

I.3.3. Qualité organoleptique des fruits

Le tableau 11 présente l'évaluation de l'analyse sensorielle qui concerne les paramètres gustatifs suivants : la dureté, la saveur, la couleur et le détachement de l'écorce. Toutefois, la saveur et la dureté des graines influencent beaucoup la qualité gustative des fruits, ainsi les cultivars suivants (Grenade jaune(L1), Grenade rouge(L2), Gjebali(L5), Djeibi(L6), Chelfi(L7),

(Bzou)L8, Sefri(L9), Sefri2(L10), Gordo de Jativa(F1), Zherie précoce(F7) et Zherie d'Automne(F8)) sont dotés d'une qualité bonne ou excellente et doivent être destinés à une consommation à l'état frais, du fait qu'ils ont une saveur sucrée ou moyennement sucrée, ainsi que leurs pépins qui sont tendres ou semi-durs. Les fruits des autres cultivars doivent être destinés vers la transformation.

En ce qui concerne la couleur des graines, elle varie considérablement entre tous cultivars en passant du rose-blanchâtre vers le rouge foncé. Toutefois les cultivars (Ounk Hmam(L4), Gjebali(L5), Bzou(L8), Sefri2(L10), Gordo de Jativa (F1), Negro Monstrioso(F2), Wonderful(F3), Ruby(F4), Dwarf semi Evergreen(F5) et Mollar Osin Hueso(F6)) ayant des graines rouge ou rouge foncé peuvent être utilisés comme source potentielle en colorants alimentaires ou cosmétiques. Cette coloration rouge est due à la composition en pigments anthocyanines, qui en plus de leurs propriétés colorantes, présentent des activités antioxydantes importantes (Gil et al., 2000).

Tableau 11. Caractéristiques organoleptiques des fruits des 18 cultivars étudiés

Cultivars	Dureté	Saveur	Couleur des graines	Détachement de l'écorce
L1	Tendre	Sucré	Rose rouge	Facile
L2	Tendre	Sucré	Rose rouge	Facile
L3	Semi dure	Assez sucré	Rose blanche	Difficile
L4	Tendre	Assez sucré	Rouge	Facile
L5	Semi dure	Sucré	Rouge	Facile
L6	Tendre	Sucré	Rose foncé	Difficile
L7	Dure	Sucré	Rose-blanche	Facile
L8	Tendre	Sucré	Rouge	Facile
L9	Tendre	Sucré	Rose rouge	Facile
L10	Tendre	Assez sucré	Rouge	Facile
F1	Dure	Sucré	Rouge	Facile
F2	Dure	Acide	Rouge foncé	Facile
F3	Dure	Acide	Rouge foncé	Facile
F4	Dure	Acide	Rouge	Difficile
F5	Dure	Acide	Rouge foncé	Facile
F6	Semi dure	Assez sucré	Rouge	Facile
F7	Tendre	Sucré	Rose	Difficile
F8	Semi dure	Sucré	Rose	Facile

L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'automne.

1.3.4. Acidité titrable, pH, degré de Brix, indice de maturité et matière sèche

Les résultats obtenus pour l'acidité titrable (AT), le pH, le degré Brix et l'indice de maturité de différents cultivars sont présentés dans le tableau 12. Une variabilité significative a été révélée entre les cultivars de grenade pour tous les paramètres étudiés. La valeur élevée du degré Brix est observée pour le cultivar 'Sefri2' L10 (17,07 °Brix) et la plus faible est remarquée pour 'Grenade rouge' L2 avec une valeur de 12,33 °Brix. Nos résultats sont inférieurs aux valeurs obtenues par Poyrazoglu et al. (2002) 16-19 °Brix, et ils sont en accord avec des valeurs rapportées par Fadavi et al. (2005) qui sont entre 10 et 16,5 °Brix. Les valeurs de pH varient de 2,85 'Ounk Hmam' (L4) à 4,22 'Bzou' (L8). Ces valeurs obtenues dans la présente étude sont supérieures à celles rapportées par Tehranifar et al. (2010) pour les cultivars grenadier cultivés en Iran (3,16 à 4,09). Il faut signaler aussi que Gozlekci and Kaynak, (2000) a montré que le pH du jus de grenade est assez élevé au début de la formation du fruit et il diminue rapidement en juillet puis une légère augmentation est observée en août, septembre et en octobre, due à la maturation du fruit.

Le contenu acidité titrable va varier de 0,19 'Ounk Hmam' (L4) à 2,31 g/100 ml 'Negro Monstrioso' (F2). Des résultats similaires ont également été signalés par Fadavi et al. (2005). alors que les valeurs rapportées par Legua et al. (2012) pour dix cultivars utilisés dans différentes régions du Maroc sont relativement plus élevés que les résultats obtenus dans ce présent travail (de 0,24 à 3,7 g / L). Selon les résultats, le type de cultivar joue un rôle important en termes de total des solides solubles, le pH et l'acidité titrable du jus de grenade. En comparant le pH et l'acidité du jus de grenade avec celui de l'abricot, on trouve que ce dernier a des valeurs proches de ceux trouvés pour la grenade (pH moyen = 3,4 ; l'acidité moyenne = 1,7 g/100 ml), tandis que son °Brix (11) est très faible rapport à la grenade. (Radi et al., 1997).

Dans la classification actuelle des cultivars espagnols établis par Melgarejo (1993) : les variétés douces (MI = 31 à 98), aigre-doux cultivars (MI = 17 à 24) et des cultivars acides (MI = 5 à 7). L'indice de maturité (TSS / TA) des cultivars évalués présentés dans le tableau 12 montre que tous les cultivars appartiennent à la première catégorie, à l'exception de L8 qui appartient à la deuxième catégorie et F2 appartient à la troisième catégorie.

I.3.5. Détermination des protéines totaux et de l'Humidité

Les teneurs moyennes en protéines des jus se situent entre 1,49 'Djeibi' (L6) et 8,51 g/L 'Dwarf Semi Evergreen' (F5) (tableau 12). Dans une autre étude élaborée par Al-Maiman and Ahmad (2002), cette teneur est de 1,05%. Ils ont montré aussi un faible changement de protéines contenant dans le jus au cours de la maturation et qui passe de 0.97 à 1.03. Le changement de la composition en protéines au cours de la maturation est déjà signalé dans d'autres fruits (Al Khalifa and Dilshad, 1998).

La teneur en humidité varie entre 84,71 'Wonderful' (F3) et 89,11% 'Grenade rouge' (L2). Une étude élaborée par Al-Maiman and Ahmad (2002), a montré que la teneur en humidité varie considérablement dans le jus tout au long de la maturité des fruits alors qu'aucune différence n'est observée dans les graines et ils ont trouvé que le jus de grenade contient 84,57 % d'humidité. El-Nemr et al (1992) ont rapporté un taux d'humidité de (85,40 %) dans les jus de fruits frais.

Tableau12. Caractéristique chimique des jus élaborés des 18 cultivars.

Cultivars	AT (g /100ml)	pH	°Brix	IM (°Brix/AT)	TPT (g/L)	Hum (%)
L1	0,36 ± 0,03 ^{ef}	3,65 ± 0,17 ^{abc}	17,00 ± 0,45 ^a	47,22 ± 3,36 ^c	2,93 ± 0,12 ^{def}	85,50 ± 9,23 ⁱ
L2	0,48 ± 0,02 ^{ef}	3,54 ± 0,15 ^{de}	12,33 ± 0,12 ⁱ	25,69 ± 2,03 ^c	7,38 ± 0,23 ^b	89,11 ± 5,56 ^a
L3	0,27 ± 0,02 ^{ef}	3,18 ± 0,08 ^{de}	16,00 ± 0,21 ^b	59,26 ± 4,31 ^b	3,19 ± 0,08 ^{cde}	88,44 ± 7,34 ^{ab}
L4	0,21 ± 0,02 ^f	2,85 ± 0,09 ^h	15,40 ± 0,22 ^{cd}	73,33 ± 7,19 ^a	7,47 ± 0,11 ^b	86,83 ± 8,12 ^{de}
L5	0,42 ± 0,10 ^{ef}	4,17 ± 0,32 ^{bc}	16,13 ± 0,12 ^{fg}	38,40 ± 8,75 ^d	2,63 ± 0,02 ^{ef}	85,89 ± 5,24 ^{ijk}
L6	0,35 ± 0,31 ^b	3,66 ± 0,12 ^{fgh}	15,00 ± 0,34 ^e	42,86 ± 2,09 ^g	1,49 ± 0,14 ^g	87,29 ± 7,23 ^{cd}
L7	0,38 ± 0,26 ^c	4,01 ± 0,51 ^h	16,20 ± 0,21 ^b	42,63 ± 2,79 ^{fg}	8,17 ± 1,21 ^a	88,23 ± 7,78 ^b
L8	0,67 ± 0,06 ^c	4,22 ± 0,30 ^a	15,26 ± 0,31 ^{cde}	22,52 ± 1,34 ^g	8,29 ± 0,54 ^a	86,46 ± 8,10 ^{def}
L9	0,22 ± 0,03 ^e	3,38 ± 0,14 ^{cd}	16,80 ± 0,12 ^g	76,36 ± 6,76 ^{de}	1,85 ± 0,03 ^g	85,80 ± 4,34 ^{ijk}
L10	0,26 ± 0,08 ^a	4,15 ± 0,12 ^{de}	17,07 ± 0,31 ^{fg}	65,65 ± 4,67 ^g	2,73 ± 0,25 ^g	87,75 ± 5,56 ^{bc}
F1	0,19 ± 0,02 ^f	3,83 ± 0,06 ^{ab}	14,40 ± 0,20 ^f	75,79 ± 6,79 ^a	3,08 ± 0,17 ^{cdef}	86,53 ± 6,23 ^{def}
F2	2,31 ± 0,28 ^d	3,18 ± 0,15 ^{de}	15,50 ± 0,52 ^c	6,71 ± 1,70 ^{ef}	3,70 ± 0,72 ^c	86,85 ± 7,00 ^{de}
F3	0,46 ± 0,02 ^{ef}	3,04 ± 0,17 ^{ef}	16,06 ± 0,12 ^b	34,91 ± 2,09 ^c	2,66 ± 0,04 ^{ef}	84,71 ± 3,70 ^K
F4	0,32 ± 0,02 ^{ef}	3,71 ± 0,07 ^{ab}	15,06 ± 0,31 ^{de}	47,06 ± 4,56 ^c	7,47 ± 0,31 ^b	87,53 ± 8,78 ^{bc}
F5	0,24 ± 0,04 ^{ef}	3,18 ± 0,20 ^{efg}	15,06 ± 0,12 ^{de}	62,75 ± 9,65 ^b	8,51 ± 0,86 ^a	86,87 ± 5,67 ^{de}
F6	0,34 ± 0,02 ^{ef}	3,73 ± 0,16 ^{de}	16,06 ± 0,12 ^b	47,24 ± 2,70 ^c	3,10 ± 0,42 ^{cdef}	87,12 ± 5,20 ^{cd}
F7	0,25 ± 0,05 ^{ef}	3,48 ± 0,10 ^h	14,60 ± 0,50 ^h	58,40 ± 6,77 ^{bc}	2,56 ± 0,15 ^f	85,55 ± 9,34 ⁱ
F8	0,46 ± 0,13 ^b	3,69 ± 0,21 ^{gh}	14,26 ± 0,31 ^{fg}	31,00 ± 2,63 ^g	3,27 ± 0,32 ^{cd}	86,37 ± 4,13 ^{def}

Légende : AT : Acidité titrable ; IM : Indice de maturité ; TPT : Teneur en protéines totaux ; Hum : Humidité. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres (a-h) ne sont pas significativement différentes à (P<0,05).

I.3.6. Polyphénols totaux (PT), des flavonoïdes totaux (FT) et composition en anthocyanes totaux (CAT)

Les résultats concernant la composition en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et en anthocyanes totaux des jus de dix-huit cultivars sont présentés dans la figure 22.

La figure 22(A) montre les résultats obtenus pour les polyphénols totaux. La valeur la plus élevée est celle de l'échantillon 'Grenade jaune' (L1) (9476,32 mg/ L) tandis que la plus faible est celle de l'échantillon 'Zherie d'Automne' (F8) avec 1284,42 mg/ L. La classification des cultivars selon leur composition phénolique est la suivante : L1> L3> F1> F5> L4> F4> F2> L8> L7> F3> L10> L2> L9> L6> F6> F7> L5> F8. Une variation significative de PT a été relevée à ($P < 0,05$) entre les dix-huit jus. Ces différences peuvent être dues aux différents états de maturation et à la nature de cultivar. Les PT sont des anthocyanines (telles que cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside et delphindin-3-glucoside), catéchines, tanins ellagiques, et acide éllagique (Aviram et al., 2000). Ces résultats permettent aussi de remarquer que le cultivar 'Grenade jaune 'F1' ayant la composition en polyphénols la plus élevée correspond aussi un °Brix élevé aussi et égal à 17°Brix, tandis que la plus basse valeur de PT observée pour le cultivar Zehrie d'automne 'F8' correspond à une valeur assez basse de °Brix (14,26 °Brix)

Gil et al. (2000) ont montré que les PT du jus de grenade (JG), extrait à partir d'arilles frais du cultivar Wonderful cultivé en Californie, est de 2117 ± 95 mg/ L alors que pour le JG commercial est de 2566 ± 131 mg/ L tandis que cette composition est de l'ordre de 2083–3436 mg L⁻¹ pour jus élaborés à partir des huit cultivars en Turquie (Çam et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec les nôtres. Les PT de JG sont supérieurs à celui des autres jus : navets (772 mg/ L), cerise acide (797 mg/ L) (Gündüç and El, 2003), raisin rouge (1728 mg/ L) (Sanchez-Moreno et al., 1999), vin rouge (1869 mg/ L) (Gatti et al., 2011) et abricot (644 mg/ L) (Radi et al., 1997). Par contre, les PT du jus de *Viburnum opulus* (351,3 mg/ L) sont supérieurs à celui du JG (Çam and Hişil, 2007).

En ce qui concerne le cultivar Wonderful, nos résultats obtenus (4587,71 mgGAE/L), sont plus élevés que ceux élaborés par Gil et al. (2000) (2117 ± 95 mg/ L), ce qui pourra être expliqué par le climat aride qui règne dans le Maroc. Donc l'effet du stress hydrique qui engendre cette augmentation en polyphénols totaux. Malgré les bénéfices des polyphénols sur la santé humaine, Mena et al. (2011) ont indiqué que les fruits contenant des taux très

élevés en ces composés causent une astringence indésirable des produits élaborés lors d'une transformation industrielle.

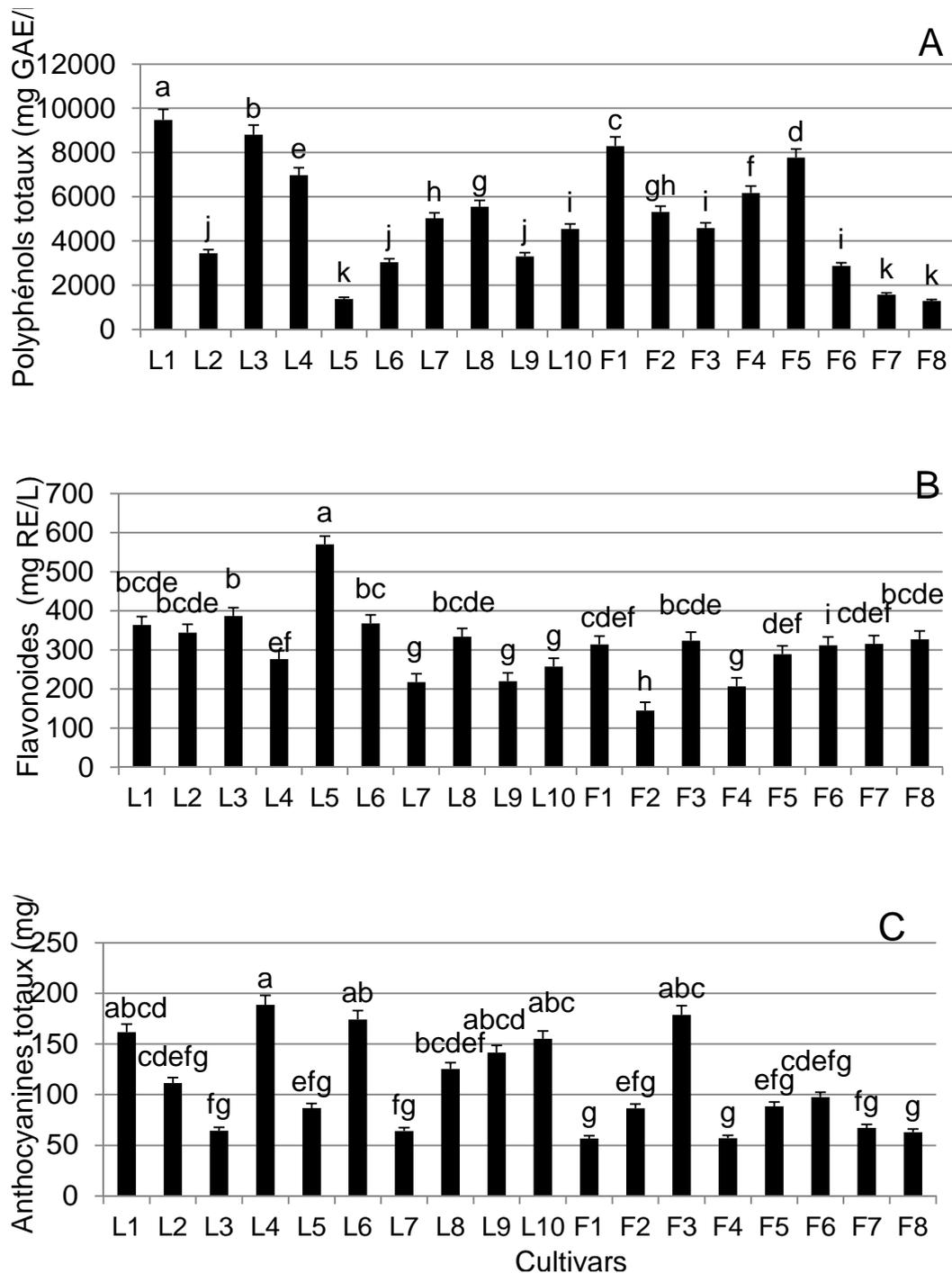


Figure 22. Concentration en polyphénols totaux **(A)**, en flavonoïdes totaux **(B)** et en anthocyanes totaux **(C)** de dix-huit jus de grenade. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type de 3 répétitions par échantillon. Le test ANOVA est réalisé sur la base de différences significatives ($p < 0,05$) qui est indiquée par les différentes lettres.

Comme le montre la figure 22(B), une grande variation en termes de FT est observée entre les cultivars étudiés (144,46-569,89 mg RE / L) et les différences étaient significatives statistiquement à ($P < 0,05$). La hiérarchie des valeurs observées était comme suivant : L5> L3> L6> L1> L2> L8> F8> F3> F7> F1> F6> F5> L4> L10> L9> L7> F4> F2. Guo et al. (2008) ont indiqué que la valeur obtenue pour le contenu des flavonoïdes du jus de grenade est de 174 mg/L, alors que pour celui de la pomme est de 92 mg/ L. Dans la même étude, ils ont conclu que la consommation quotidienne de jus de grenade est potentiellement meilleure que le jus de pomme en termes de l'amélioration de la fonction antioxydante chez les personnes âgées.

Le contenu total en anthocyanes des échantillons de jus de grenade est présenté dans la figure 22(C). Cependant, une variation significative statistiquement à ($P < 0,05$) est observée parmi les cultivars étudiés. Cependant, cette composition varie de 64,16 'Chioukhi'(L3) à 188,7 mg/L 'Ounk Hmam'(L4) pour les cultivars locaux et pour les cultivars étrangers se situe entre 56,58 'Gordo de Jativa'(F1) et 178,79 mg/ L'Wonderful'(F3). Ces valeurs sont plus faibles que celles publiées pour huit cultivars de grenade largement répandus en Turquie, leur jus extrait d'arilles pressés donne des valeurs comprises entre 81 et 369 mg/L (Aviram et al., 2000).

Le classement des cultivars selon les valeurs obtenues est comme suit : L4> F3> L6> L1> L10> L9> L8> L2> F6> F5> L5> F2> F7> L3> L7> F8> F4> F1. Ces résultats sont très importants, car ils peuvent sélectionner des cultivars ayant des compositions en anthocyanes les plus élevées (L4, F3 et L6) afin de les extraire et les utiliser dans l'industrie pharmaceutique ou comme additif alimentaire.

I.3.7. Tanins hydrolysables et tanins condensés

Les résultats obtenus pour les tanins hydrolysables et condensés sont présentés sur la figure 23.

Ainsi les tanins hydrolysables varient entre 230,1 et 484,2 mg/L pour les cultivars locaux alors que pour les étrangers entre 216,3 et 730,8 mg/L (Figure 23A), ces composés ont de différentes combinaisons de glucose, d'acide gallique, d'acide hexahydroxydiphénique (qui donne naissance à l'acide ellagique après hydrolyse) et d'acide tetragallique. Gil et al. (2000) ont montré que la composition des jus de grenade en tanins hydrolysables est de 539,20 mg/L. Et la teneur en tanins condensés est presque la même entre les cultivars locaux (251,9-644,7 mg/L) et étrangers (296,1 et 648,5 mg/L). Ces

résultats sont intéressants, car les tanins peuvent être absorbés dans les intestins. En fait, il est reporté que les ellagitannins des grenades sont hydrolysés chez les souris, conduisant à l'excrétion de l'acide ellagique dans l'urine et les fèces (Gil et al., 2000).

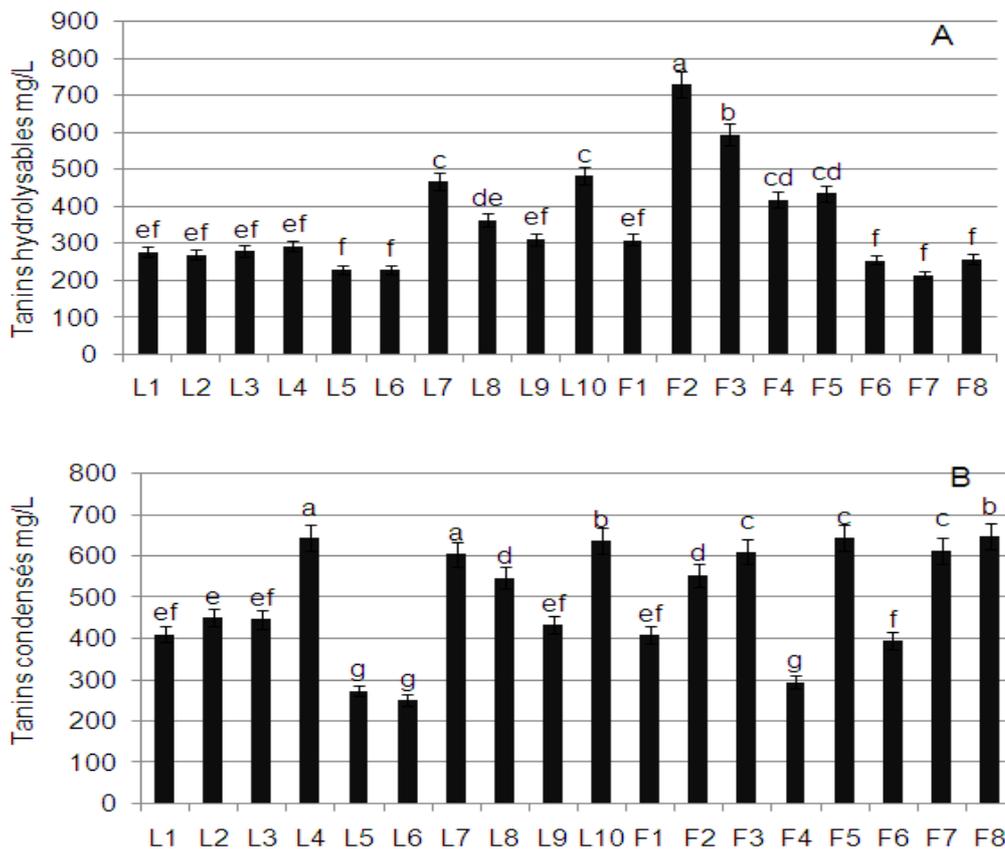


Figure 23. Concentration en tanins hydrosolubles(A) et en tanins condensés (B) de dix-huit jus de grenade. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type de 3 répétitions par échantillon. Le test ANOVA est réalisé sur la base de différences significatives ($p < 0,05$) qui est indiquée par les différentes lettres.

1.3.8. Identification et quantification des composés phénoliques par l'analyse de CLHP

Après l'enregistrement des chromatogrammes, leur traitement est exploité en utilisant le logiciel Chem Station (Agilent, Allemagne).

Le chromatogramme illustrant les pics correspondant aux différents composés phénoliques des jus étudiés est illustré dans la figure 24, tandis que le tableau 13 donne les concentrations de composés phénoliques individuels identifiés

dans des jus étudiés. Une différence significative statistiquement en composés phénoliques ($P < 0,05$) a été observée, due à une variabilité des cultivars. Dans cette étude nous avons pu identifier et quantifier 11 composés phénoliques, qui sont des acides hydroxybenzoïques tels que les acides gallique et ellagique, acides hydroxycinnamiques tels que les acides chlorogénique, caféique, p-coumarique et férulique, flavan-3-ols comme la catéchine et épicatechine, dihydrochalcones tels que la phloridzine, les flavonols comme la quercétine et flavonols glycosides tels que la rutine. 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 catéchine (1,31 'F5' - 6,84 mg/L 'F3'), l'épicatechine (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 catéchine, 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 $4,55 \pm 8,55$ mg/L, la catéchine $3,72 \pm 2,29$ mg / L, l'acide chlorogénique $1,24 \pm 1,42$ mg / L, l'acide caféique $0,78 \pm 0,79$ mg / L, l'acide férulique $0,01 \pm 0,02$ mg / L, la phloridzine $0,99 \pm 1,47$ mg / L et la quercétine $2,50 \pm 1,96$ 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.

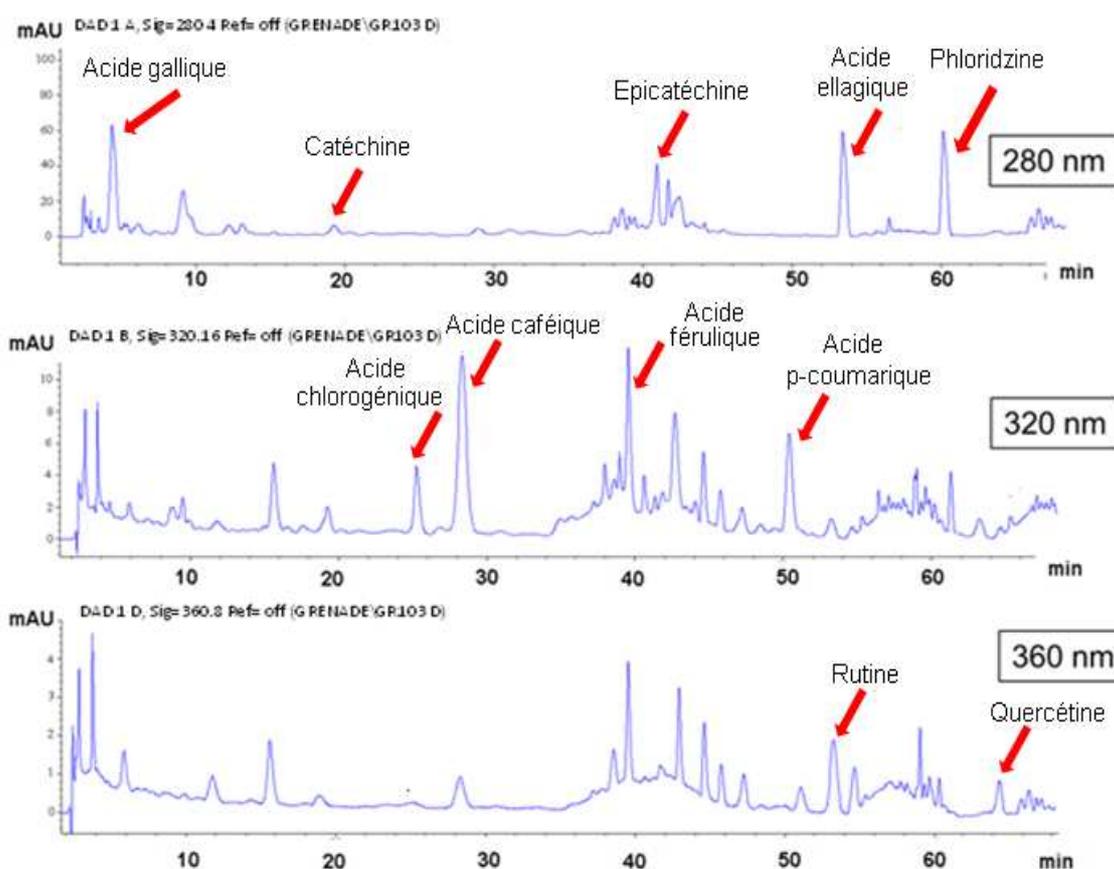


Figure 24. Chromatogramme des composés phénoliques dans le jus de grenade (L5) cultivé au Maroc.

Dans ce présent travail, tous les cultivars contiennent de l'acide ellagique, sans exception, et les concentrations les plus élevées ont été observées pour les cultivars L3 'Chioukhi' (95 mg / L), L1 'Grenade jaune' (74,3 mg / L) et L4 'Ounk Hmam' (70,4 mg / L), ainsi, ces cultivars devraient avoir un effet bénéfique sur la santé humaine, puisque ce composé est connu par ses propriétés antimutagéniques, antivirales et antioxydantes (Bhargava and Westfall, 1968). Amakura et al. (2000) a constaté que l'acide ellagique est un acide phénolique important avec une capacité antioxydante élevée, il est détecté dans certains jus de fruits, dont le jus de grenade élaboré à partir des arilles par exemple Mousavinejad et al. (2009) ont trouvé (7 - 160 mg / L) et Gil et al. (2000) (15,3 mg / L). Finalement, la teneur en acide ellagique dans les compléments alimentaires a été sélectionnée comme un élément détecteur pour s'assurer que les suppléments contiennent un véritable extrait de grenade (Zhang et al., 2009).

Tableau 13. Compositions phénoliques des jus de grenade analysés par CLHP

Cultivars	Gal (mg/L)	Cat (mg/L)	Epicat(mg/L)	Ellag (mg/L)	Chl (mg/L)	Caf (mg/L)	p-Cou (mg/L)	Fer (mg/L)	Que (mg/L)	Phl (mg/L)	Rut (mg/L)
L1	27,90±1,81 ^f	1,85±0,26 ^{ijh}	3,49±0,28 ^f	74,30±9,72 ^b	2,39±0,07 ^a	1,46 ±0,09 ^a	2,11±0,57 ^{fg}	1,61±0,53 ^{cd}	2,23 ± 0,17 ^{cd}	0,29±0,03 ^{fg}	1,12±0,12 ^{de}
L2	41,73±2,28 ^e	5,01± 0,07 ^{dc}	1,58±0,11 ^{gh}	33,90±0,38 ^e	2,22±0,23 ^a	0,55±0,06 ^{defg}	1,78±0,21 ^{gh}	0,67±0,22 ^e	1,75 ± 0,07 ^e	0,25±0,05 ^{fg}	1,02±0,12 ^{ef}
L3	37,82±1,02 ^e	2,72±0,09 ^{fgh}	4,47± 0,31 ^d	95,02±5,28 ^a	1,40±0,09 ^{bcd}	0,36±0,10 ^{fg}	2,41±0,98 ^{cde}	1,63±0,35 ^f	1,79 ± 0,28 ^{de}	0,41±0,06 ^{cd}	1,39±0,21 ^{cd}
L4	41,41±1,15 ^e	2,33±0,62 ^{ghij}	10,23±0,79 ^b	70,41±1,84 ^b	1,93±0,19 ^b	1,44±0,11 ^a	2,48±0,89 ^{defg}	3,10±1,04 ^{de}	2,70 ± 0,57 ^c	0,44±0,14 ^{cd}	2,34±0,23 ^b
L5	77,71±6,07 ^{bc}	2,32±0,52 ^{fgh}	3,51±0,22 ^f	69,50±3,35 ^b	1,75±0,10 ^{bc}	0,39±0,08 ^{fgh}	4,72 ± 0,67 ^{ab}	4,50±0,81 ^{ab}	2,32 ± 0,18 ^c	0,6 ±0,06 ^a	3,12±0,13 ^a
L6	66,45±1,78 ^c	2,64 ±0,54 ^{fg}	4,37±0,33 ^{de}	66,70±7,85 ^b	1,33±0,14 ^{cd}	0,51±0,06 ^{def}	1,92 ± 0,24 ^{fg}	2,38±0,44 ^{de}	2,02 ± 0,38 ^c	0,39±0,07 ^{def}	1,26±0,06 ^{de}
L7	60,40±1,92 ^d	6,29±0,55 ^{ab}	1,54±0,32 ^{gh}	63,01±3,61 ^b	1,64±0,04 ^{bcd}	0,69 ±0,04 ^{cd}	5,88 ±0,45 ^a	3,04±0,09 ^{cd}	0,60 ± 0,04 ^h	0,62±0,02 ^{ab}	0,86±0,06 ^{fg}
L8	37,80±3,34 ^e	2,44±0,40 ^{ghi}	5,61 ± 0,84 ^c	37,81±2,31 ^e	2,22 ± 0,29 ^a	0,21 ± 0,06 ^{hi}	4,57±0,52 ^{ab}	4,78±0,27 ^a	1,43 ± 0,07 ^{ef}	0,27±0,05 ^{efg}	1,31±0,06 ^{cd}
L9	42,41±2,21 ^e	2,11±0,92 ^{fgh}	13,88±1,17 ^a	23,43±2,94 ^g	0,90 ± 0,08 ^e	0,48±0,05 ^{efg}	1,65±0,38 ^g	0,57±0,12 ^f	0,74 ± 0,07	0,23±0,05 ^{fg}	0,73±0,02 ^{fg}
L10	16,80±0,22 ^g	3,48±0,33 ^{ef}	3,22 ± 0,29 ^f	52,10±1,78 ^c	1,67±0,08 ^{bcd}	1,04± 0,18 ^b	2,08±0,51 ^{efg}	0,71±0,10 ^f	5,61 ± 0,27 ^a	0,36±0,03 ^{def}	1,24±0,11 ^{cd}
F1	25,30±5,50 ^f	4,25±0,79 ^{de}	2,17 ± 0,26 ^g	26,71±1,03 ^{fg}	2,63 ± 0,33 ^a	0,24 ± 0,07 ^{hi}	0,78 ± 0,38 ^h	nd	5,06 ± 0,54 ^a	0,41±0,12 ^{cde}	0,95± 0,13 ^{fg}
F2	22,21±3,31 ^f	5,83±0,83 ^{bc}	2,07±0,25 ^g	32,90±20,6 ^{ef}	1,88±0,28 ^{bcd}	0,44±0,09 ^{gh}	3,84±0,63 ^{cd}	0,87±0,30 ^f	1,50 ± 0,24 ^{ef}	0,07±0,02 ^h	0,68±0,17 ^g
F3	19,41 ±1,91 ^g	6,84±0,51 ^a	2,38 ± 0,27 ^g	40,01±3,86 ^{de}	1,78±0,13 ^{bcd}	0,35±0,07 ^{ghi}	4,59 ± 0,75 ^{bc}	1,76± 0,31 ^e	0,94 ± 0,48 ^{gh}	0,08±0,03 ^h	0,76±0,15 ^{fg}
F4	12,42±2,62 ^g	2,85±0,32 ^{fgh}	4,82 ± 0,27 ^d	47,00±4,09 ^{cd}	1,36±0,22 ^d	0,55±0,03 ^{efg}	4,58 ± 0,47 ^{bc}	0,41±0,20 ^f	nd	0,24 ± 0,07 ^g	nd
F5	45,80±4,75 ^e	1,31 ± 0,18 ⁱ	1,14± 0,23 ^h	39,10±3,45 ^e	1,74±0,19 ^{bcd}	0,16± 0,06 ⁱ	3,92±0,38 ^{bc}	1,83±0,39 ^e	3,67 ± 0,31 ^b	0,33±0,04 ^{defg}	1,31±0,17 ^{cde}
F6	88,51±4,50 ^a	2,04±0,38 ^{ghi}	4,64±0,31 ^{de}	47,00±3,21 ^{cd}	2,43±0,23 ^a	0,63±0,08 ^{cde}	1,83±0,39 ^{fg}	3,22±0,35 ^{bc}	1,38 ± 0,26 ^{fg}	0,56±0,04 ^{bc}	1,79±0,18 ^c
F7	76,30±3,33 ^b	1,63±0,17 ^{ij}	3,28±0,30 ^{ef}	68,12±7,04 ^b	2,17± 0,31 ^a	0,80±0,14 ^c	4,71±0,42 ^{ab}	3,02±0,64 ^{bc}	2,44 ± 0,16 ^c	0,38±0,05 ^{efg}	2,92±0,49 ^a
F8	87,40±5,26 ^a	1,81±0,68 ^{ghij}	3,29±0,32 ^f	51,50±4,35 ^c	2,46±0,27 ^a	1,64±0,23 ^a	2,91±0,47 ^{def}	3,32±0,97 ^{bc}	2,81±0,17 ^c	0,47±0,08 ^{cd}	1,43±0,06 ^{cd}

Composés phénoliques : Gal : Acide gallique ; Cat : Catéchine ; Epiat : Epicatéchine ; Ellag : Acide éllagique ; chl: Acide Chlorogénique ; Caf : Acide cafféique ; p-cou : Acide p-coumarique ; Fer: Acide Férulique ; Que : Quercétine ; Phl: Phloridzine ; Rut : Rutine. nd : non détecté. L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'automne. Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres (a-h) ne sont pas significativement différentes à (P<0,05).

I.3.9. Détermination de l'activité antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante des jus, mesurée par les trois méthodes différentes DPPH, FRAP et le test ABTS, sont affichés dans la figure 25.

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH est couramment utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres. Le degré de décoloration d'un extrait traduit le potentiel de piégeage d'antioxydant. Dans cette étude, les différences d'activité antioxydante entre cultivars de grenade sont statistiquement significatives. Les valeurs se situent entre 31,16 % à 66,82 % pour les cultivars locaux et entre 45,65 % et 76,3 % pour les cultivars étrangers. Lorsque la valeur est élevée, la capacité antioxydante totale est élevée. Les cultivars sont classés comme suit en se basant sur les valeurs du DPPH F2>F4>L2>L5>F5>F1>L8>L6>F6>L1>F7>L10>F3>L7>F8>L3>L4>L9. Nos résultats sont en accord avec les valeurs réalisées par Tezcan et al. (2009) sur les sept jus commerciaux de grenade de la Turquie, qui se situent entre 10,37 à 67,46%, tous ces produits étaient 100 % pur de jus de grenade et ne contenaient aucun additif. Par ailleurs, vingt jus extraits des arilles de grenades d'Iran ont une activité antioxydante comprise entre 15,59 et 40,72 % (Tehraniyar et al., 2010). Ces différences par rapport à nos résultats peuvent être expliquées par d'autres facteurs comme par exemple la différence entre les cultivars du grenadier ou la méthode d'extraction utilisée dans ces analyses.

Le test FRAP est couramment utilisé pour étudier la capacité antioxydante des plantes. La capacité antioxydante des extraits de fruits est déterminée par la capacité de leurs molécules antioxydantes à réduire les ions ferreux en fer en utilisant le réactif FRAP. Ce réactif contient du 2,4,6-tris(1-pyridyl)-5-triazine (TPTZ) dans le tampon acétate de sodium à pH 3,6. La réduction des ions ferreux du réactif FRAP se traduit par la formation d'un produit (Ferrous-TPTZ complex) bleu dont l'absorbance peut être mesurée à 593 nm. Cette méthode a mis en évidence une capacité antioxydante comprise entre 18,49 et 47,1 mM (Fe²⁺)/L pour les cultivars locaux et entre 17,65 et 33,81 mM (Fe²⁺)/L pour les étrangers. Par ailleurs, le classement des cultivars en se basant sur les résultats obtenus par ce test est comme suit L1> L2> L10> F4> L8> F6> F1> L6> F5> L5> L3> F3> L4> F7> F8> L9> L7> F2.

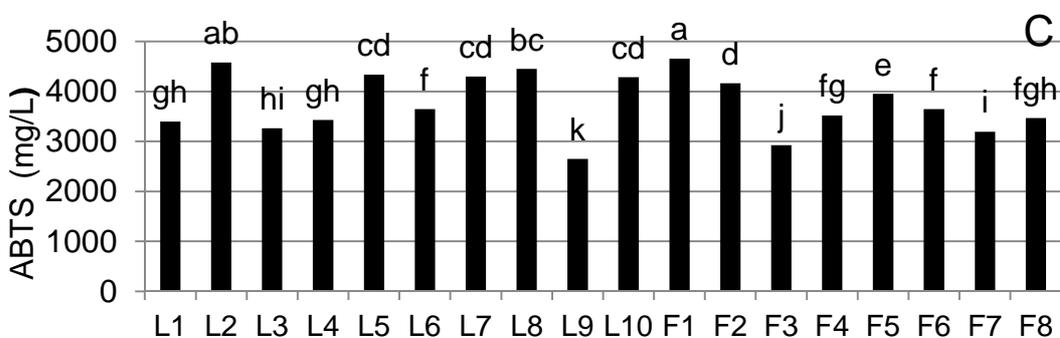
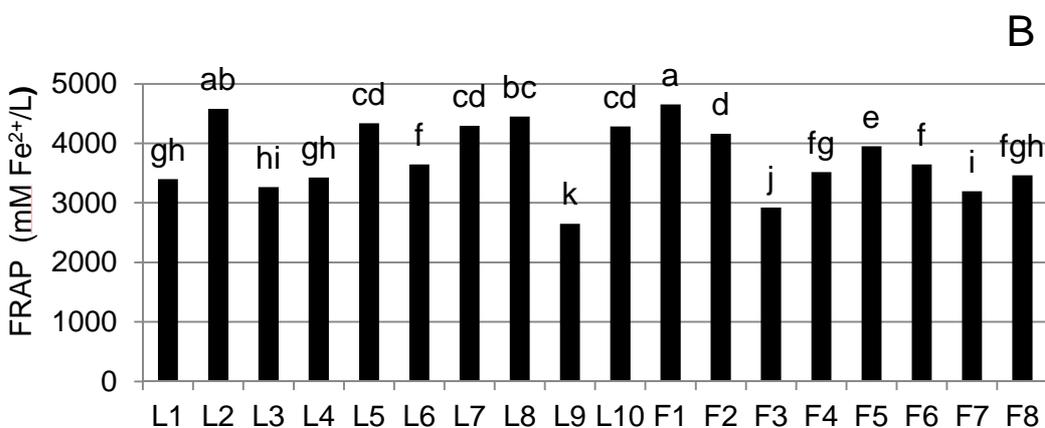
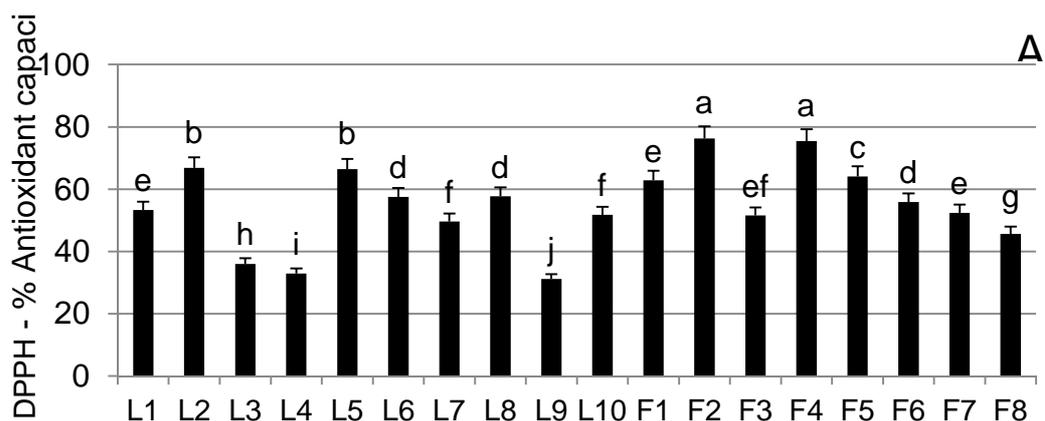


Figure 25. Activité antioxydante des jus de grenade issus des différents cultivars mesurée selon 3 méthodes (A): DPPH.(B): FRAP, (C) : ABTS. L1 : Grenade jaune ; L2 : Grenade rouge ; L3 : Chioukhi ; L4 : Ounk Hmam ; L5 : Gjebali ; L6 : Djeibi ; L7 : Chelfi ; L8 : Bzou ; L9 : Sefri ; L10 : Sefri 2 ; F1 : Gordo de Jativa ; F2 : Negro Monstrioso ; F3 : Wonderful ; F4 : Ruby ; F5 : Dwarf semi Evergreen ; F6 : Mollar Osin Hueso ; F7 : Zherie précoce ; F8 : Zherie d'automne. Les données sont présentées sous forme d'une moyenne \pm écart-type. Le test ANOVA est réalisé sur la base de différences significatives ($p < 0,05$) qui est indiquée par les différentes lettres.

Les valeurs publiées pour le jus de grenade du commerce en Turquie sont plus élevées que les nôtres et s'expliquent par le fait que le jus de grenade commercial est extrait du fruit entier (Tezcan et al., 2009). Gil et al. (2000) ont montré que l'activité antioxydante du jus de commerce était plus élevée que celle mesurée pour le jus élaboré par pressage des arilles manuellement au laboratoire. Ils ont suggéré que le punicalagin, principal composé phytochimique présent dans la peau du fruit contribue à la capacité antioxydante totale du jus de grenade du commerce.

Le TEAC mesure la capacité d'un échantillon à inhiber le radical ABTS^{•+} tout en se référant à un antioxydant standard (Trolox®). Toutefois, les résultats obtenus sont variés entre 2648 (L9) à 4577 (L2) mg / L pour les cultivars locaux et entre 2923 (F3) et 4653 (F1) mg / L pour les étrangers. L'ordre des cultivars selon cette méthode est présenté comme suivant était F1 > L2 > L8 > L5 > L7 > L10 > F2 > F5 > L6 > F6 > F4 > F8 > L4 > L1 > L3 > F7 > F3 > L9. Nos résultats sont en accord avec les valeurs élaborées par Çam et al. (2009) et qui sont comprises entre (2212 - 4183 mg /L).

Dans cette étude, les valeurs de corrélation trouvées entre anthocyanes totaux et (AA, TEAC, FRAP) sont respectivement 0,157, 0,251 et 0,351. Ainsi, la corrélation entre la composition en antocyanes dépend des méthodes utilisées pour la mesure de l'activité antioxydante. En plus il y'a une corrélation entre la teneur en flavonoïdes et la capacité antioxydante du jus de grenade (DPPH, ABTS et FRAP), elles sont respectivement 0,931, 0,668 et 0,660. Ces corrélations montrent que les flavonoïdes sont considérés parmi les microconstituants qui contribuent à l'activité antioxydante de la grenade. Finalement, la corrélation entre DPPH et ABTS (0,585), FRAP et ABTS (0,415) et DPPH et FRAP (0,304) (significatif à P < 0,05). Cette corrélation pourrait s'expliquer par le même mécanisme que pour les méthodes FRAP, DPPH and TEAC. Ce mécanisme concerne la capacité des antioxydants de réduire certains radicaux (DPPH, ion ferreux et ABTS). Une autre corrélation significative entre polyphénols totaux et la capacité antioxydante (FRAP and TEAC) a été obtenue. Ces corrélations confirment que les composés phénoliques sont les constituants principaux contribuant à l'activité antioxydante de ces fruits.

1.3.10. Analyse en composantes principales (ACP)

L'ACP est un algorithme mathématique qui permet de réduire la dimensionnalité des données tout en conservant la plupart des variations des données de l'échantillon (Jolliffe, 2002).

Tableau 14. Pourcentage de variance cumulée, valeurs propres et définition des axes d'une ACP effectuée sur les cultivars de grenadier à partir des caractéristiques étudiées.

Variables	Premier Axe	Deuxième Axe	Troisième Axe
Poids du fruit	0,638	-0,029	0,127
Diamètre du fruit	0,247	0,027	0,086
Longueur du fruit	0,255	-0,024	0,076
Diamètre du calice	0,098	-0,095	-0,054
Longueur du calice	0,167	-0,026	-0,217
Poids de l'écorce	0,177	-0,116	0,069
Epaisseur de l'écorce	-0,247	-0,477	0,881
Poids de la graine	0,089	0,290	-0,083
Longueur de la graine	0,061	0,307	-0,023
Diamètre de la graine	0,135	0,254	-0,102
Poids du pépin	0,220	-0,144	0,109
Longueur du pépin	0,203	0,102	0,193
Dimètre du pépin	0,248	-0,082	0,039
pH	0,891	-0,038	0,186
°Brix	-0,241	-0,478	0,792
Acidité titrable	-0,142	0,178	0,188
Indice de maturité	0,134	-0,144	-0,155
Pourcentage d'humidité	-0,033	-0,180	-0,276
Polyphénols totaux	0,786	-0,239	0,159
Anthocyanes totaux	0,223	-0,854	0,561
Tanins hydrosolubles	-0,194	-0,233	0,774
Tanins condensés	-0,122	0,989	0,469
AA (%)	0,615	-0,045	0,236
FRAP	0,337	0,768	0,122
TEAC	0,506	0,139	-0,306
Protéines totaux	0,313	-0,299	0,093
Rendement en graines	0,083	0,052	0,252
Rendement en jus	-0,691	0,130	0,309
Rendement en pépins	-0,186	0,023	0,130
Acide gallique	-0,167	0,734	-0,245
Catéchine	-0,133	-0,686	-0,445
Epicatéchine	0,277	0,437	0,758
Acide éllagique	-0,259	0,757	0,453
Acide Chlorogénique	0,198	0,263	-0,593
Acide cafféique	-0,332	0,458	-0,707
Acide p-coumarique	-0,479	-0,365	0,763
Acide Férulique	-0,044	0,097	0,331
Phloridzine	-0,260	0,083	0,030
Quercetine	0,110	0,216	-0,315
Rutine	0,119	0,692	0,437
Valeurs propres	4,04	2,37	1,15
Pourcentage d'inertie cumulative	38,25	64,20	83,07

L'ACP a été appliquée aux valeurs correspondantes aux paramètres analysés des dix-huit cultivars du grenadier. Les valeurs propres et le pourcentage de variance cumulée pour les trois premiers composants principaux sont présentés dans le Tableau 14. Les trois premiers axes de l'ACP absorbent 83,07 % de la variabilité totale, issue de l'ensemble des paramètres d'analyses physicochimiques et biochimiques des fruits, avec une perte de près de 17% de la variabilité. Le premier axe explique, à lui seul, 38,25 % de la variabilité observée entre les cultivars étudiés, il est fortement corrélé positivement aux PF, pH, PT, AA et TEAC et négativement au RJ. Le deuxième axe en représente 25,95 % de la variabilité observée, il est corrélé positivement avec les variables d'origine : TC, FRAP, Gal, Cat, Rut et Ellag et négativement avec CAT. Le troisième axe permet d'expliquer 18,87 % de cette variabilité. Il est corrélé aux EE, Epicat et TH et négativement aux Caf et Chl.

Toutefois, une ACP concernant les caractéristiques des feuilles, des fleurs et des fruits appartenant à 30 cultivars provenant de différentes régions de la Tunisie, qui sont considérées comme un centre de diversification du grenadier, a élaboré un taux de variabilité de 49,29 % (Mars and Marrakchi, 1999), tandis que ce taux de variabilité est de 93,34 % lors d'une ACP réalisée sur la composition phénolique et l'activité antioxydante de huit jus extraits des variétés de grenadiers cultivées en Turquie (Çam et al., 2009).

1.3.11. Analyse des groupes

L'analyse de groupe est un ensemble de méthodes statistiques, qui identifie des groupes d'échantillons qui se comportent de façon similaire ou présentent des caractéristiques similaires. Le mécanisme le plus simple consiste à répartir les échantillons à l'aide de mesures qui déterminent la similarité ou la distance entre les échantillons (Sambamoorthi, 2007). L'analyse de groupes, effectuée sur la base des paramètres étudiés, a permis d'identifier quatre groupes. Les résultats obtenus à partir de l'Analyse des groupes sont présentés sous forme de dendrogramme dans la figure 26. Ainsi, le premier groupe est composé de cultivars L10, F2 et F3. Le deuxième groupe contient trois cultivars étrangers (F6, F7 et F8) et trois locaux (L5, L6 et L9). Le troisième groupe regroupe deux cultivars locaux (L1, L3) et un seul étranger (F1). Le dernier regroupe trois cultivars locaux (L2, L4, L7 et L8) et deux clones étrangers (F4, F5). En conséquence, cette étude s'est montrée très utile pour la caractérisation des cultivars et l'étude de la diversité génétique chez le grenadier. L'analyse des résultats fait ressortir une diversité génétique assez importante pouvant être due à l'ancienneté de la culture et aux recombinaisons (résultant de la pollinisation croisée) associées à la

multiplication végétative et sexuée et l'échange non contrôlé du matériel végétal (Mars and Marrakchi, 1999).

Une autre analyse de groupes à la base de 29 caractéristiques liées aux feuilles, fleurs et fruits de 30 cultivars, a laissé voir une large diversité au sein de ces cultivars. Ainsi, ils ont pu distinguer 5 groupes, les deux premiers comportant chacun 4 cultivars, le troisième est composé de 3 cultivars, alors que le quatrième regroupe 12 cultivars et finalement le dernier contient 7 cultivars (Mars et Marrakchi, 1999). Une autre analyse réalisée pour 8 cultivars en Turquie à la base de la composition phénolique et activité antioxydante a laissé voir la formation de 3 groupes, ce qui se traduit par une diversité entre ces cultivars (Çam et al., 2009).

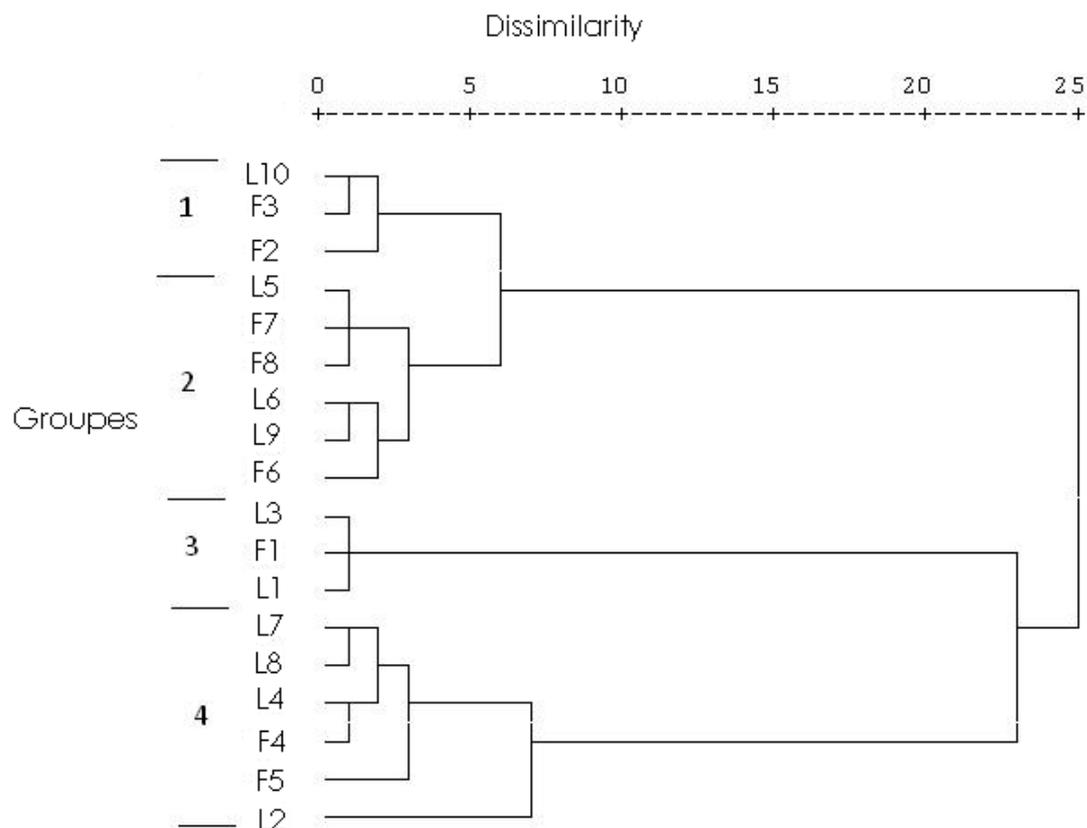


Figure 26. Dendrogramme issu de l'analyse des groupes basée sur les paramètres physicochimiques des cultivars étudiés.

Chapitre II . Etude de la stabilité microbiologique et évolution des composés phénoliques des jus de grenade lors des traitements thermiques

II.1. Généralités

La couleur rouge de la pulpe juteuse de la grenade est due aux anthocyanosides. Toutes les parties du fruit renferment des tanins hydrosolubles, notamment les cloisons internes de la grenade (Afaq et al., 2005). C'est pourquoi le jus commercial de grenade contient davantage de substances antioxydantes que celui extrait à partir des arilles parce qu'il est extrait du fruit entier comprenant ces fameuses membranes internes qui entourent les graines (Tezcan et al., 2009 ; Gil et al., 2000). L'intérêt du jus de grenade pour la santé, par rapport à d'autres jus de fruit, est qu'il a une teneur en "sucre" naturel et modéré, et que ce fruit provient très souvent de culture "raisonnée" avec peu ou pas du tout de pesticides, et un contenu en tanin et anthocyanosides intéressant, mais raisonnable en quantité.

Ainsi, ces fruits peuvent présenter de forts potentiels pour les industries alimentaires comme source de jus ou sous forme d'additif alimentaire, ou encore utilisé dans les industries cosmétique. Ces composés peuvent être affectés par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation comme le pH, la température, l'oxygène, la lumière et l'activité de l'eau (Jackman and Smith, 1996). Afin d'étudier ces phénomènes, il est nécessaire de caractériser certaines propriétés physicochimiques de ces polyphénols et surtout les anthocyanes, telles que leur résistance aux traitements thermiques lors des étapes de pasteurisation et aux changements d'acidité.

Dans ce présent travail, nous avons évalué, la stabilité des anthocyanes des jus de grenade après être soumis à différents traitements thermiques. Et en même temps nous avons suivi l'effet de ces traitements sur la flore microbienne du jus.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Préparations des échantillons

Les échantillons de jus de grenade sont extraits à partir du cultivar Sefri 2 collectionné dans la station Expérimentale, Meknès-Maroc. Ce cultivar est choisi dans cette partie du fait qu'il est cultivé dans plus de 70% des

plantations au Maroc (INRA de Béni Mellal, 2012). L'importance accordée à ce cultivar est expliquée par sa saveur sucrée, ses pépins tendres, son écorce épaisse ce qui permet sa conservation pour de longues durées par rapport à d'autres cultivars, ainsi que son transport en toute sécurité.

Les fruits ont été pelés et les membranes recouvrant les graines ont été enlevées manuellement. Le jus est obtenu à partir des arilles des grenades par presse mécanique. Trois répétitions sont réalisées pour chaque analyse.

II.2.2. Pasteurisation des jus

La pasteurisation du jus est réalisée par immersion dans un bain-marie chauffé après conditionnement à froid en bouteilles de verre de 150 mL, stérilisées à l'avance. La température du produit est suivie au cours du temps au centre d'une bouteille témoin à l'aide d'un thermomètre (Checktemp 1, Hanna instruments) possédant une gamme de lecture comprise entre - 50 °C et + 150 °C avec une précision de $\pm 0,2$ °C. Après l'application d'un barème préalablement choisi, les bouteilles ont été refroidies sous courant d'eau froide. De différents traitements sont utilisés: 65, 77 et 95 °C pendant 30 et 60 s. Le choix de ces trois températures est basé sur le barème de la pasteurisation des jus ayant un pH inférieur à 4,5 (65°C pendant 30 min ; 77°C pendant 1 min), tandis que pour la troisième température 95 °C est basé sur des études récentes qui ont étudié l'effet thermique sur le jus de grenade (Mena et al., 2013).

II.2.3. Analyse microbiologique

Au cours de la préparation des dilutions, les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH, mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu : ainsi la plupart des entérobactéries sont "tuées" en quelques heures dans de l'eau distillée.

Actuellement il paraît souhaitable de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel, car il permet, dans les conditions particulières (température, temps), de réaliser une revivification des microorganismes (Cuq, 2004). Ensuite tous les diluants préparés sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Le dénombrement des germes totaux (ou flore totale ou germes aérobies mésophiles neutrophiles) concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles après 72 h d'incubation à 30°C en utilisant le milieu de culture PCA.

- **Méthodologie**

1 ml de la suspension mère et de ses dilutions est ensemencé dans des boîtes de pétri stériles, ensuite le milieu gélosé de dénombrement (PCA) est coulé (15 ml de milieu en surfusion à 45-47°C). Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes entre la préparation de la suspension mère et ses dilutions et le moment où la gélose est coulée. Le nombre de colonies développées est déterminé à l'aide du compteur de colonies.

II.2.4. Caractérisation chimique

II.2.4.1. Détermination des polyphénols totaux et anthocyanes totaux

Les polyphénols totaux (PT) sont déterminés en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965)(chapitre I paragraphe I.2.6), et les anthocyanes totaux sont mesurés par la méthode de Lako et al. (2007) chapitre I paragraphe I.2.8).

II.2.4.2. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante du jus de grenade est déterminée par la méthode de DPPH proposée par Brand-Williams et al. (1995) et détaillée dans le chapitre I paragraphe I.2.12.1.

Toutes les analyses sont traitées par Statistical Analysis System (SAS) SAS 917 Instituto Cay NC (USA). En utilisant une analyse de variance (ANOVA) et différences entre les moyennes ont été déterminées pour signification à $P < 0,05$ en utilisant la procédure GLM PROC.

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Analyse microbiologique

L'effet thermique sur l'inactivation microbienne comparé, au jus non traité est présenté sur le tableau 15. Après le traitement à 77°C, il y a eu une inactivation significative avec une réduction de 4,7 log UFC/ mL. Toutefois, le traitement à 95°C provoque une inactivation microbienne totale. Dans une étude antérieure, un traitement de 80°C pendant 30 et 60 secondes a permis de signaler une réduction de 4,5 log UFC/ mL (Mena et al., 2013).

Une différence de réduction bactérienne due aux périodes de traitement est aussi signalée. Le taux microbien initial du jus frais extrait des arilles varie de 3,0-5,63 log UFC/ mL (Alighourchi et al., 2008 ; Mena et al., 2013). Cependant, les valeurs obtenues dans cette étude sont plus élevées que celles obtenues en littérature.

Ainsi, L'analyse microbiologique à 77°C et à 95°C sont efficace pour la réduction ou l'inactivation totale des microorganismes après la pasteurisation. Leistner (1999) a montré qu'un traitement de 65°C pendant 30 s engendre un nombre de micro-organismes moins de 1,78 log UFC/ mL ce qui cause ainsi leurs incapacités de croître dans le jus de grenade réfrigéré. Donc, nos résultats concernant le traitement à 65 °C pendant 30s se trouvent au-dessous de 1,78 log UFC/ mL. Donc pour une bonne préservation du jus il est indispensable de passer à une durée du traitement de 65 °C/ 60 s qui donne une valeur de (1,72 log UFC/ mL).

En outre, un traitement modéré de 71,1 °C durant 3s a permis l'inactivation de 5,0 log UFC/ mL des bactéries pathogène sous forme végétative telle que Salmonella et Listéria monocytogène dans les jus de fruits (Mazzotta, 2001). En revanche, un processus de stabilisation microbiologique cause généralement une diminution des arômes et dégradation de la valeur nutritive du produit.

Tableau 15. Effet du traitement thermique sur la réduction microbiologique des jus de grenade.

Traitement	Bactéries aérobies totaux (log UFC/ mL)
Aucun traitement	5,71 ± 0,12 ^a
65°C 30s	2,02 ± 0,34 ^b
65°C 60s	1,72 ± 0,28 ^{bc}
77°C 30s	1,53 ± 0,15 ^{bc}
77°C 60s	1,18 ± 0,07 ^c
95°C 30s	0,00 ± 0,00 ^d
95°C 60s	0,00 ± 0,00 ^d

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart- type. Les lettres qui suivent les valeurs sont différentes statistiquement à (P<0,05).

Ainsi, et afin de produire un jus frais ayant une bonne qualité sanitaire, il faut être très exigeant en ce qui concerne l'hygiène lors de sa préparation et son stockage. Ainsi, un niveau qui dépasse 6 log UFC/ mL peut être dû à l'utilisation des fruits détériorés ou non nettoyés ou aussi à des équipements

contaminés. Donc, la plupart des contaminants existants sur la surface des fruits peuvent être éliminés par l'application des bonnes pratiques d'hygiène.

II.3.2. Caractérisation chimique

Le tableau 16 présente les résultats obtenus pour la teneur en polyphénols totaux (PT), la composition en anthocyanes totaux (CAT).

II.3.2.1. Composition en polyphénols totaux

D'après cette étude, la dégradation thermique des composés phénoliques du jus de grenade est minime et ne révèle aucune différence significative entre les différents traitements. Nos résultats sont en accord avec ceux de Fischer et al., (2013). Par conséquent, cette réduction minime ne va pas influencer les bénéfices sanitaires connus de la grenade qui sont entre autres basés sur le potentiel antioxydant du punicalagine et de l'acide ellagique qui ne sont pas très affectés par les traitements thermiques.

Tableau 16. Effet du traitement thermique sur les caractéristiques chimiques et l'activité antioxydante du jus de grenade.

Traitement	PT (mg/L)	CAT (mg/L)	AA(%)
Aucun	4544,19 ± 23,00	155,16 ± 3,34	50,36 ± 4,03
65 °C 30 s	4535,23 ± 15,12	153,56 ± 12,09	51,37 ± 5,23
65 °C 60 s	4526,45 ± 12,03	154,00 ± 16,00	49,54 ± 1,65
77 °C 30 s	4486,00 ± 27,34	152,98 ± 8,23	48,15 ± 1,09
77 °C 60 s	4463,11 ± 19,09	151,00 ± 2,23	47,73 ± 2,58
95 °C 30 s	4452,21 ± 31,00	150,78 ± 7,45	55,43 ± 1,15
95 °C 60 s	4435,52 ± 18,23	148,45 ± 10,65	56,08 ± 2,65

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart- type. Les valeurs suivies des mêmes lettres (a-h) ne sont pas significativement différentes à (P<0,05).

Fischer et al. (2013) ont montré que la teneur en polyphénols totaux, tandis que Mena et al., 2013 ont reporté que l'effet de la pasteurisation est non significatif. Cependant, une variation mineure qui varie entre 3004,7 et 4070,0 mg GAE/ L, en plus ils ont montré qu'une dégradation des composés phénoliques n'a pas entraîné une importante diminution en teneur de polyphénols totaux.

II.3.2.3. Composition en anthocyanes totaux

La CAT est dépendante à différents facteurs parmi lesquels, il y'a la lumière, l'oxygène, la température, les constituants de la matrice alimentaire et leurs produits de dégradation, qui peuvent affecter l'intégrité des pigments (Sadilova et al., 2009)

La CAT a eu une diminution relative en fonction de la durée du chauffage aux différentes températures (60, 77 et 95). Les différences entre les 3 traitements sont aussi insignifiantes à 65, 77, 95 °C. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Fischer et al. (2013) qui ont étudié l'effet des traitements thermiques (60, 70, 80, 90 °C) sur la CAT, ainsi selon cette étude la dégradation thermique des anthocyanes purifiées contenues dans les jus de grenade suit une réaction cinétique d'ordre 1.

Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures qui ont démontré également une réaction cinétique de dégradation des anthocyanes dans des systèmes modèles et des systèmes alimentaires réels (Singleton et al., 1999). Toutefois, Mena et al. (2013) ont trouvé qu'après la pasteurisation, la CAT augmente de 10 % pour le traitement 65°C et de 56 % pour les traitements 80 et 95 °C, ceci est expliqué par l'effet de la chaleur qui peut entraîner la conversion des leucoanthocyanes incolores à des anthocyanes ayant la couleur rouge, sous les conditions acides. Sadilova et al. (2009) ont suggéré aussi que la formation de complexes avec d'autres composés phénoliques peut entraver la dégradation des anthocyanes en réduisant la quantité de formes incolores.

La dégradation des anthocyanes est corrélée avec une perte visuelle notable de la couleur rouge des jus étudiés. Après le traitement thermique, la couleur passe du rouge plus intense pour le traitement assez modéré (65-77°C), au rouge clair pour le traitement 95 °C.

II.3.3. Détermination de l'activité antioxydante

Les résultats de l'activité antioxydante sont aussi montrés dans le tableau 17. La capacité antioxydante est légèrement abaissée du fait qu'elle est fortement dépendante du contenu phénolique et aux anthocyanes qui sont légèrement décroissants. Ainsi, les composés bioactifs du jus de grenade qui sont responsables des effets bénéfiques pour la santé ne sont pas affectés, même après un échauffement excessif de longue durée. En plus, la diminution relative de la capacité antioxydante par la dégradation CAT et

les autres composés phénoliques incolores. Toutefois, cette réduction en CAT est compensée par la conversion des leucoanthocyanines incolores lors du chauffage et leur abondance dans les jus.

La présente étude ainsi que les travaux de Fischer et al. (2013) ont démontré la stabilité de longue durée de vie de composés bioactifs du jus de la grenade, même lors d'un chauffage à des températures.

Malgré des pertes de couleur marquée, la qualité des composés bénéfiques est bien conservée après les traitements thermiques utilisés dans cette étude. Par conséquent, l'aspect visuel ne reflète pas adéquatement la rétention et la conservation des composés bioactifs de jus de grenade. Néanmoins, les couleurs stables et attrayantes sont un atout très recherché par le consommateur, ce problème peut être amélioré dans les boissons contenant des pigments sensibles par l'ajout des colorants naturels.

Chapitre III . Clarification enzymatique du jus de grenade

III.1. Généralités

Les jus de fruits contiennent dans des proportions variables des matières complexes telles que les pectines, les composés celluloseux et l'amidon. Ces matières n'ont pas un bon goût, occasionnent des troubles et augmentent la viscosité du jus en diminuant ainsi le rendement obtenu.

La sédimentation dans le jus est difficile à prédire et sa formation crée des problèmes économiques pour le fabricant de jus reliés à des pertes de produits. La formation de sédiments peut être causée par la présence en excès de tanins, de protéines et d'hydrates de carbone (Van Buren, 1992). Ces précurseurs de la sédimentation peuvent provenir du jus, ou être introduits au cours du procédé de production du jus (Van Buren, 1989). Les complexes protéines- polyphénols sont la cause la plus fréquente de turbidité et de sédimentation dans les jus de fruits, le vin et la bière (Siebert, 1999). Il semble que les liaisons hydrogène et/ou hydrophobiques seraient impliquées dans ce processus (Asano et al., 1982).

Cependant, la sédimentation est un phénomène dont les mécanismes ne sont pas encore bien compris. Il est d'un grand intérêt d'améliorer notre compréhension du processus de sédimentation et de développer des méthodes pour améliorer la stabilité des jus clarifiés. Parmi ces méthodes il y a l'utilisation des enzymes spécifiques qui vont casser ces grosses molécules en les transformant en des petites. Le jus résultant est plus clair et moins visqueux, se laisse presser plus facilement, le rendement est plus élevé ce qui est bénéfique notamment pour les industries de production de jus.

La pectinase est une enzyme (catalyseur biologique) qui détruit la pectine. Il s'ensuit une meilleure extraction des arômes, un meilleur rendement en jus ainsi qu'une bonne clarification ultérieure. La pectinase se présente sous forme liquide ou en poudre. Il faut se conformer aux indications du fabricant pour les quantités à utiliser. Trop de pectinase ne sont pas nuisibles, mais c'est du gaspillage.

Ces enzymes sont recommandées dans le cadre du pressurage des petits fruits rouges (cassis, framboise, fraise, raisin...). En effet, dans ce secteur, les jus obtenus après trituration mécanique renferment de grandes quantités de pectine ce qui augmente leur viscosité et diminue d'autant leur susceptibilité à la filtration, ce qui engendre de nombreux problèmes pour les industriels. Le

traitement par les pectinases va faciliter d'une part, l'extraction de la coloration en déstructurant les tissus épidermiques et d'autre part, l'écoulement en cassant la viscosité. Il faut cependant veiller à ne pas trop dégrader la pectine, car les oligomères obtenus risquent d'entraîner par la suite un trouble lors du stockage des produits.

Dawes et al. (1994) ont montré que l'addition d'une protéase acide d'origine fongique au jus de kiwis diminue la turbidité immédiate et retarde la formation de la brume pendant le stockage à froid. De même, dans une autre étude élaborée par Meyer et al. (2001), le traitement des jus de cerise avec une protéase stable en milieu acide, une pectinase et l'acide gallique améliore la clarté de jus de cerise et les niveaux de brume diminuent au cours du stockage à froid. Pour le jus de cassis, il est constaté que les traitements avec certaines protéases acides fongiques ont des effets significatifs sur la clarification du jus et retardent aussi les effets de formation de la brume (Landbo et al., 2006).

Le but de cette étude est d'étudier l'effet de pectinase et de la protéase disponibles commercialement sur la turbidité et la clarté du jus de la grenade. Nous avons ciblé particulièrement un traitement par des enzymes capables de catalyser la dégradation de la structure des protéines et la pectine.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Préparations des échantillons

Les échantillons de jus de grenade sont extraits à partir du cultivar Sefri 2 collectionné dans la station Expérimentale, Meknès-Maroc. Les fruits ont été pelés et les peaux recouvrant les graines ont été enlevées manuellement. Le jus a été obtenu à partir des arilles de grenade par presse mécanique ensuite, il est filtré et centrifugé. Trois répétitions sont réalisées pour chaque analyse.

III.2.2. Clarification expérimentale

Afin de procéder à l'étude de l'effet des enzymes sur la clarté des jus, nous avons pris 150 ml de jus de grenade, mélangé avec de différentes concentrations (0,05, 0,25 et 0,50% v / v) d'enzymes pectinases et de la protéase ainsi qu'avec un mélange de ces deux enzymes. Ensuite, les jus traités aux enzymes sont incubés dans un bain d'eau à 50 °C pendant 2 h. Les

jus de grenade traités aux enzymes ont ensuite été placés dans un bain d'eau bouillante (90°C) pendant 5 minutes pour inactiver l'enzyme. Les jus traités ont été ensuite rapidement refroidis à l'eau froide immédiatement à 25°C, puis analysés au même titre que les jus non traités.

III.2.3. Acidité titrable, pH, matière sèche dissoute et le rapport °Brix/Acidité titrable

L'acidité titrable (AT) a été déterminée par titrage à pH 8,1 avec 0,1 M NaOH et exprimée en grammes d'acide citrique pour 100 ml de jus. Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un pH-mètre numérique (Thermo Orion 3 Star) à 21 °C. La matière sèche dissoute (MSD) est déterminée avec un réfractomètre numérique (Mettler-Toledo GmbH, 30 PX, Suisse) calibré à l'aide d'eau distillée). Les résultats sont exprimés en °Brix à 21 °C. Le rapport entre le total des solides solubles à acidité titrable est aussi calculé.

III.2.4. Détermination de la turbidité

La turbidité du jus a été déterminée à l'aide d'un turbidimètre (Modèle 2100 AN - HACH Company) et les résultats sont exprimés en unités de turbidité néphélométrique (UTN).

III.2.5. Mesure de la Clarté

La clarté du jus obtenu est déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 660 nm en utilisant un spectrophotomètre Safas UV-visible. L'eau distillée a été utilisée comme référence.

III.2.6. Détermination de la teneur en pectine, protéines totaux et les polyphénols totaux

Le dosage de pectines totales dans les échantillons de jus est déterminé selon la méthode décrite par Filisetti-Cozziand Carpita (1991). 0,2 ml de 125 fois le jus dilué a été mélangé avec 20 µl de 4M de l'acide sulfamique solubilisé dans du KOH (pH 1,6) et 1 ml d'acide sulfurique à 96%. Les échantillons ont été chauffés à 80 °C pendant 1 heure. Ensuite, 200 µl du réactif 3-hydroxybiphenyl dilué à 1/50 (p / v) avec de l'acide sulfurique à 80%, ont été ajoutés au mélange et l'absorbance a été mesurée à 525 nm après 5 min. L'absorbance maximale a été enregistrée et la concentration de pectine est exprimée en équivalents d'acide D-galacturonique, en mg / L.

La teneur totale en protéines a été mesurée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) et les polyphénols totaux (PT) ont été déterminés en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965) (ces méthodes sont détaillées dans le chapitre I, paragraphe I.2.6).

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Effet des traitements de la clarification enzymatique sur la turbidité du jus de grenade

Les effets individuels de la diminution de la turbidité due aux traitements par des pectinases et des protéases étaient statistiquement significatifs immédiatement après le traitement à ($P < 0,05$), le tableau 18 montre que les valeurs de turbidité sont principalement dépendantes de la concentration d'enzyme. Une augmentation de la concentration de l'enzyme diminue considérablement la turbidité. La turbidité des jus traités par la pectinase est plus faible que celle de jus traité par la protéase et cela pour toutes les concentrations (0,05, 0,25, 0,50% v/v). Alors que l'échantillon non traité a une turbidité supérieure que le jus clarifié par des enzymes. Il a été précédemment rapporté que le traitement par la pectinase peut entraîner l'augmentation ou la diminution de la turbidité des jus de fruits (Landbo et al, 2006; Siebert, 2006). Ce phénomène peut être lié à un paradoxe: l'attaque enzyme pectinolytique peut donner lieu à deux événements différents (Siebert, 2006):

1. Les pectinases catalysent la dégradation des structures pectiniques ayant un poids moléculaire très élevé en fractions de petites pectines. Les fractions de pectine résultantes sont petites, chargées négativement et elles peuvent être en mesure de rester en suspension et contribuent à accroître la turbidité immédiate en raison d'un effet de dispersion accrue des petites particules par rapport aux plus grandes.
2. Les pectinases agissent sur la couche encapsulant le cœur protéique des particules de pectine en suspension. Cette action se traduit par une agglomération électrostatique de particules de charges opposées qui conduit, dans un premier temps, à une augmentation transitoire de la turbidité et par la suite, entraîne la précipitation du complexe aggloméré réduisant ainsi la turbidité.

Tableau 17. Effets de la clarification enzymatique par une pectinase et une protéase sur les caractéristiques du jus du grenadier.

Paramètres	Jus non traité	Concentration de Pectinase (% v/v)			Concentration de Protease (% v/v)			0.25% Protease/ 0.25% pectinase
		0.05	0.25	0.5	0.05	0.25	0.5	
pH	4,15 ± 0,12	3,82 ± 1,21	3,77 ± 0,53	3,69 ± 0,47	3,87 ± 0,34	3,78 ± 0,61	3,72 ± 0,71	3,74 ± 0,27
°Brix	17,00 ± 3,23	17,40 ± 5,12	17,60 ± 2,13	17,90 ± 1,52	17,20 ± 2,65	17,45 ± 1,53	17,82 ± 1,00	17,50 ± 1,00
Acidité titrable	0,25 ± 0,02	0,34 ± 0,11	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,00	0,34 ± 0,05
°Brix/ Acidité titrable	62,80 ± 4,36	48,23 ± 7,45	53,54 ± 4,56	58,27 ± 5,00	46,28 ± 3,54	53,06 ± 6,04	56,06 ± 5,54	47,05 ± 6,34
Polyphénols totaux	4,42 ± 0,32	4,47 ± 0,23	4,40 ± 0,52	4,32 ± 0,43	4,45 ± 0,27	4,38 ± 0,37	4,32 ± 0,13	4,91 ± 0,28
Pectines totaux	23,72 ± 3,24	23,41 ± 10,12	22,03 ± 1,51	22,33 ± 2,16	21,5 ± 6,61	20,40 ± 1,10	23,63 ± 5,71	21,22 ± 4,30
protéines	2,68 ± 0,18	2,64 ± 0,31	2,57 ± 0,12	2,52 ± 0,32	2,61 ± 0,46	2,51 ± 0,11	2,55 ± 0,12	2,53 ± 0,23
Clarté	0,062 ± 0,001	0,048 ± 0,005	0,032 ± 0,001	0,021 ± 0,003	0,053 ± 0,007	0,041 ± 0,002	0,029 ± 0,001	0,018 ± 0,001
Turbidité	115,32 ± 5,34	70,20 ± 3,65	62,34 ± 11,45	30,33 ± 2,45	72,34 ± 5,56	65,22 ± 1,56	38,45 ± 4,43	32,45 ± 4,67

Les solides solubles totaux sont exprimés en °Brix, l'acidité totale en g d'acide citrique/ 100 mL, les polyphénols totaux en g en équivalents d'acide gallique/ L, les pectines en mg des équivalents d'acide D-galacturonique/L, les protéines en g du sérum albumine bovine/ L, la clarté en absorbance à 660 nm et la turbidité en (NTU). Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.

L'effet du traitement de clarification à la pectinase est alors un équilibre ou plutôt une compétition entre la formation de petites particules en suspension, l'agglomération de structures de pectine de charge opposée et la précipitation spontanée des dernières structures. En se basant sur les théories ci-dessus, l'influence du traitement de clarification à la pectinase sur la turbidité immédiate de jus semble donc dépendre de la nature des particules de pectine en suspension, de la composition et de la structure de la pectine présente notamment dans le jus, par exemple charge et degré de méthylation, degré de polymérisation et la force de liaison aux protéines. Ces propriétés de pectine peuvent varier en fonction des traitements pré-pressé du jus de fruits et son pH. Néanmoins, le fait que le traitement à la pectinase diminue la turbidité au cours du stockage à froid de jus peut être considéré comme une nouveauté au regard de la théorie stipulant que la principale action de la clarification des pectinases est de diminuer la turbidité immédiate en favorisant l'agglomération de particules de protéine-pectine de charge opposée (Grassin and Fauquembergue, 1996).

Ainsi, une autre étude réalisée sur les jus de cassis a montré qu'il est probable que les interactions de protéine-pectine peuvent également influencer le développement de la turbidité pendant le stockage à froid des jus (Landbo et al., 2006), même si la principale cause de la formation de la turbidité dans le jus peut être le résultat d'interactions entre protéines et polyphénols (Siebert, 2006).

Le résultat de l'effet de clarification du traitement à la protéase sur turbidité immédiate des jus de grenade pourra éviter le problème de formation des sédiments lors de son stockage. L'hydrolyse catalysée par les protéases des protéines du jus de grenade est supposée empêcher essentiellement la formation de complexes protéine-polyphénol au cours du stockage à froid. Il était particulièrement intrigant que l'ajout de la protéase au jus de grenade ait toujours donné un niveau de clarté plus élevé par rapport au jus non traité.

La réduction de la turbidité du jus après le traitement à la protéase peut être le résultat de l'hydrolyse, catalysée par les protéases, des protéines du jus de grenade ayant empêché la formation de complexes entre protéines chargées positivement et les pectines chargées négativement. Cette formation de complexes contribuera par ailleurs à augmenter la turbidité immédiate au moins transitoirement. L'insolubilité et les effets causant la turbidité de ces complexes ou de complexes résultant par exemple de l'association de protéines avec des matériaux cellulaires et/ ou des composés phénoliques peuvent être atténués par l'action protéolytique. La protéase

peut également avoir agi en catalysant par hydrolyse, la dégradation des organites intracellulaires et les membranes cellulaires, comme par exemple le tonoplaste entourant les vacuoles cellulaires ou les extensines formant la paroi de la cellule.

III.3.2. Effet des traitements de clarification sur le jus de grenade

L'effet des différents traitements enzymatiques sur la clarté a été rapporté dans le tableau 17. Les valeurs sont significativement affectées par la concentration de pectinase et de protéase à ($p < 0,05$). Les jus traités par la pectinase et la protéase sont exempts de sédiments et toujours clairs comme l'indiquent les faibles valeurs de l'absorbance à 660 nm. Le jus traité par la pectinase varie entre 0,048 et 0,021 et celui traité par la protéase varie entre 0,053 et 0,029. L'absorbance est plus importante pour le jus non traité. Cependant, la clarté du jus de grenade augmente avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme. Le mélange de ces deux enzymes se traduit par une plus grande limpidité du jus par rapport au jus traité par une seule enzyme. En général, le temps nécessaire pour obtenir un jus clair est inversement proportionnel à la concentration d'enzyme utilisée à température constante, puisqu'une quantité aussi élevée en enzyme induira une réduction du temps du traitement (Kilara, 1982).

III.3.3. Acidité titrable, pH, degré de Brix et le rapport °Brix/Acidité titrable

La discussion qui suit sur les caractéristiques chimiques des jus de grenade non traité et traités avec des enzymes est basée sur les données indiquées dans le tableau 17. Le pH du jus de grenade traité avec la pectinase varie de 3,69 à 3,83, celui traité avec la protéase varie de 3,72 à 3,87 montrant une diminution des valeurs de pH. La diminution du pH est directement liée à l'augmentation de la concentration de pectinase et de protéase. La valeur de la matière sèche dissoute (MSD g / kg) de jus traité à la pectinase et la protéase est plus grande que celle du jus non traité. L'augmentation du degré de Brix est évidente avec l'augmentation de la concentration de pectinase et de protéase. Cette augmentation du ° Brix a été attribuée à un plus grand degré de dégradation des tissus, libérant plus de composants qui contribuent à la solubilité de la matière sèche (Tung-sun, et al., 1995). L'indice de maturité (°Brix/ acide) est la mesure analytique majeure pour la qualité du jus de grenade. Ce rapport entre ces deux paramètres augmente avec l'augmentation de la concentration de la pectinase et de la protéase. L'indice de maturité s'avère en corrélation avec le goût sucré, mais pas aussi

étroitement avec l'arôme (Guyer et al., 1993). L'acidité titrable du jus traité à la pectinase et la protéase est plus élevée que celle du jus non traité (tableau 17), ce qui peut être expliqué par la déestérification enzymatique et la dégradation de la pectine qui entraînent une augmentation de l'acidité totale.

III.3.4. Polyphénols totaux, pectine, et teneurs en protéines

Les analyses des phénols totaux, les niveaux pectine et les teneurs en protéines montrent que ces données analytiques révèlent une baisse constante ou une augmentation des niveaux mesurés des échantillons de jus de grenade traités différemment (tableau 17). La constatation que les niveaux mesurés de phénols totaux, pectine totale et protéines totales sont similaires dans les échantillons non traités ou traités expérimentalement (tableau 17), indique que l'influence des différents traitements de clarification reflète probablement des différences dans la taille et peut-être la forme des molécules provoquant la turbidité et non dans leur teneur totale. La pectine catalysée par l'enzyme et l'hydrolyse de protéines peuvent ne pas conduire à une baisse des niveaux de pectine ou de protéines, mais plutôt à changer leur réactivité via un changement de charges et de taille par dépolymérisation et, en plus dans le cas de la pectine, par déméthylation. Naturellement, les polyphénols de fruits, y compris ceux qui sont présents dans les jus de fruits et des extraits de fruit de grenade, exercent une activité antioxydante (Gil et al., 2000). Cette activité antioxydante a été liée à la prévention des étapes initiales de certaines pathologies liées aux maladies coronariennes, le vieillissement et certains cancers (Benzie, 2000). Il est donc souhaitable de maintenir les niveaux phénoliques les plus hauts possible dans les jus de fruits du commerce.

Chapitre IV. Etude de la stabilité microbiologique en se basant sur la microbiologie prédictive

IV.1. Généralités

La microbiologie prévisionnelle est un outil qui permet de prévoir, par des modèles mathématiques, l'impact de différentes conditions environnementales, de température, de pH, d'activité de l'eau (Augustin et al., 2005 ; Membré et al., 2005), de concentration en acides organiques et en inhibiteurs (Coll Cardenas et al., 2008) et de leurs interactions éventuelles (Augustin and Carry, 2005) sur la croissance, l'inactivation ou la survie des microorganismes (Buchanan and Whiting, 1996). Des modèles spécifiques ont ainsi été développés pour prévoir d'une part la croissance microbienne, et d'autre part la décroissance ou l'inactivation, et ce pour les germes pathogènes (Shimoni and Labuza, 2000) ou pour les germes d'altération (Koutsoumanis, 2009).

Historiquement, ce sont les modèles d'inactivation thermique qui ont été utilisés en premier notamment pour caractériser les barèmes de stérilisation et de pasteurisation. La microbiologie prévisionnelle de croissance s'est ensuite rapidement imposée pour prévoir l'évolution des micro-organismes depuis la fourche jusqu'à la fourchette en intégrant les différentes sources de variabilité et d'incertitude liées à la matière première, aux micro-organismes (Membré et al., 2005), aux différentes opérations unitaires du procès de fabrication, au mode d'emballage et aux divers scénarios thermiques rencontrés par l'aliment jusqu'au consommateur.

Pour cela, la microbiologie prévisionnelle se base sur deux familles de modèles. La première famille est celle des **modèles primaires** qui permettent de simuler le comportement des micro-organismes en fonction du temps et permettent de décrire la courbe de croissance microbienne avec ses quatre paramètres : la contamination initiale (N_0), le temps de latence (lag), le taux de croissance maximal (μ_{max}) et la densité de population maximale (N_{max}) (Ross and McMeekin 2003). Les modèles primaires les plus utilisés à ce jour sont le modèle de Baranyi and Roberts (1994) et le modèle logistique avec délai et rupture proposé par Rosso et al. (1995).

La seconde famille est celle des **modèles secondaires** qui permettent de simuler l'évolution des paramètres du modèle primaire (lag, μ_{max} ou N_{max}) en fonction des conditions environnementales abiotiques telles que la température, le pH, l' a_w , ou biotiques comme la compétition entre différentes

espèces microbiennes (Drosinos et al., 2006) ou encore l'état physiologique de l'inoculum. On distingue généralement deux approches. **L'approche polynomiale** permet de décrire simultanément l'effet des facteurs étudiés et a été très utilisée dans les années 90 (Seman et al., 2002). Cependant, elle présente de nombreux inconvénients : le nombre élevé de paramètres et l'absence de signification biologique, l'impossibilité d'extrapoler les résultats en dehors de la plage expérimentale, l'impossibilité de prendre en compte la variabilité intra-espèce sur la croissance et la nécessité de mettre en place des plans expérimentaux complexes et parfois contraignants. Par opposition à l'approche polynomiale, l'approche progressive consiste à étudier et à modéliser séparément l'impact de chaque facteur environnemental puis à construire à partir de ces modules simples, un modèle général complet incluant l'effet de tous les facteurs. Cette approche d'abord proposée par Zwietering et appelée le concept gamma (Zwietering et al., 1992) présente de nombreux avantages : les modèles sont plus robustes, ils impliquent un nombre de paramètres relativement faibles, et ces paramètres ont le plus souvent une signification biologique (Delignette-Muller et al., 1995).

Différents logiciels sont aujourd'hui disponibles pour accéder à des applications de microbiologie prévisionnelle. **ComBase** qui permet de réaliser des ajustements de modèles primaires ainsi que des simulations en utilisant des modèles polynomiaux. Néanmoins, la base de données ComBase reste assez hétérogène avec des données obtenues majoritairement en milieu de culture.

IV.2. L'intérêt de la prévision en microbiologie alimentaire

La microbiologie prévisionnelle est une discipline qui vise à développer des modèles mathématiques permettant de prévoir les aptitudes de croissance, survie ou décroissance des populations microbiennes dans les aliments en fonction des facteurs environnementaux influents.

La sécurité et la qualité des aliments sont de plus en plus assurées par l'utilisation d'une démarche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) qui cherche à maîtriser systématiquement l'incidence microbiologique de tout ce qui dans la fabrication peut contribuer à la contamination, à la destruction ou à la multiplication des contaminants.

Cette démarche est facilitée si l'on est capable de modéliser le devenir des microorganismes. Cette méthode permet donc de répondre aux questions suivantes :

- Comment concevoir et fabriquer un produit offrant toute sécurité ?
- Comment modifier la composition d'un produit pour éviter un développement microbien indésirable sans nuire à la qualité nutritionnelle ?
- Quel niveau de contamination, quel facteur de multiplication peut-on tolérer aux différents points de la chaîne ?

Cette prévision est basée sur un modèle, c'est-à-dire un système établissant une correspondance entre un ensemble de conditions et une cinétique d'évolution de la population microbienne significative (Bourgeois, 1996).

IV.3. Principe de la méthode

La microbiologie prévisionnelle permet de construire une courbe de croissance microbienne qui dépend d'un ensemble de facteurs, ce qui donne la possibilité de relier directement l'intensité de ces facteurs à la courbe. Cependant, cela reste un peu difficile, car la courbe dépend de paramètres caractéristiques qui dépendent eux-mêmes de facteurs différents selon des lois différentes. Pour cela il est préférable donc d'exprimer ces paramètres en fonction de leurs facteurs déterminants.

IV.4. Démarche de la modélisation

IV.4.1. Identification des paramètres limitant de la conservation du produit

Afin de déterminer une date limite de consommation (DLC), il faut déterminer ce qui limite la durée de conservation de cette sécurité et/ou cette qualité. Il faut donc répondre aux questions suivantes :

- Quel est ou quels sont les microorganismes qui limitent cette durée ?
- Quels sont les niveaux à ne pas dépasser ?

Par exemple, il ne faut pas dépasser 100 listérias par gramme d'aliment à la DLC (Bourgeois, 1996).

IV.4.2. Délimitation du champ de l'expérimentation

Elle procède en trois étapes :

- Sélection des facteurs à prendre en compte grâce à des données bibliographiques. On trouve notamment la température, le pH, l'activité de l'eau (a_w), la présence d'inhibiteurs...

- Détermination pour chaque facteur de la gamme des valeurs permettant la multiplication. Par exemple, pour *Listeria monocytogenes*, la croissance est possible entre 1 et 42°C.
- Délimitation de l'étendue de variation possible dans les produits alimentaires. Plus le champ expérimental sera étroit et plus le modèle sera précis (Bourgeois, 1996).

IV.4.3. Planification de l'expérimentation

Pour chaque facteur, il faut par exemple décider du nombre de niveaux à tester, de la distribution de ces niveaux (progression arithmétique ou géométrique), du choix des combinaisons de facteurs (plans expérimentaux), des répétitions éventuelles.

IV.4.4. Recueil des données

Pour chaque ensemble de conditions retenues, on inocule un milieu de culture ajusté à ces conditions et on mesure l'évolution de la concentration microbienne en fonction du temps de façon à tracer une courbe de croissance.

Et en ce qui concerne l'inoculum sera constitué de l'espèce microbienne considérée. En général, on ne réalise pas de cocktail de souches, mais plutôt plusieurs expérimentations mettant en œuvre des souches différentes. De plus, on choisit des microorganismes en pleine activité ou au moins aussi actifs que dans l'aliment considéré. Enfin, la concentration microbienne à inoculer dépend de la méthode utilisée pour suivre la croissance.

Enfin, un dénombrement classique sur milieu gélosé est encore très utilisé. Cependant, cette technique se révèle longue et fastidieuse. Deux méthodes automatiques se développent actuellement : la turbidimétrie et l'impédancemétrie. Cependant, elles présentent deux inconvénients importants :

- Elles imposent des contraintes lourdes au choix du milieu (transparence, composition ionique).
- Ce ne sont pas des méthodes de dénombrement : elles mesurent un paramètre de culture ayant un lien avec la concentration microbienne.

IV.4.5. Modélisation

Il s'agit, à partir des données expérimentales, de construire un modèle établissant un lien entre condition expérimentale et croissance de façon à permettre la prévision. Le modèle doit pouvoir être défini par un nombre limité de paramètres, de préférence le temps de latence (λ), le taux de croissance exponentielle (μ) et éventuellement le maximum (A).

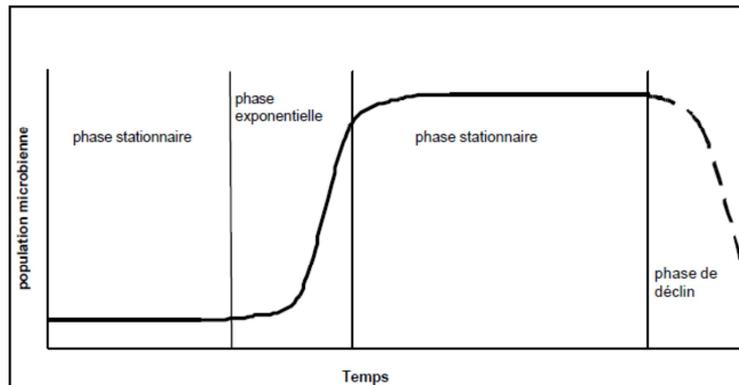


Figure 27. Les différentes phases de la croissance microbienne

Actuellement, il est utilisé deux types de modèle pour décrire une cinétique de croissance dans des conditions données :

- Le modèle de Gompertz modifié : c'est un modèle purement empirique, qui ajuste en général les données de croissance observées de manière satisfaisante. Cependant, il présente un certain nombre d'inconvénients (surestimation du taux de croissance, l'ajustement ne peut être réalisé que si la cinétique de croissance est suivie jusqu'à la phase stationnaire...). Ce modèle forme une sigmoïde sur le logarithme de la densité de population microbienne et permet d'intégrer ainsi les phases 1 et 2 de la croissance :

$$\ln(x/x_0) = \ln(x_{\max}/x_0) \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max}}{\ln(x_{\max}/x_0)}(l - t)\right)\right)$$

- Le modèle de Barany, qui ajuste très bien les données de croissance généralement observées, est un peu moins empirique. De plus, il ne présente pas les inconvénients du modèle précédent.

IV.4.6. La validation

Elle se réalise à deux niveaux :

- La validation mathématique qui consiste à vérifier que les écarts entre les valeurs théoriques prévues par le modèle et des données obtenues dans les conditions qui ont servi à le construire ne sont pas excessifs.

- La validation dans des produits qui consiste à vérifier que les écarts entre les valeurs théoriques prévues par le modèle construit à partir des données obtenues en conditions expérimentales et les valeurs réelles obtenues sur des produits industriels contaminés naturellement ne sont pas excessifs.

Si le modèle a été validé, il peut être utilisé pour la prévision, à condition de se limiter, pour ce qui concerne la variation des facteurs, à la gamme des valeurs comprises entre les valeurs qui ont fait l'objet de la validation. Il faut éviter l'extrapolation et être conscient des risques qu'on prend en la pratiquant. L'extrapolation est impossible à cause du caractère empirique des modèles construits (Bourgeois, 1996).

IV.5. Matériel et méthodes

IV.5.1. le matériel utilisé

Les échantillons de jus de grenade sont extraits à partir du cultivar Sefri 2 collectionné dans la station Expérimentale, Meknès-Maroc. Une fois les fruits sont lavés et pelés, les graines sont séparées manuellement de l'écorce, ensuite, le jus est extrait à partir des arilles à l'aide d'une presse mécanique. L'extrait est ensuite centrifugé afin d'éliminer la pulpe, conditionné dans des bouteilles stériles et enfin pasteurisé à 77°C pendant une minute puis refroidi à 4°C.

Le jus de grenade a un pH bas et égal à 4,15 ce qui rend ce jus à l'abri d'une grande partie de la contamination microbienne. Ainsi, on note qu'un traitement thermique à 72°C durant 6 secondes est jugé efficace contre *E. coli* (Erik, 2005). De plus, si on augmente le temps du traitement à 15 secondes, on pourra garantir plus de salubrité au jus (pH inférieur à 4,5) (Erik, 2005).

La teneur en acide que l'on peut titrer dépend très fort de la variété et du degré de maturité des fruits utilisés et subit des variations extrêmes. Ainsi, selon Cemeroglu et al. (1992), la période de la récolte a une forte influence sur le rapport Brix/acide, étant donné que la teneur en acide diminue de 20 à 50 % dans les 6 dernières semaines avant la récolte tandis que la teneur en substance sèche (Brix) reste relativement constante (Hernandez et al., 1999).

IV.5.2. Outil informatique « ComBase »

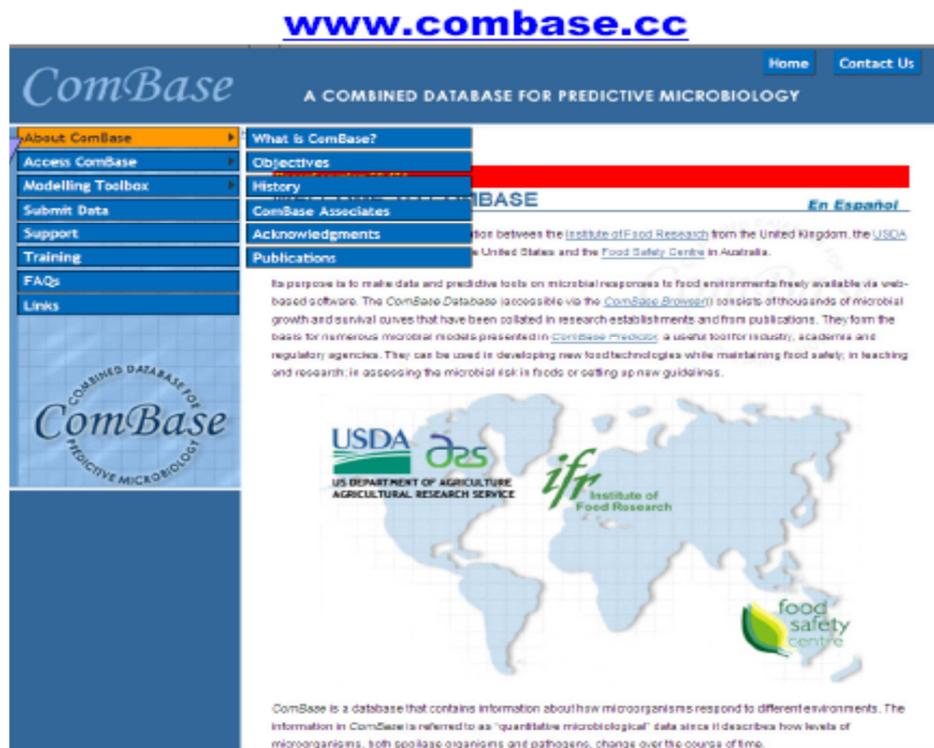
Les progrès de la microbiologie prédictive s'appuient sur les données disponibles qui décrivent le comportement des microorganismes dans différentes matrices environnementales. Pour que ces informations soient utiles à la communauté de la recherche en microbiologie prédictive, les données doivent être organisées de manière à permettre un accès et une récupération efficace. Ici, nous décrivons un protocole qui comprend des observations sur les réponses des bactéries aux environnements alimentaires résultantes d'une base de données (ComBase) à des fins de microbiologie prévisionnelle. Les données incluses dans ComBase ont été obtenues de la coopération des instituts de la recherche et de la littérature et sont accessibles au public via Internet (Baranyi and Tamplin, 1967).

L'Initiative de ComBase est une collaboration entre l'Institut de la Recherche Alimentaire (Institute of Food Research) du Royaume-Uni, l' **USDA**, Service de la Recherche Agricole (Agricultural Research Service) des États-Unis et le Centre de la Sécurité des Aliments en Australie.

www.combase.cc est produit et hébergé par IFR, navigateur ComBase, financé par l'ARS. Il effectue des requêtes pour les dossiers qui correspondent à un certain nombre de facteurs alimentaires et environnementaux, comme la température, le pH et l'activité de l'eau. Toute personne intéressée à l'innocuité microbienne et la qualité des aliments peut explorer ComBase et ses outils associés, sans frais. Grâce à une interface Internet, l'utilisateur définit les critères qui l'intéressent dans un scénario de microbiologie alimentaire. Ceci comprend l'identification du type ou de l'espèce de l'organisme, d'une catégorie d'aliments, pH, température, activité de l'eau (ou la concentration en NaCl) et les conditions alimentaires spécifiques. Alternativement, les clients ComBase peuvent être intéressés par la récupération des données offertes par une source spécifique (publication, l'organisation ou le chercheur).

Les informations, microbiologiquement quantitatives contenues dans ComBase, décrivent comment la concentration de micro-organismes (organismes d'altération et pathogènes à la fois) change au cours du temps. ComBase comprend des milliers de courbes de croissance microbienne et des courbes de survie qui ont été rassemblées dans les établissements de la recherche et publication. Elles forment la base de nombreux modèles présentés dans *ComBase Predictor*, un outil utile pour l'industrie, les universités et les organismes de réglementation. Elles peuvent être utilisées dans :

- Le développement de nouveaux produits alimentaires ;
- Des technologies tout en maintenant la sécurité alimentaire;
- L'enseignement et la recherche;
- L'évaluation des risques microbiologiques dans les aliments ou la mise en place de nouvelles lignes directrices.



IV.5.2.1. Boîte à outils de modélisation

La boîte à outils de modélisation est un ensemble de logiciels basés sur les données ComBase pour prévoir la croissance ou l'inactivation des microorganismes. Actuellement disponible, c'est un outil prédictifs comprenant deux applications en ligne:

ComBase Predictor : un ensemble de 23 modèles de croissance et 6 modèles de la mort thermique. La majorité de ses modèles prédisent la croissance / survie d'agents pathogènes d'origine alimentaire en fonction de la température, le pH et la concentration en sel. Mais dans certains cas, l'effet d'un quatrième facteur additionnel de l'environnement, tel que la concentration de dioxyde de carbone ou des acides organiques sont aussi modélisés.

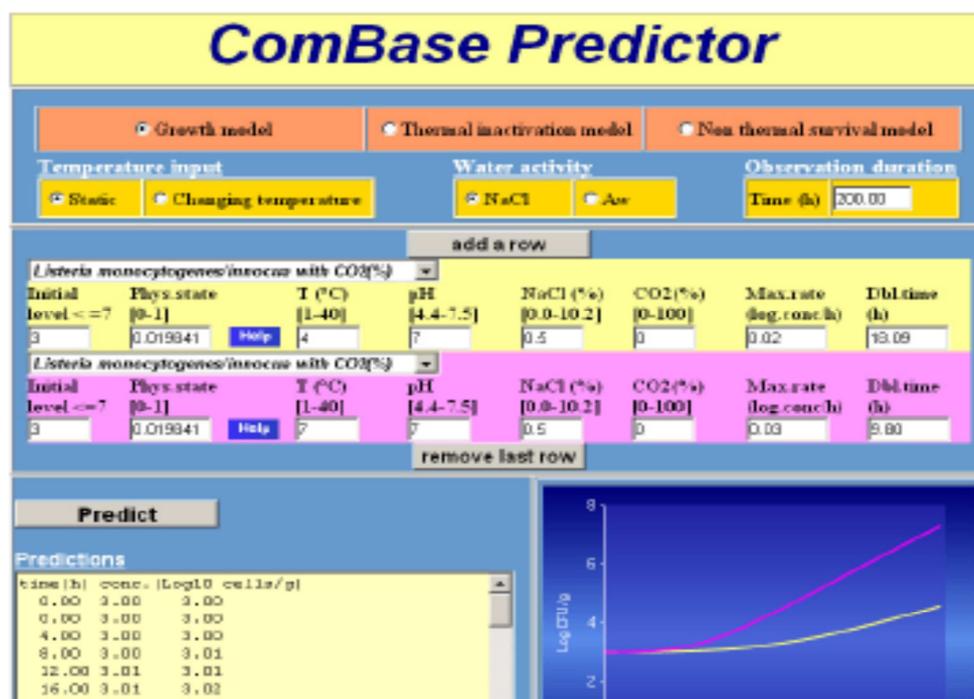
ComBase Predictor peut produire simultanément des prédictions pour un maximum de quatre microorganismes. Il est également capable de prédire

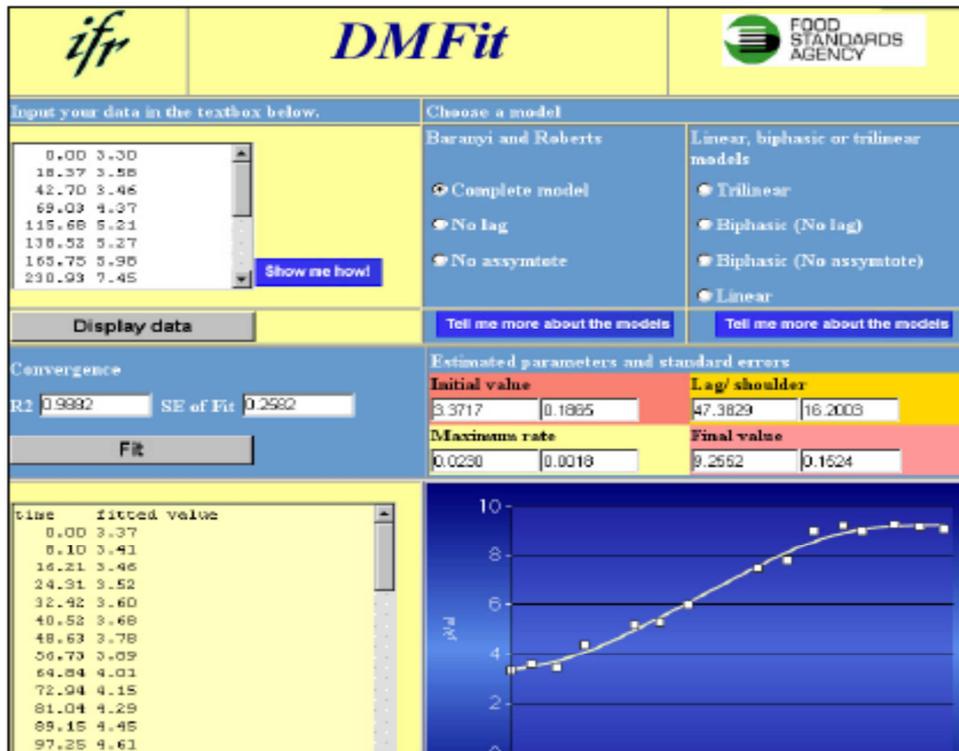
la réponse des bactéries aux environnements à température dynamique. Ceci est particulièrement utile lorsque les changements dans la température de stockage sont connus.

Perfringens Predictor : est un outil convivial de l'utilisateur au point pour permettre une prévision précise, grâce à la simulation, de la réponse de *C.perfringens* au cours du processus de refroidissement, pour les viandes cuites en vrac. L'utilisateur peut désormais saisir le pH de la viande et la concentration en sel.

La boîte à outils de modélisation comprend également **web DMFit-édition** , une application web permet à l'utilisateur de :

- Voir une représentation graphique de la croissance microbologique / données de survie.
- Obtenir des estimations des paramètres pour :
 - Taux de mortalité de croissance maximale ;
 - Le temps d'attente (ou de l'épaule) ;
 - Le nombre de cellules initiales ;
 - Le nombre de cellules finales ;
 - Estimation standard des erreurs sur ces paramètres (Drosinos et al., 2006).





IV.5.2.2. Outils de modélisation intégrée dans le navigateur ComBase

Pour les enregistrements ComBase on dispose des options suivantes:

- **Comparer avec la prévision** : comparer les différents enregistrements de données avec ComBase -cas scénarios les plus pessimistes sur la base de bouillon pure prédiction du modèle de la culture.
- **Monter les données** : ajuster les données de ComBase à l'un des 5 modèles différents du formulaire et obtenir des temps de latence et de taux de croissance.

En outre, les paramètres impliqués par ce modèle, tels que, le pH, l' a_w et la température. Ces paramètres ont une forte influence sur la croissance, l'inactivation ou la survie des microorganismes. Des modèles spécifiques ont ainsi été développés pour prévoir d'une part la croissance microbienne, et d'autre part la décroissance ou l'inactivation, et ce pour les germes pathogènes (Shimoni and Labuza, 2000) ou pour les germes d'altération (Koutsoumanis, 2009).

IV.5.2.2.1. Barèmes de pasteurisation

La pasteurisation réduit de manière significative le nombre de microorganismes dans le produit pasteurisé, mais certaines formes résistent comme les spores. Lors de la pasteurisation, le seuil de thermorésistance des bactéries

pathogènes et de celles qui causent la détérioration des aliments est dépassé (Bazinet and Castaigne, 2011).

Le tableau 18 représente quelques exemples de barèmes de températures pouvant être utilisés afin d'assurer la pasteurisation des jus de fruits dont le pH est inférieur à 4,5 (cas du jus de grenade).

Tableau 18. Exemples de barèmes de températures (Bazinet and Castaigne, 2011)

Produits	Température de pasteurisation	Durée du traitement
Jus de fruit (pH inférieur à 4,5)	77	1 minute
	88	15 secondes

Ainsi, suite à ces données, on a choisi d'appliquer le barème 77°C durant une minute au jus de grenade « *Punica granatum* » afin de le pasteuriser. Il faut signaler aussi que les jus sont mis, avant d'être pasteurisés, dans des bouteilles préalablement stérilisées.

IV.5.2.2.2. Le pH

Le pH est un sigle signifiant potentiel hydrogène et qui représente la mesure de l'alcalinité en chimie. Le pH mesure la concentration d'une solution aqueuse en protons (H⁺) et le degré d'acidité ou de basicité d'une solution. Le pH se calcule selon la formule $pH = -\log_{10} [H^+]$ où [H⁺] est la concentration en ions H⁺ exprimée en moles par litre. En solution aqueuse à température et pression standard, un pH de 7 indique la neutralité. Un pH moins élevé (par exemple pH 3) indique une augmentation de l'acidité, et un pH plus élevé (par exemple pH 11) indique une augmentation de l'alcalinité, c'est-à-dire de la basicité. Dans le cas de l'eau le pH varie de 0 à 14, mais pour d'autres solutions le pH n'est pas limité à cette échelle. Lorsque le pH d'une solution est peu sensible aux acides et aux bases, on dit qu'il s'agit d'une solution tampon. Le pH d'une solution dite physiologique est de 7,4.

Le pH influe largement sur la conservation des aliments ainsi que leur altération résultant de différents types de réactions chimiques, enzymatiques ou microbiologiques qui elles-mêmes influencées par le pH du milieu. D'après le tableau 20, le risque de la croissance bactérienne est présent dans un intervalle de 4,5 à 9,0 tout en passant par un optimum de 6,5 à 7,5. Etant donné que le pH de ces jus est de 4,5 « jus de grenade » donc ils courent le risque d'une altération due à la croissance des bactéries. L'effet du pH sur le développement des micro-organismes est présenté dans le tableau 19.

Tableau 19.Limites de croissance de quelques microorganismes (Bourgeois, 1996)

Microorganismes	pH minimal	pH optimal	pH maximal
Bactéries	4,5	6,5 à 7,5	9
<i>Bactéries acétiques</i>	4	5,4 à 6,3	9,2
<i>Bactéries lactiques</i>	3,2	5,5 à 6,5	10,5
<i>Pseudomonas</i>	5,6	6,6 à 7	8
<i>Entérobactéries</i>	5,6	6,5 à 7,5	9
<i>S.thyphi</i>	4 à 4,5	6,5 à 7,2	8 à 9,6
<i>E.coli</i>	4,3	6 à 8	9
<i>Staphylococcus</i>	4,2	6,8 7,5	9,3
<i>Clostridium</i>	4,6 à 5		9
<i>C. Botulinum</i>	4,8		8,2
<i>C. perfringens</i>	5,5	6 à 7,6	8,5
<i>Bacillus</i>	5 à 6	6,8 à 7,5	9,4 à 10
Levures	1,5 à 3,5	4 à 6,5	8 à 8,5
Moisissures	1,5 à 3,5	4,5 à 6,8	8 à 11

Le pH est un facteur essentiel régissant le développement des microorganismes. Ainsi, on note que chaque microorganisme présente des limites de croissance vis-à-vis de ce critère. Pour le cas, d'*Escherichiacoli*, sujet de cette étude, les limites sont comprises dans un intervalle de 4,3 – 9,0 avec un optimum de 6,0 – 8,0. En conséquence, et en tenant compte du pH du jus en question, le choix des valeurs du pH pour effectuer l'étude est comme suit :

- pH 4,5 : pour le jus de grenade « *Punica granatum* » ;

Ce choix a été limité aussi par le modèle ComBase qui ne fournit qu'un intervalle de 4.5 à 7,5 pour le microorganisme étudié, soit *E. coli*.

IV.5.2.2.3. Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) indique la disponibilité de l'eau d'un milieu pour des réactions chimiques, biochimiques, un changement d'état ou un transfert à travers une membrane semi-perméable. Elle correspond à un rapport entre la pression de la vapeur d'eau de l'aliment (pression de la vapeur d'eau à la surface du produit) et la pression de la vapeur d'eau pure à la même température.

$$a_w = \frac{\text{pression partielle de l'eau dans l'aliment à } \theta^\circ}{\text{pression partielle de l'eau pure à } \theta^\circ}$$

La valeur de l'activité de l'eau varie entre 0 (produit sec au point que toute l'eau est liée à l'aliment, et donc sans qualité réactive) et 1 (eau pure et sans soluté, difficile à atteindre et surtout à maintenir). L' a_w d'un soluté peut être calculée par la formule de RAOULT :

$$a_w = n_1 / (n_1 + n_2)$$

Où : n_1 = nombre de moles du solvant (eau)

n_2 = nombre de moles du soluté

L'activité de l'eau peut être calculée aussi comme suit :

$$a_w = \text{humidité relative (\%)} / 100$$

L'activité de l'eau d'un aliment dépend de la température. Un changement de 10°C peut causer un changement dans l' a_w de 0,03 à 0,2 dépendant du type du produit. Ainsi, la modification de la température peut avoir un effet sur la stabilité d'un produit et joue un rôle important dans la conservation des produits dans un emballage hermétique.

L'importance de l'activité de l'eau pour la stabilité des denrées alimentaires lors des traitements et entreposages est illustrée, de manière très évidente ci-après. Généralement, on note qu'une stabilité optimale est obtenue lorsque l' a_w est située entre 0,2 et 0,3.

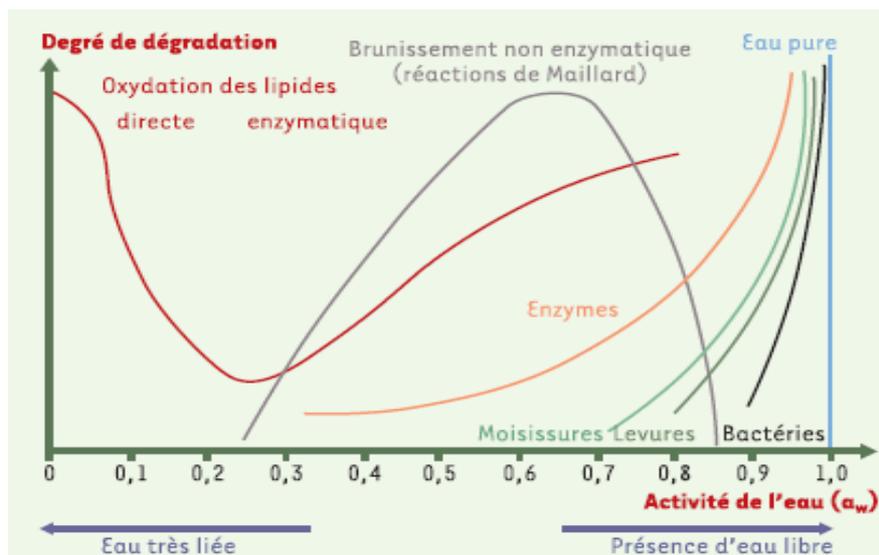


Figure 28. Risques de détérioration des aliments en fonction de l' a_w

La croissance des bactéries (courbe en noir) est généralement impossible lorsque l' $a_w < 0,90$. Les moisissures et les levures (courbe en vert clair et vert foncé) sont inhibées respectivement vers une a_w de 0,7 et 0,8 sauf certaines moisissures et levures osmophiles qui peuvent se développer jusqu'aux des a_w de 0,6. Dans la plupart des cas, l' a_w limite de croissance d'un microorganisme est différente de celle limite nécessaire pour la production de sa toxine.

D'après la figure 28 et le tableau 20 il est clair que :

- la croissance bactérienne est pratiquement impossible à $a_w < 0,90$;
- *E.coli* ne peut se développer qu'avec une a_w minimale de croissance de 0,95 ;
- Le jus de fruits possède une $a_w \geq 0,95$;
- Le modèle tolère un intervalle de 0,961 à 1.

Tableau 20. Activité de l'eau minimum de croissance de quelques microorganismes

Microorganismes	a_w
Bactéries	0,91
<i>Clostridium botulinum E</i>	0,97
<i>C. botulinum A, B</i>	0,95
<i>C. perfringens</i>	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Salmonella sp</i>	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Bactéries halophiles	0,75
Levures	0,87
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,9 à 0,94
Levures osmophiles	0,62
Moisissures	0,7
<i>Fusarium</i>	0,9
<i>Mucor</i>	0,8 à 0,9
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Penicillium expansum</i>	0,85
Moisissures xérophiles	0,7

Pour l'élaboration de cette étude, on a choisi d'appliquer la fourchette de valeurs suivante :

- 0,961 : valeur minimale tolérée par le modèle ;

- 0,975 et 0,985 : ce sont deux valeurs intermédiaires afin d'approfondir l'étude ;
- 0,999 : c'est une valeur maximale proche de 1.

IV.5.2.2.4. Température

La température d'un système est une fonction croissante du degré d'agitation thermique des particules, c'est-à-dire de son énergie thermique. Elle est définie par l'équilibre de transfert de chaleur avec d'autres systèmes.

Température	Influence de la température
30-37°C	Croissance de la plupart des micro-organismes
> 20°C	Développement de la toxinogénèse des staphylocoques et de <i>Clostridium botulinum</i>
10°C	Arrêt de la toxinogénèse de <i>Clostridium botulinum</i> et des staphylocoques
6-7°C	Croissance de <i>Bacillus cereus</i> Croissance des salmonelles Arrêt de la croissance des staphylocoques
4-5,2°C	Arrêt de la croissance des salmonelles Croissance de <i>Listeria monocytogenes</i>
0-1°C	Disparition de tout danger lié à la croissance des principaux micro-organismes pathogènes ou à l'élaboration de toxines Mais certains micro-organismes adaptés au froid continuent à croître (<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i> ...)
-10°C	Arrêt de toute croissance bactérienne Croissance maintenue des moisissures et levures
-18°C	Arrêt de toute croissance microbienne

Figure 29. Effet de la température sur les principaux micro-organismes pathogènes gardant une capacité de croissance aux basses températures (Bourgeois, 1996)

La température influence la croissance des microorganismes, toutefois, il existe schématiquement deux types de flores de micro-organismes rencontrés dans les denrées alimentaires :

- **la flore dite d'altération** qui est responsable essentiellement de contamination de surface : c'est le cas par exemple des lactobacilles. Cette flore d'altération, qui n'est pas pathogène pour l'homme, constitue en quelque sorte une alerte quant au niveau de qualité organoleptique (couleur, odeur, goût) et par la suite microbiologique de la denrée dès lors que la croissance du micro-organisme est suffisante ;

- **la flore pathogène** susceptible, sous certaines conditions, d'induire chez le consommateur des toxi-infections alimentaires. Il s'agit par exemple des staphylocoques, des salmonelles, de *Listeria monocytogène*, etc. (Bazinet and Castaigne, 2011). La figure 27 présente l'effet de la température sur les principaux micro-organismes pathogènes et qui ont la capacité de survivre dans de basses températures.

Tous les micro-organismes ne sont pas égaux devant les fortes et les basses températures. En effet, certains présentent une sensibilité différentielle au froid et voient leur croissance suspendue à de basses températures, d'autres au contraire conservent un pouvoir de multiplication dans ces conditions. La figure 29 ci-dessus illustre l'échelle de croissance des principaux micro-organismes pathogènes en fonction du niveau de la température (Bazinet and Castaigne, 2011).

Lors de ce travail, on a choisi d'appliquer les valeurs de température suivantes :

- 10°C : la valeur minimale tolérée par le modèle ComBase ;
- 12°C – 14°C – 15°C : des valeurs proches du minimum toléré pour pouvoir détecter l'influence de quelques degrés de température sur la durée de conservation prévue ;
- 20°C : valeur intermédiaire proche de la température ambiante (évaluée généralement à 25°C) ;
- 37°C : la température optimale de croissance des bactéries mésophiles, dont *E. coli* ;
- 42°C : valeur maximale tolérée par le modèle ComBase pour l'étude d'*E.coli*.

IV.5.3. Méthodes d'analyses microbiologiques

IV.5.3.1. Technique de prélèvement

Dans des conditions d'asepsie, 1 ml du jus de grenade obtenu après pasteurisation est prélevé à l'aide d'une pipette stérilisée afin de préparer la solution mère et les dilutions qui en découlent.

IV.5.3.2. Technique de dilution

D'après Bourgeois and Leveau, (1991), le diluant utilisé pour la préparation des dilutions doit répondre aux conditions suivantes :

- Il ne doit pas induire des variations qualitatives et quantitatives sur la flore microbienne présente ;
- Il doit assurer la survie de tous les microorganismes, sans favoriser leur multiplication ;
- En bactériologie alimentaire, on utilise le plus souvent soit une solution de tryptone de sel soit de l'eau physiologique.

Pour chaque jus, les dilutions sont réalisées près de la flemme, en pipettant 1ml du jus au moyen d'une pipette stérile qu'on introduit ensuite dans un tube contenant 9 ml du diluant, soit l'eau physiologique, tout en constituant la solution mère. On agite ensuite le tube manuellement et à l'aide d'une nouvelle pipette stérile on prélève 1 ml de la solution mère qu'on introduit dans un autre tube contenant 9 ml de l'eau physiologique ce qui donne ainsi une dilution de 1/10 ou encore dite 10^{-1} . Et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-3}

Préparation de l'eau physiologique :

Pour préparer un litre d'eau physiologique, on met sous agitation 9g de NaCl dans un litre d'eau distillée ensuite on verse la solution dans des bouteilles et on fait une stérilisation.

IV.5.3.3. Germes recherchés dans cette étude

Escherichia coli est un bacille Gram négatif radiorésistant de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux homéothermes. *E. coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte, l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale. De ce fait, *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour. En effet, l'ancienneté de sa découverte et sa

culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix.

Ce germe a les facteurs de croissance suivants

- Température : 7°C -----50°C ;
- Température optimale : 37°C ;
- pH de croissance :
 - minimal : 4,3
 - optimal : 6 à 8
 - maximal : 9,0
- a_w minimale de croissance : 0,95.

Echantillonnage

Les échantillons sont des jus de grenade. Le jus extrait des fruits Séfri 2 est pasteurisé etensemencé d'une colonie d'*E.coli* AL52 cultivé durant une nuit dans le milieu LB et un autre jus de grenade pasteurisé, utilisé comme témoin.

Renouvellement de la souche AL 52

Nous avons introduit une pipette pasteur stérile dans le contenant de la souche AL 52 (*E.coli* uropathogène fourni par l'Institut pasteur de Paris), on ensemence, ensuite, sous forme de stries, deux boîtes de pétri qui contiennent déjà 15 ml du milieu de culture LB. Puis, on les incube à 37°C durant 24 heures.

-Milieu de culture

Le milieu de culture **LB** (Pour *Lysogeny broth* ou incorrectement Milieu Luria-Bertani) est un milieu de culture nutritif, servant initialement à la culture bactérienne. Les milieux LB sont devenus un standard dans l'industrie pour la culture d'*Escherichia coli*, depuis les années 50. Ils ont été fortement utilisés en microbiologiemoléculaire pour la préparation de plasmides d'ADN et de protéines recombinantes. Il reste à ce jour, l'un des milieux les plus utilisés pour le maintien en vie et la culture de lignées recombinantes d'*Escherichia coli*.

En principe, il s'agit d'un milieu liquide. Pour un milieu solide, on utilise "LB agar", ou LBA (Luria Broth Agar) c'est-à-dire le même que précédemment auquel on additionne 15 à 20 g de gélose (agar-agar) selon le résultat désiré. Le milieu ainsi gélosé est placé en étuve à 121°C pendant 20 minutes, puis

laissé à refroidir jusqu'à 50°C environ avant d'être coulé en zone stérile dans les boîtes de pétri.

-Préparation du milieu de culture

Dans un erlenmeyer de 1000 ml, on met 500 ml de l'eau distillée à laquelle nous avons ajouté 10 grammes de tryptone, 5 grammes d'extrait de levure, 10 grammes de NaCl et nous laissons à la fin 15 grammes de gélose «Agar-Agar», puis on complète avec 500 ml de l'eau distillée. Toutes ces opérations s'effectuent au-dessus d'une plaque chauffante sous une agitation de 500 tours/min à une température de 75°C. Le liquide est ensuite laissé jusqu'à ce qu'il atteigne son ébullition ensuite on le verse dans des bouteilles et on passe à la stérilisation à 121°C durant 20 minutes.

-Ensemencement

Avant d'effectuer un ensemencement, nous avons réalisé un renouvellement de la souche AL 52, qui consiste à introduire une pipette pasteur stérile dans le contenant de la souche AL 52 (*E.coli* uropathogène fourni par l'Institut Pasteur de Paris), on ensemence, ensuite, sous forme de stries, deux boîtes de pétri qui contiennent déjà 15 ml du milieu de culture LB. Puis, on les incube à 37°C durant 24 heures.

Ensuite, dans chaque boîte de pétri on coule 15 ml du milieu de culture LB après refroidissement, nous laissons gélifier le milieu de culture dans une zone aseptique délimitée par deux bacs de benzène. Ensuite, on prend 1 ml de chaque dilution (Solution mère, D⁻¹, D⁻² et D⁻³) des différents échantillons et on ensemence les boîtes (trois boîtes / dilution). On met l'ensemble des boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

IV.6. Résultats et discussion

IV.6. 1. Résultats fournis par les modèles ComBase

Les graphes ci-dessous représentent les courbes de croissance d'*Escherichia coli* dans le jus de grenade fourni par les modèles ComBase. Ces courbes sont obtenues à des températures statiques et pour une concentration initiale en *E.coli* de 10² UFC/g. Le jus de grenade est doté d'un pH acide (pH < 4,5) et suite aux limitations du modèle ComBase (4,5 < pH < 7,5), on a choisi d'appliquer une seule valeur de pH pour l'étude, soit 4,5. Ainsi, les résultats

pour le jus de grenade seront classés et représentés selon le paramètre « activité de l'eau ».

$$a_w = 0,961$$

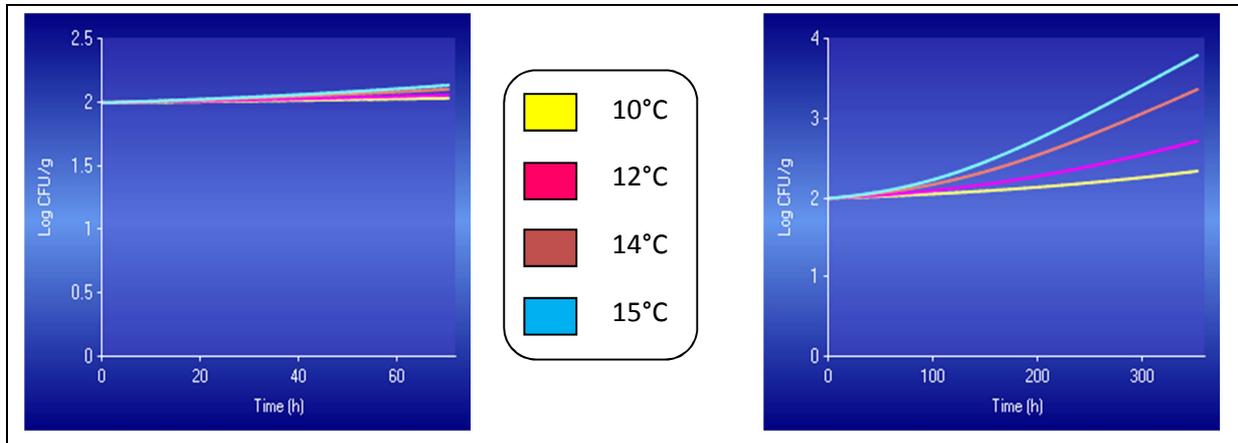


Figure 30. Prédiction de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $a_w=0,961$ et à faibles températures de stockage faibles.

Les modèles de prévision montrent que la croissance microbienne d'*Escherichia coli* dans le jus de grenade est pratiquement impossible durant les trois premiers jours de son stockage à des températures allant de 10°C jusqu'à 15°C. Par conséquent, ce jus peut avoir une durée de vie aux alentours de :

- 720 heures à 10°C ;
- 440 heures à 12°C ;
- 280 heures à 14°C et
- 240 heures à 15°C

Alors que si on augmente la température du stockage

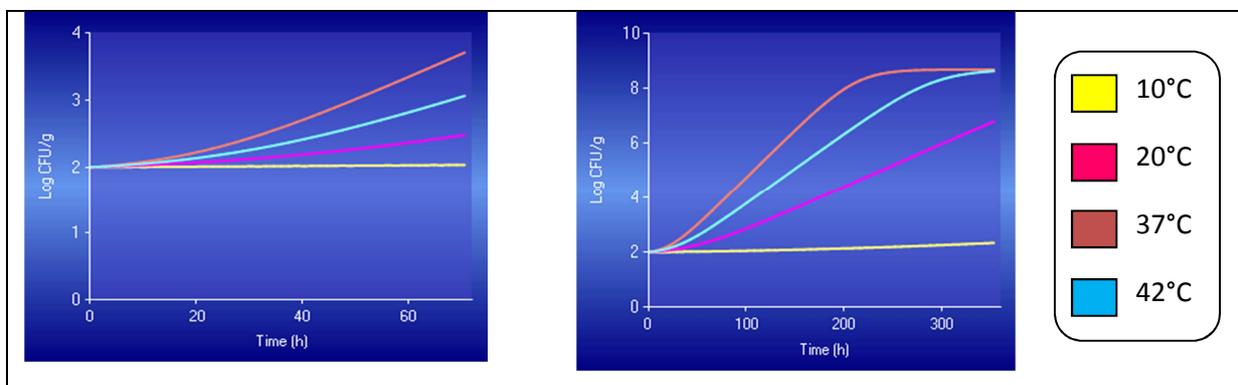


Figure 31. Prédiction de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $a_w=0,961$ et des températures élevées

Au-delà de 45 heures, la consommation du jus de grenade, en dépit de son pH et a_w relativement faibles, peut être à l'origine de sérieux risques sanitaires.

$a_w = 0,975$

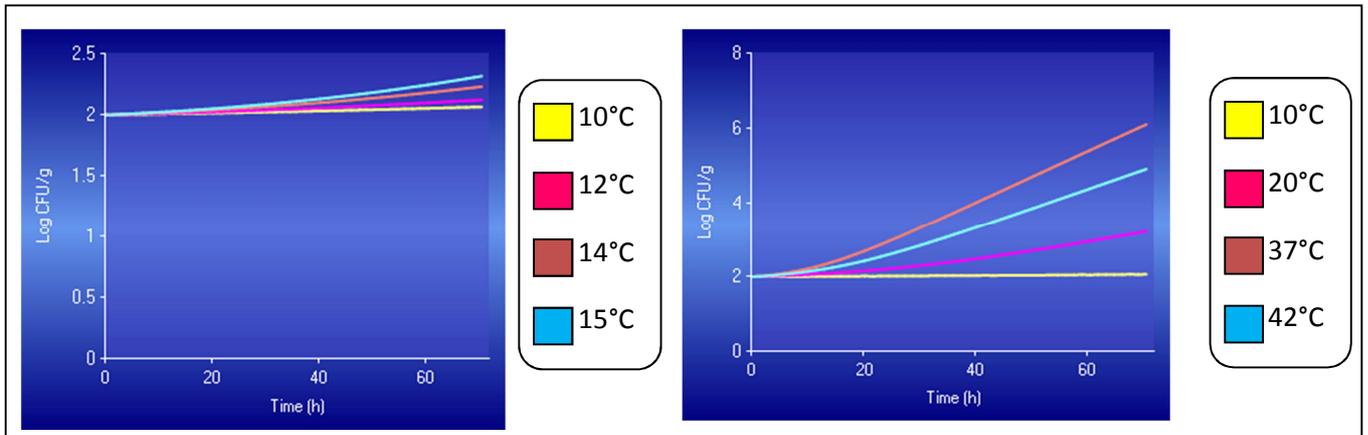


Figure 32. Prédiction de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $a_w=0,975$, des températures faibles (graphe de gauche) et des températures élevées (graphe de droite)

Pour les valeurs de températures faibles ($T < 15^\circ\text{C}$) le développement d'*E.coli* au sein du jus de grenade est loin d'atteindre la valeur maximale tolérée par la réglementation (10^3 UFC/g) au cours des premières 72 heures du stockage. Or, à des températures relativement élevées ($T > 15^\circ\text{C}$), ce jus ne peut être qualifié de salubre ou sans aucun danger microbologique.

$a_w = 0,985$

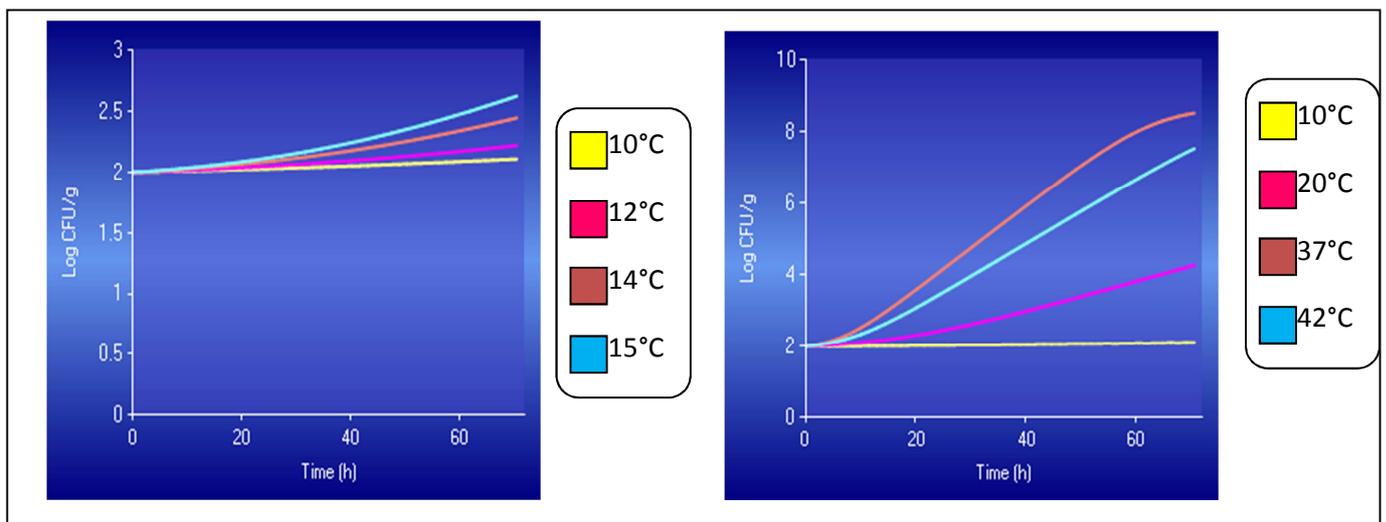


Figure 33. Prédiction de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $a_w=0,985$, des températures faibles (graphe à gauche) et des températures élevées (graphe à droite)

Les courbes de prévision obtenues suite à la base de données de ComBase, montrent bien que si on assure des valeurs relativement faibles de la température, nous pouvons consommer le jus de grenade dans les trois premiers jours de son stockage sans qu'il y ait aucun danger d'ordre microbiologique (nombre d'*E.coli* n'atteint pas 10^3 UFC/g). Alors qu'au-delà de 15°C , la valeur maximale tolérée par la réglementation (10^3 UFC/g) est dépassée dès les premières heures (moins d'un seul jour). On note que pour la température optimale de croissance d'*E. coli* (37°C), la phase exponentielle croissante arrive à son seuil maximum (10^8 UFC/g) après 60 heures du stockage du jus.

Malgré le pH acide du jus de grenade, lorsque l'activité de l'eau est maximale et s'approche de 1, la croissance d'*E.coli* devient favorable dès les premiers jours ($T < 15^{\circ}\text{C}$) voire même les premières heures ($T > 15^{\circ}\text{C}$) où la phase de latence est de moins en moins importante (quasi nulle à 37°C).

$a_w = 0,999$

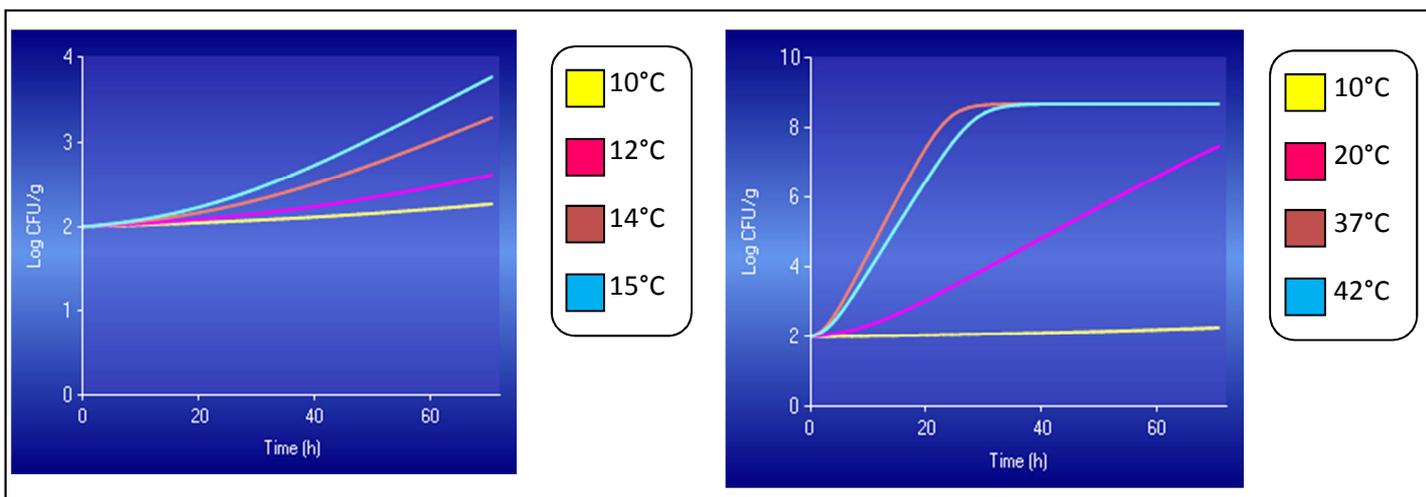


Figure 34. Prédiction de la croissance d'*E. coli* dans le jus de grenade à $a_w=0,999$ à des températures faibles (graphe gauche) et des températures élevées (graphe de droite)

Le tableau 21 représente une récapitulation des résultats de la prévision obtenus pour le jus de grenade :

Tableau 21. Durée de vie maximale prévue pour le jus de grenade sous différentes conditions de l' a_w et de température (pH = 4,5)

		Températures (°C)						
Activité de l'eau		10	12	14	15	20	37	42
	0,961	720H	440H	280H	240H	120H	45H	50H
	0,975	400H	360H	170H	140H	72H	25H	34H
	0,985	360H	175H	115H	90H	43H	15H	20H
0,999	160H	90H	60H	45H	20H	5H	6H	

Le jus de grenade peut être stocké jusqu'à un mois (720 heures) si on arrive à maintenir la température à 10°C et l'activité de l'eau à 0,961. Alors qu'on ne peut le conserver plus de 5 heures si on fait le contraire (T = 37°C et a_w = 0,999).

D'après le tableau 21, la durée de vie prévue pour le jus de grenade est influencée par les deux paramètres a_w et température. Ainsi, si on considère que le pH est fixe en 4,5, on voit clairement que :

- Si l'activité de l'eau augmente, la durée de vie maximale prévue pour le jus diminue ;
- Si la température augmente, la durée de vie diminue.

Par ailleurs, il existe un autre paramètre susceptible d'influencer fortement la durée de vie de ces deux jus, soit la présence des polyphénols. Ainsi, le jus de grenade « *Punica granatum* » contient 4544,19 mg /L. Or, on ne peut négliger le rôle des polyphénols dans l'inhibition de la croissance microbienne, ceci peut justifier les résultats obtenus en matière de durée de vie de ce jus.

IV.6. 2. Résultats des tests microbiologiques

Le présent sous chapitre représente les résultats obtenus suite aux analyses microbiologiques effectuées pour le jus de grenade « *Punica granatum* ». Ainsi, ces analyses sont faites dans l'intérêt de connaître, d'une manière globale, le comportement des microorganismes, notamment *E. coli*, dans ce jus et par la suite établir une comparaison avec les résultats obtenus suite à l'application du modèle ComBase afin de déduire à quel point ce modèle est sécurisant en matière de prévision des risques microbiologiques.

Avant de procéder au suivi du jus de grenade + *E. coli* (AL52), on a analysé le jus pasteurisé pour s'assurer qu'il n'y a aucune contamination et le but recherché par la pasteurisation est bien atteint. Le tableau 23 résume les résultats obtenus lors du suivi de ce jus.

Tableau 22. L'ensemble des résultats obtenus lors du suivi de ce jus

	T ₀ = 40 heures				T ₁ = 65 heures			
Nombre de colonies	Solution mère	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Solution mère	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
		26	13	9	3	56	34	19
UFC/ g	3000				9000			
Log UFC/ g	3,48				3,95			

Même remarque que précédemment, les bactéries introduites se développent de plus en plus avec le temps. Il faut signaler que ces bactéries se multiplient d'une façon moins importante dans ce jus de grenade ce qui fait que la durée de vie de ce dernier est relativement élevée. En conséquence, ces résultats valident l'idée générale tirée lors de l'application des modèles de prévision de ComBase.

IV.6.3. Comparaison des résultats microbiologiques avec le modèle ComBase

Malgré les limitations du modèle en ce qui concerne l'intervalle de pH [4,5 – 7,5] (or le pH du jus de grenade est de 4,15), on a pu établir une comparaison entre les résultats des tests microbiologiques effectués et la modélisation de la croissance d'*E. coli* dans le jus de grenade «*Punica granatum*» à une température de 37°C, pH = 4,5 et une fourchette de valeurs pour l'activité de l'eau :

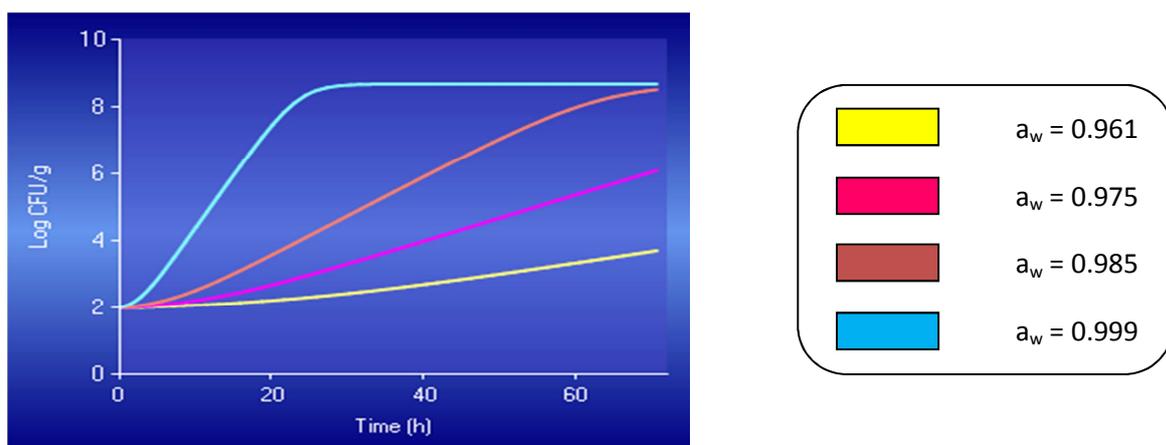


Figure 35. Comparaison entre la prévision de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade et les résultats des tests microbiologiques

A la fin, nous pouvons déduire que le modèle ComBase n'est pas sécurisant dans tous les cas. Ainsi, nous avons remarqué que les valeurs obtenues suite aux essais microbiologiques se trouvent en dessus de la courbe de croissance d'*E.coli* lorsque l'activité de l'eau est de 0,961. Cependant, pour les autres valeurs d' a_w (0,975 et 0.985), le modèle est sécurisant, voire même optimiste, pour $a_w = 0,999$.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé sur la collection de l'INRA de Meknès, constituée de 18 cultivars de grenadier (dont 10 locaux et 8 étrangers). La première partie s'est intéressée à la caractérisation pomologique, physico-chimique, l'identification et quantification des polyphénols des jus en utilisant la CLHP ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de ces dix-huit espèces. Cette étude a permis de démontrer la variabilité statistiquement significative entre les différents cultivars étudiés pour l'ensemble des paramètres mesurés à l'exception de la longueur de la graine et du poids des pépins. Ces différences soulignent la grande variabilité phénotypique observée entre les variétés étudiées.

Toutefois, les paramètres analysés à savoir le rendement en jus, la saveur, la couleur des graines, la dureté des pépins, la composition en polyphénols totaux, en anthocyanes et l'activité antioxydante des jus seront utiles pour déterminer la destination la plus adéquate pour chaque cultivar. Ainsi, d'après le présent travail, les cultivars suivants ayant le rendement le plus élevé en jus peuvent intéresser les unités de production de jus à savoir : 'Gordo de Jativa' (54,42%), 'Mollar Osein Hueso' (47,51%), 'Djeibi' (46,07%) et 'Sefri 2' (45,97%).

Aussi, la saveur et la dureté des graines a un effet direct sur la qualité gustative des fruits, ainsi les cultivars suivants : Grenade jaune, Grenade rouge, Gjebali, Djeibi, Chelfi, Bzou, Sefri, Sefri2, Gordo de Jativa, Zherie précoce et Zherie d'Automne, sont dotés d'une qualité bonne ou excellente et doivent être destinés à une consommation à l'état frais, du fait qu'ils ont une saveur sucrée ou moyennement sucrée, ainsi que leurs pépins sont tendres ou semi-durs. Les fruits des autres cultivars doivent être destinés vers la transformation. De même, la teneur en polyphénols totaux qui varie entre 1385 et 9476 mg GAE/L et la composition en anthocyanines élevée de Ounk Hmam(188,70 mg/L), Wonderful (178,79 mg/L), Djeibi (174,28 mg/L) et Sefri 2 (155,16 mg/L), pourront intéresser les industries pharmaceutiques et alimentaires afin d'extraire ces composés bioactifs. La teneur en ces composés est influencée par le type de cultivar, la région de culture, le climat et les pratiques culturelles (Shulman et al., 1984). Ils sont aussi responsables de l'activité antioxydante élevée des jus étudiés.

Ensuite, onze composés phénoliques qui sont les acides ellagique, gallique, chlorogénique, cafféique, férulique et p-coumarique, la catéchine, l'épicatéchine, la quercétine, la rutine et la phloridzine ont été également identifiés par CLHP à différentes concentrations dans les jus extraits des arilles des cultivars étudiés. Mais il faut mentionner que l'acide férulique n'est pas

détecté dans le cultivar Gordo de Jativa 'F1', tandis que le cultivar Ruby 'F4' ne contient pas de la quercétine et de la rutine. L'acide ellagique a été identifié dans tous les cultivars sans exception, et les concentrations les plus élevées ont été observées pour les cultivars L3 'Chioukhi' (95 mg / L), L1 'Grenade jaune' (74,3 mg / L).

L'analyse de groupes effectuée à la base de 40 caractéristiques pomologiques, physicochimiques et biochimiques des fruits de 18 cultivars a laissé voir une large diversité au sein de ces cultivars. En conséquence, cette étude s'est montrée très utile pour la caractérisation biochimique des cultivars du grenadier. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une diversité génétique assez importante pouvant être due à l'effet du cultivar.

Cette partie sera complétée dans le cadre d'une autre thèse en étudiant la caractérisation chimique et biochimique doit être complétée (profil des sucres, acides organiques et acides gras (travaux en cours dans le cadre d'une autre thèse). Il faut, cependant, remarquer que cette méthode de taxonomie numérique ne permet pas de résoudre totalement le problème d'identification des cultivars. L'utilisation d'autres marqueurs moléculaires (ADN) pourrait compléter les informations déjà recueillies et ainsi remédier au problème d'hétérogénéité du matériel végétal du grenadier.

La deuxième partie s'intéresse à l'étude de la stabilité microbiologique et évolution des composés phénoliques et des jus de grenade lors des traitements thermiques. Dans cette partie nous avons étudié l'effet des traitements thermiques (65, 77 et 95 °C) pendant 30 et 60 s, les résultats obtenus ont permis de remarquer qu'après le traitement à 77°C, il y a eu une inactivation significative avec une réduction de 4.7 log UFC/mL. Toutefois, le traitement à 95°C a provoqué une inactivation microbienne totale. Ainsi, l'analyse microbiologique à 77°C et à 95°C est efficace pour la réduction ou l'inactivation totale des microorganismes après la pasteurisation. Donc, pour produire un jus frais ayant une bonne qualité sanitaire, il faut être très exigeant en ce qui concerne l'hygiène lors de sa préparation et son stockage.

En plus, une dégradation thermique des composés phénoliques du jus de grenade est minime et ne révèle aucune différence significative entre les différents traitements. Par conséquent, cela ne va pas influencer les bénéfices sanitaires connus de la grenade qui sont entre autres basés sur le potentiel antioxydant du punicalagine et de l'acide ellagique qui n'ont pas

été très affectés par les traitements thermiques. De même, la composition en anthocyanes totaux a connu une diminution relative en fonction de la durée du chauffage avec différentes températures (60, 77 et 95). Cette dégradation est corrélée avec une perte visuelle notable de la couleur rouge des jus étudiés. Après le traitement thermique, la couleur passe du rouge plus intense pour le traitement assez modéré (65-77 °C), au rouge clair pour le traitement 95 °C. Tout cela a entraîné une diminution légère de la capacité antioxydante du fait qu'elle est fortement dépendante du contenu phénolique et aux anthocyanes qui sont légèrement décroissants. Cette étude devrait être complétée tout en utilisant d'autres barèmes de température et en ajoutant des conservateurs alimentaires comme l'acide ascorbique et l'acide citrique.

La troisième partie concernant l'étude de la turbidité et la clarté des jus après un traitement enzymatique qui apparaisse très intéressante comme étude du fait que la clarté des jus en général est un facteur important en ce qui concerne la qualité du jus comme il attire l'attention des consommateurs pour le produit sur le marché. En comparant la réduction de la turbidité du jus après le traitement enzymatique par pectinase et la protéase, nous avons pu montrer que la pectinase à une concentration de 0,5% v/v améliore la qualité globale de jus de grenade par rapport au traitement par la protéase. Toutefois, le mélange de pectinase et de protéase a augmenté la clarté du jus par rapport aux traitements utilisant ces enzymes séparément. Par conséquent, les résultats obtenus montrent que la protéase pourra être une solution pour les industries de fabrication de jus afin de diminuer les niveaux de la turbidité immédiate de jus de grenade et que le mélange de ces deux enzymes pourra être encore mieux pour tenir la turbidité à des niveaux très faibles pendant le stockage à froid des jus de grenade.

La dernière partie de ce présent travail entame les risques que posent les dangers microbiologiques d'origine alimentaire qui constitue une préoccupation pour la santé humaine à l'échelle mondiale. La maîtrise efficace des risques provenant de dangers microbiologiques est techniquement complexe. Récemment l'analyse des risques et ses composantes, à savoir l'évaluation, la gestion et la communication des risques, ont été adoptées comme nouvelle approche pour évaluer et maîtriser les risques microbiologiques, dans le but d'assurer la protection de la santé des consommateurs et d'assurer des pratiques loyales dans le commerce des aliments (Bazinet and Castaigne, 2011).

La modélisation de la croissance microbienne est l'un des points clés de l'appréciation quantitative des risques. La microbiologie prévisionnelle est un outil combinant des éléments microbiologiques, mathématiques et statistiques permettant de développer des modèles décrivant la croissance ou la destruction des populations microbiennes sous certaines conditions environnementales. Ces modèles permettent lorsqu'il n'est pas possible de mesurer directement l'exposition, de la prédire en fonction de la contamination primaire, des conditions d'environnement ou du traitement subi tout au long de la chaîne de production et de distribution de l'aliment. Les principaux facteurs affectant la croissance microbienne sont le pH, l'activité de l'eau (a_w), l'atmosphère, la température et la présence de certains acides organiques comme le lactate (Drosinos et al., 2006).

Les résultats obtenus avec le logiciel **ComBase** ont montré que les modèles de la croissance microbienne ont une grande importance, tout en optimisant le nombre des essais microbiologiques qui devront être effectués afin de pouvoir tracer une courbe de croissance d'un micro-organisme donné. Ces modèles permettent aussi la prévision de l'évolution du niveau de la contamination en fonction de la contamination primaire et les différents facteurs agissant sur l'aliment en question.

Cependant, l'analyse des risques microbiologiques relatifs au jus des grenades «*Punica granatum*» a permis de montrer que le temps de stockage est conditionné par le pH, la température et l'activité de l'eau. Ainsi, des valeurs minimales de ces paramètres assurent une longue durée de conservation pouvant aller jusqu'à un mois (jus de grenade). Et nous avons pu conclure que les courbes de croissance fournies par ComBase sont moins sécurisantes pour le jus de grenade «*Punica granatum*» lorsque $a_w = 0.961$ et sécurisants au-delà de cette valeur. D'où, la nécessité de mettre en cause les normes de la durée de vie des produits et celle des critères microbiologiques. Donc, à une activité de l'eau de 0.961 et à 10°C, l'évolution de la charge microbienne en *E.coli* dans le jus de grenade est pratiquement constante dans la valeur de la concentration initiale qui est la valeur minimale tolérée réglementairement, soit 102 UFC/g. Ainsi, la consommation de ce jus durant les trois premiers jours qui suivent leurs stockages est sans danger pour le consommateur. Tandis qu'à l'activité de l'eau égale à 0.985, les *E.coli* trouvent des difficultés à croître dans le jus de grenade. Ainsi, on observe les mêmes comportements que précédemment ($a_w = 0.961$) sauf que la phase de latence est faible voir nulle à 37°C et celle de croissance exponentielle devient plus rapide en ayant le maximum de croissance à 20 heures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackland, M.L., van de Waarsenburg, S., Jones, R., 2005. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*. 19, 69–76.
- Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D., Hber, D., 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 980–985.
- 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.
- Aleksandrov, A.D., 1950. The pomegranate. *Sad I ogorod* N° 2, pp. 9-40 (In Russian).
- 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 Khalifa, A. S., Dilshad, A. 1998. Third Saudi symposium on food and nutrition (26-29/10). Riyadh, Saudi Arabia.
- 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.
- Alvarez, S., Alvarez, R., Riera, F.A., Coca, J., 1998. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 138, 377–382.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000a. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 891, pp.183–188
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000b. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A* 896, 87–93.
- Artik, N., Murakami, H., Mori, T., 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing*. 12, 492–499.
- Asano, K., Shinagawa, K., Hashimoto, N., 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chu haze formation. *J. Amer. Soc. Brew. Ch.* 40, 147-154

- Augustin, J.C., Garry, P., 2005. Comportement de *Listeria monocytogenes* dans les produits de charcuterie. Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs, Transformateurs de Viandes, 26 p.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M and Coleman, R, 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. Nutr.* 71, 1062–1076.
- 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.
- Azadzoi, K.M., Schulman, R.N., Aviram, M., Siroky, M.B., 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J. Urol.* 174(1), 386-93.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Bagchi, M., Atalay, M., 2004. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)* 69, 75–80.
- Bartosz, G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comment Toxicol.* 9, 5-21.
- Bazinet, L., Castaigne, F., 2011. Concepts de génie alimentaire : Procédés associés et applications à la conservation des aliments. Lavoisier. 576 p.
- 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.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *olea europaea* L leaves. *Food Chem.* 68, 457-62.
- Benzie, I.F.F., 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr.* 39, 53–61.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239(1), 70-76.
- Bhargava, U.C., Westfall, B.A., 1968. Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extractives. *J. Pharm. Sci.* 57(10), 1674-7.

- Bouheroum, M., 2007. Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anafustissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Sci. Technol.* 28(1), 25-30.
- Brouillard, R., 1986. The flavonoids Advances. In: research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525-538 p.
- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier, Paris. 1120 p.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., 1996. Risk assessment and predictive microbiology. *J. Food Prot. Supplement*, 31-36.
- Caliskan, O., Bayazit, S., 2012. Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Sci. Hortic.* 147, 81-88.
- Çam, M., Hışıl, Y., 2007. Comparison of chemical characteristics of fresh and pasteurised juice of Gilaburu (*Viburnum opulus* L.). *Acta Alimentaria*, 36, 381–385.
- Çam, M., Hisil, Y., Durmaz, G., 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.* 112 (3), 721-726.
- Ceci, I., lozano, J., 1998. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. *Food Chem.* 61, 237–241.
- 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.
- Cemeroglu, B., Artik, N., Erbas, S., 1992. Gewinnung von Granatap-felsaft und seine Zusammensetzung. *Flussiges Obst.* 59, 335–340.
- 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.
- Cheyrier, V., Sarni-Manchado, P., 2006. Structures phénoliques et goût. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier : 398.

- Coll Cardenas, F., Giannuzzi, L., Zaritzky, N.E., 2008. Mathematical modeling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Sci.* 79, 509-520.
- Cuq, J.L., 2004. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département STIA ; Faculté des sciences et techniques Montpellier – France.
- Dawes, H., Struebi, P., Keene, J., 1994. Kiwifruit juice clarification using a fungal proteolytic enzyme. *J. Food Sci.* 59, 858–861.
- De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2000. Quantitative analysis of avan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5331–5337.
- Dean, F.M., 1963. Natural occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. Londres. Pp 148.
- Desjardins, Y., 2008. Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables (Tomas-Barberan and Gil). Dans: Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products, Woodhead Publishing, Cambridge, Angleterre, pp.1-64.
- Dhouibi, M.H., 1989. Biologie et écologie d'Ectomyelois ceratoniae Zeller (Lepidoptera : pyralidae) dans deux biotopes différents au sud de la Tunisie et recherche de méthodes alternatives de lutte. Thèse Doctorat d'état Universitaire. Paris VI.
- 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.
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H., Bayat, M., 2005. Physicochemical composition of 10 pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci. Technol. Int.* 11(2), 113–119.
- Fatope, M.O., Al Burtomani, S.K., Takeda, Y., 2002. Monoacylglycerol from *Punica granatum* seed oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 357–360.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C., 1991, Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197, 157–162.
- Fischer, A., Carle, R., Kammerer, D.R., 2013. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chem.* 138, 1800-1809.

- Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix, J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121-216.
- 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.
- Fox K., 2000. New technology in citrus processing-reprint of 1991. Fruit Processing, 10, 94-101.
- Gabor, M., Cody, V., Middleton, E.J., Harborne, J.B., Beretz, A., Liss, A.R., 1988. Plants Flavonoids in biology and Medicine II; Biochemical. Cellular and Medecinal properties. New York. 1-15 p.
- Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N.C., Tavazzi, B., Galvano, G., 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. The Journal of Nutritional Biochemistry 15, 2-11.
- Gatti, M., Civardi, S., Zamboni, M., Ferrari, F., Elthmani, D., Bavaresco, L., 2011. Preliminary results on the effect of cluster thinning on stilbene concentration and antioxidant capacity of Vitis vinifera L. Barbera wine. Vitis. 50 (1), 43-44.
- 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.
- Gozlekci, S., Kaynak, L., 2000. Physical and chemical changes during fruit development and flowering in pomegranate Punica granatum L. cultivar Hicaznar grown in Antalya region. Options Méditerranéennes Serie A, Seminaires Méditerranéens. (42), 79-85.
- Grassin, C., Fauquembergue, F., 1996. Fruit juices, In: Godfrey, T., West, S., (eds) Industrial Enzymology, second ed., 225-264, Stockholm Press. New York.
- Guignard, J.L., Potier, P., 2000. Biochimie Végétale. Dunod. Paris.
- Guignard, J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale. Ed. Masson. Paris. 160 p.

- Gündüç, N., El, S., 2003. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J. Food Sci.* 68 (8), 2591-2595.
- Guo, C.J., Wei, J.Y., Yang, J.J., Xu, J., Pang, W., Jiang, Y.G., 2008. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res.* 28, 72–77.
- Guyer, D.E., Sinha N.K, Chang, T.S., Cash, J.N., 1993. Physicochemical and sensory characteristics of selected Michigan cherry cultivars. *J. Food Quality.* 16, 355–370.
- 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.
- Hatzidimitriou, E., Nenadis, N., Tsimidou, M.Z., 2007. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (a_w) conditions. *Food Chem.* 105, 1504-1511.
- 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.
- Hemingway, R.W., 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*. Hemingway R W, Laks P. E. New York.
- 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.* 35, 127-191.
- Hornung, E., Pernstich, C., Feussner, I., 2002. Formation of conjugated 1,1,1,3-double bonds by 1,2-linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *Eur. J. Biochem.* 269, 4852–4859.
- Hua, L., Xiaoyu, W., Peihong, L., Yong, L., Hua, W., 2008. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *J. Food Drug Analysis.* 16 (6), 67-73.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
- Hwang, H.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Lee, S.K., 2005. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *J. Nutri. Biochem.* 17 (5), 356-62
- Jackman, R.L., Smith, J.L., 1996. Anthocyanins and betalains. In G.F. Hendry, and J.D. Houghton (Eds.), *Natural food colorants*. London : Blackie Academic and Professional. Pp. 244-309.
- Jin, U.H., Chung, T.W., Kang, S.K., Suh, S.J., Kim, J.K., Chung, K.H., HGu, Y.H.H., Suzuki, I., Kim, C.H., 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clinica Chimica Acta : Int. J. Clin. Chem.* 362, 57-64.
- Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, 2nd edition. 489 p.
- Kanadaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., Lee, M.T., 2005. The antitumor activities of avonoids. *In Vivo* 19, 895-909.
- 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.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.O., Dommes, J., Pincemail, J., 2007. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *J. Agri. Food Chem.* 55, 8596-8603.
- Kilara, A., 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. *Process Biochem.* 23, 35-41.
- Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E., 2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 71, 203-217.
- Koutsoumanis, P.K., Sofos, J.N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 83-91.

- 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.
- Lamaison, J.L., Carnat, A., 1990. Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharm. Acta Helv.* 65(11), 315–320.
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, I., Yang, C.S., 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 284S–291S.
- Landbo, A.K., Pinelo, M., Vikbjerg, A., Let, M., Meyer A.S., 2006. Protease-assisted clarification of black currant juice: synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6554–6563.
- 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.
- Legua, P., Melgarejo, P., Haddioui, A., Martinez, J.J., Martinez, R., Hmid, I., Hanine, H., Hernandez, F., 2012. Total Phenols and Antioxidant Capacity in 10 Moroccan Pomegranate Varieties. *J. Food Sci.* 71(1), 115-120.
- Leistner, L., 1999. Combined methods for food preservation In M. Shafiur Rahman (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. New York. pp, 457-485.
- Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C., Chung, J.G., 2005. Ellagic acid induced p53/p21 expression. G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.* 25, 971–979.
- Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.H., Wang, R., 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 285-94.
- Lin, J.Y., Tang, C.Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables. as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 101, 140–147.

- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, pp. 265-275.
- Macheix, J.J., 1996. Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* L. Var Durum). *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1727–1730.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p.
- 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).
- Malagas, D., 1992. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala. p. 232.
- MAPM, 2012. Répartition régionale de la superficie et de la production du grenadier. Rabat. Morocco: Ministry of Agriculture of Morocco.
- Marc, Fr., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., 2004. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: médecine sci.* 20(4), 458-463.
- Mars, M., 1995. La culture du grenadier (*Punica granatum* L.) et du figuier (*Ficus carica* L.) en Tunisie. CIHEAM. Options Méditerranéennes. p. 85-95.
- Mars, M., 1998. Pomegranate plant material : genetic resources and breeding (review). In : I Symposium Internacional sobre el granado. MV-0. Orihuela (Alicante).
- Mars, M., Marrakchi, M., 1999. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. *Genet. Resour. Crop Ev.* 46(5), 461-467.
- 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.
- Martinez, J.J., Megarejo, P., Hernandez, F., Salazar, D.M., Martinez, R., 2006. Seed characterization of five new pomegranate (*Punica granatum*L.) varieties. *Sci. Hortic.* 110, 241-246.

- Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., Satoh, K., Shimosegawa, T., 2005. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochem. Pharm.* 70, 869–878.
- Mazzotta, A.S., 2001. Thermal inactivation of stationary- phase and acid-adapted *E. coli* O₁₅₇: H₇. *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J. Food prot.* 64, 315-320.
- Meddleton, E., Kardasnam, J.C., 1993. The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652 p.
- Medic-Sanic, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A., 2004. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemica acta.* 361-366 p.
- Melgarejo, P., 1993. Selección y tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politécnica 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.
- Melgarejo, P., Valero, D., 2012. Series A: Mediterranean Seminars. Nº 103. Spain.
- Membré, J.M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., Zwietering, M., 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 179-186.
- 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., Vegra, S., Martí, N., García-Viguera, C., Saura, D., Valero, M., 2013. Change on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised juice. *J. Food chem.* 141, 2122–2129.

- Meyer, A.S., Köser, C., Adler-Nissen, J., 2001. Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and fining treatments on turbidity and haze in cherry juice. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3644–3650.
- 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.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* 60, 331-7.
- Moez, S., 2005. L'appréciation quantitative des risques. Un outil de gestion dans la filière laitière. Symposium sur les produits laitiers. Faculté de Médecine- Tours France.
- Molyneux, P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.
- Mousavinejad, G., Emam-Diomeh, Z., Rezaei, K., Khodaparast, M.H.H., 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant capacity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food chem.* 115, 1274–1278.
- Noda, Y., Kaneyuka, T., Mori, A., Packer, L., 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 166–171.
- Napoli, C.A., Fahy, D., Wang, H.Y., Taylor, L.P., 1999. white anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiology.* 120 (2), 615-622.
- 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.
- Orak, H.H., 2007. Total antioxidant activities. phenolics. anthocyanins. polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Sci. Hort.* 111, 235–241.
- 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.
- Poyrazoglu, E., Gokmen, V., Artik, N., 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal.* 15, 567–575.
- Psotova, J., Lasovsky, J., Vicar, J., 2003. Metal chelating properties. electrochemical behavior. scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed.* 174-153 p.
- Quiroz, I., 2009. Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de Mercado. *Fundacion Chile*.
- Radi M., Mahrouz M., Jaouad A., Tacchini M., Hugues M., And Amiot M.J., 1997. Phenolic composition, browning susceptibility and carotenoids content of several apricot cultivars at maturity. *Hort. Sciences*, vol. 32 (6).
- Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., Amiot, M.J., 2004. Characterization and identification of some phenolic compounds in Apricot fruit (*Prunus armeniaca* L.). *Sci. Aliments.* 24, 173–183.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9-10), 1231-1237.
- Ribereau-Gayon, J., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Traité d'aénologie*. Edition Dunod. Paris. 254 p.
- Ricardo, D., Silva, J.M., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S., 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agri. Food Chem.* 39, 549-1552.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401- 436.
- Rufino, M.D.M., Alves, R.E., de Brito, E.S., Perez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F., Mancini, J., 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121, 996–1002.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and

- anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Res. Inter.* 42, 1023–1033.
- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C.A., 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 339-346.
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press. Pp 113-146.
- Sambamoorthi, N., 2007. Hierarchical Cluster Analysis- Some Basics and Algorithms. In CRM portals Inc. USA.
- Sanchez-Capuchino, V., 1986. Rotulacion une 1034-1. TEBAR. ISBN 9788473600743.
- Sanchez-Monge, E., 1974. Fitogenética : mejora de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura. Madrid. P 456.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri Jose, A., Saura-Calixto, F. A., 1998. Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agri.*76(2), 270-276.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.* 32, 407–412.
- Sarig, Y., Galili, A., 2012. A comprehensive industrialization of the processing of the pomegranate fruit – The key to its economic viability. II International Symposium on the Pomegranate. *Options Méditerranéennes, A*, No. 103.
- 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.
- Scherer, R., Godoy, H. T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.*112, 654-658.
- 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., Aronson, W.J., Zhang, Y., Henning, S.M., Moro, A., Lee, R.P., Sartippour, M., Harris, D.M., Rettig, M., Suchard, M.A., Pantuck, A.J., Beldegrun, A., Heber, D., 2007. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7732–7737.
- Seeram, N.P., Nair, M.G., 2002. Inhibition of lipid peroxidation and structure-capacity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, Anthocyanidins and catechins. *J. Agric. Food Chem.* 50(19), 5308-5312.
- Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D., 2006. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Seman, D.L., Borger, A.C., Meyer, J.D., Hall, P.A., Milkowsky, A.L., 2002. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready to eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate and product moisture content. *J. Food Prot.* 65, 651-658.
- Sharma-Om, P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food chem.* 113 (4), 1202.
- Shimoni, E., Labuza, T.P., 2000. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 394-402.
- Siebert, K. J. 1999. Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technol.* 53(1): 54-57.
- Siebert, K.J., 2006. Haze formation in beverages. *LWT-Food Sci. Technol.* 39, 987–994.
- Simonian, D., 2007. Analisis del mercado internacional del granado perspectivas para las exportaciones chilenas. In: *Redagricola*, Edicion no. 16, May 2007.
- Singleton, V.L., Joseph, A., Rossi, J.R., 1965. Colorometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-153.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablownicz, Z., 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agri. Food Chem.* 54, 7717–7723.
- 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.

- 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.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., Dommes, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226-1233.
- Tebassi, S., 1992. Lutte contre l'Ectomyelosis ceratoniae Zellar sur le grenadier dans les oasis littorales. Rapport de stage de fin d'études. I.R.A. Médecine.
- 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.
- Tezcan, F., Gultekin-Ozguven, M., Diken, T., Ozcelik, B., Erim, F.B., 2009. Antioxidant capacity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem.* 115(3), 873-877.
- 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
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Letter.* 4, 147-157.
- Tsuyuki, H., Ito, S., Nakatsukasa, Y., 1981. Lipids in pomegranate seeds. *Nihon Daigaku No-Juigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku* 38, 141-148.
- Tung-Sun, C., Siddiq, M., Sinha, N., Cash, J., 1995. Commercial pectinase and the yield and quality of stanley plum juice, *J. Food Process Preserv.* 19, 89-101.
- Türk, G., Sonmez, M., Aydin, M., Yuce, A., Gur, S., Yuksel, M., Hicazi-Aksu E., Aksoy, H., 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality. Spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin. Nutr.* 27, 289-296.
- Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M., 2001. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *J. Food Eng.* 48, 83-90.

- Vaillant, F., Millan, P., O'brien, G., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M., 1999. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *J. Food Eng*, 42, 215–224.
- Van Den Berg, R., Haenen, G.R., Van Den Berg, H., 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem.* 70, 391-5.
- Van Elswijk, D.A., Schobel, U.P., Lansky, E.P., Irth, H., van der Greef, J., 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum L.*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 65, 233–241.
- Vavilov, N.I., 1951. The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. In : F. Verdoom (ed.), K. Starr Chester (translator). *Chronica Bot.* (13) 1/6.
- Veluri, R., Singh, R.P., Liu, Z., Thompson, J.A., Agarwal, R., Agarwal, C., 2006. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* [Epub ahead of print].
- Vendrell, M., 2003. Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. IOS Press: 235-236.
- 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*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat. Faculté De Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1.
- Wang, R.F., Xie, W.D., Zhang, Z., Xing, D.M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C., Du, L.J., 2004. Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products* 67, 2096–2098.
- Wang, S.Y., Lin, H.S., 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agri. Food Chem.* 48, 140–146.

- Willis, R. B., Allen, P.R., 1998. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *The Analyst*. 123, 435–439.
- Yang, J.H.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D., Chou, C.C., Wei, Y.H., Chung, J.G., 2006. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34, 296–304.
- Yusof, S., Ibrahim, N., 1994. Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment. *Food Chem.* 51, 83–88.
- Zhang, Y., Wang, D., Lee, R., Henning, S.M., Heber, D., 2009. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial pomegranate extracts: Implication for standardization and quality control. *J. Food Chem.* 57, 7395-7400.

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs	: Absorbance
ACP	: Analyse en Composantes Principales
AFFSA	: Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments
AIA	: Acide indol-acétique
ANOVA	: Analysis of Variance (analyse de la variance)
AOAC	: Association of Analytical Chemists
ASE	: Accelerated Solvent Extractor
CAM	: Coefficient d'absorption molaire Cyanidine-3-glucoside (26.900)
TAT	: Composition enanthocyanes totaux
CLHP	: Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance
CPT	: Composition en protéines totaux
DPPH	: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine
FD	: Facteur de dilution (20)
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
FT	: Flavonoïdes totaux
Hum	: Humidité
INRA	: Institut nationale de recherches agronomiques.
OMS	: Organisation mondiale de la Santé
P	: Probabilité
PM	: Poids moléculaire (449,2)
PT	: Polyphénols totaux
TEAC	: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate

UFC	: Unité Formant Colonies.
Gal	: Acide gallique
Cat	: Catéchine
Epiat	: Epicatéchine
Ellag	: Acide ellagique
Chl	: Acide Chlorogénique
Caf	: Acide cafféique
p-cou	: Acide p-coumarique
Fer	: Acide Férulique
Que	: Quercetine
Phl	: Phloridzine
Rut	: Rutine

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Arbres du grenadier « Sefri » collectionné au domaine expérimental de l'INRA à Ain Taoujdate (500 m d'altitude).

Figure 2. Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum*) (Flora von Deutschland and Schweiz. 1885).

Figure 3. Fleur et fruits du grenadier 'Sefri' sur un arbre en collection à l'INRA.

Figure 4. Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur Vavilov (Sanchez-Monge, 1974).

Figure 5. Les plus grands pays producteurs des grenades au monde (Melgarejo and Valero, 2012).

Figure 6. Différentes classes des composés phénoliques.

Figure 7. Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996).

Figure 8. Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques (Malagas, 1992).

Figure 9. Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

Figure 10. Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963).

Figure 11. Structures chimiques de quelques flavonols (Van Elswijk et al., 2004).

Figure 12. Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau-Gayon, 1968).

Figure 13. Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-désoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3-4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes

Figure 14. Grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix, 1996). PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; CCR : cinnamate CoA réductase ; CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone flavanone isomérase ; PPO : polyphénoloxydases ; POD : peroxydases ; Lacc : laccases.

Figure 15. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre le radical DPPH• et un antioxydant (AH).

Figure 16. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le radical ABTS•- et un antioxydant (AH).

Figure 17. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridy-s-tri-azine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).

Figure 18. Procédé de fabrication de jus frais de la grenade

Figure 19. Carte montrant la localisation du domaine expérimental à Ain Taoujdate – Meknès.

Figure 20. Aspects morphologique des fruits de 18 cultivars collectionnés au niveau du domaine expérimental Aïn Taoujdate -INRA- Meknès.

Figure 21 : Couleur de Jus élaboré à partir des 18 cultivars.

Figure 22. Concentration en polyphénols totaux **(A)**, en flavonoïdes totaux **(B)** et en anthocyanes totaux **(C)** de dix-huit jus de grenade. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type de 3 répétitions par échantillon. ANOVA a été réalisée sur la base de différences significatives ($p < 0,05$) est indiquée par les différentes lettres.

Figure 23. Concentration en tanins hydrosolubles**(A)** et en tanins condensés **(B)** de dix-huit jus de grenade. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type de 3 répétitions par échantillon. ANOVA est réalisée sur la base de différences significatives ($p < 0,05$) est indiquée par les différentes lettres.

Figure 24. Chromatogramme des composés phénoliques dans le jus de grenade (L5) cultivées au Maroc.

Figure 25. Activité antioxydante des jus de grenade issus des différents cultivars mesurée selon 3 méthodes (A): DPPH.(B): FRAP, (C) : ABTS.

Figure 26. Dendrogramme issu de l'analyse des groupes basée sur les paramètres physicochimiques des cultivars étudiés.

Figure 27. Différentes phases de la croissance microbienne

Figure 28. Risques de détérioration des aliments en fonction de l' a_w

Figure 29. Effet de la température sur les principaux micro-organismes pathogènes gardant une capacité de croissance aux basses températures (Bourgeois, 1996)

Figure 30. Prédiction de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $A_w=0.961$ et des températures de stockage faible.

Figure 31. Prévion de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $A_w=0.961$ et des températures élevées

Figure 32. Prévion de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $A_w=0.975$, des températures faibles (graphe de gauche) et des températures élevées (graphe de droite)

Figure 33. Prévion de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $A_w=0.985$, des températures faibles (graphe de gauche) et des températures élevées (graphe de droite)

Figure 34. Prévion de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade à $A_w=0.999$ à des températures faibles (graphe de gauche) et des températures élevées (graphe de droite)

Figure 35. Comparaison entre la prévion de la croissance d'*E.coli* dans le jus de grenade et les résultats des tests microbiologiques

LISTE DES TABLEAUX

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

Tableau 2. Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

Tableau 3. Quelques composés phénoliques clés et leurs actions anti-cancérogènes et anti-inflammatoires

Tableau 4. Teneur des polyphénols totaux de quelques fruits quantifiée par des mesures spectrophotométriques.

Tableau 5. Origine géographique des 18 cultivars collectionnés dans la station expérimentale Ain Taoujdate- INRA Meknès.

Tableau 6. Gradient d'élution des composés phénoliques par CLHP.

Tableau 7. Temps de rétention à la température de 20°C et longueur d'onde (λ) de détection des composés phénoliques étudiés.

Tableau 8. Caractéristiques physiques des dix-huit cultivars de grenadier collectionnés à Ain Taoujdate-INRA Meknès

Tableau 9. Rendement en jus, en graines et en pépins pour les 18 cultivars.

Tableau 10. Caractérisation physique des graines des dix-huit cultivars étudiés

Tableau 11. Caractéristiques organoleptiques des fruits des 18 cultivars étudiés

Tableau 12. Caractéristique chimique des jus élaborés des 18 cultivars.

Tableau 13. Compositions phénoliques des jus de grenade analysés par CLHP

Tableau 14. Pourcentage de variance cumulée, valeurs propres et définition des axes d'une ACP effectuée sur les cultivars de grenadier à partir des caractéristiques étudiées.

Tableau 15. Effet du traitement thermique sur la réduction microbiologique des jus de grenade.

Tableau 16. Effet du traitement thermique sur les caractéristiques chimiques et l'activité antioxydante du jus de grenade.

Tableau 17. Effets de la clarification enzymatique par une pectinase et une protéase sur les caractéristiques du jus du grenadier.

Tableau 18.Exemples de barèmes de températures (Bazinet and Castaigne, 2011)

Tableau 19.Limites de croissance de quelques microorganismes (Bourgeois, 1996)

Tableau 20. Activité de l'eau minimum de croissance de quelques microorganismes

Tableau 21. Durée de vie maximale prévue pour le jus de grenade sous différentes conditions de l' A_w et température.

Tableau 22. L'ensemble des résultats obtenus lors du suivi de ce jus.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	4
Abstract.....	5
INTRODUCTION GENERALE.....	7
1^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
Chapitre 1. Généralités sur le grenadier	13
1.1. Introduction.....	13
1.2. Nomenclature	14
1.3. Grenadier dans le règne végétal.....	14
1.4. Biologie du grenadier	15
1.4.1. Fleurs.....	16
1.4.2. Fruit.....	16
1.5. Exigences écologiques du grenadier	17
1.5.1. Exigences climatiques.....	17
1.5.2. Exigences édaphiques	17
1.6. Eléments de conduite technique de la culture	18
1.6.1. Entretien régulier	18
1.6.2. Engrais.....	18
1.6.3. Irrigation.....	18
1.6.4. Multiplication	18
1.6.4.1. Semis	19
1.6.4.2. Bouturage.....	19
1.6.4.3. Marcottage.....	19
1.6.4.4. Drageon	19
1.6.4.5. Greffage.....	20
1.6.5. Bio-agresseurs du grenadier	20
1.6.5.1. Pucerons.....	20
1.6.5.2. Ectomyeloides ceratoniae	20
1.6.5.3. Zeuzères (<i>Zeuzera pyrina</i> L.).....	20
1.6.5.4. <i>Aspergillus castaneus</i>	20
1.7. Répartition géographique	20
1.8. Caractérisation morphologique et pomologique du matériel végétal à l'INRA Béni Mellal.....	23

I.8.1. Grenades à consommation en frais	23
I.8.2. Grenades à destination industrielle	24
I.9. Propriétés thérapeutiques des grenades (<i>Punica granatum L.</i>).....	24
I.9.1. Propriétés antioxydantes de la grenade	24
I.9.2. Action préventive des maladies cardiovasculaires	25
I.9.3. Inhibition de l'oxydation des LDL	25
I.9.4. Action sur la dysfonction érectile.....	25
I.9.5. Action anticancéreuse	26
I.9.6. Action antimicrobienne	27
I.10. Composition physicochimique du grenadier.....	27
I.10.1. Caractéristiques physiques des fruits	28
I.10.2. Caractéristiques chimiques des fruits	28
I.10.2.1. Le jus de grenade.....	28
I.10.2.2. Graines	29
I.10.2.3. Ecorce de la grenade	30
Chapitre II. Composés phénoliques	31
II.1. Généralités	31
II.2. Classification des composés phénoliques	31
II.2.1. Acides phénols et les coumarines	32
II.2.1.1. Acides phénoliques.....	32
II.2.1.2. Acides cinnamiques	33
II.2.1.3. Coumarines.....	34
II.2.2. Flavonoïdes.....	34
II.2.3. Tanins	37
II.2.3.1. Tanins condensés (flavan-3-ols)	37
II.2.3.2. Tanins hydrolysables	39
II.3. Voie de biosynthèse des principaux polyphénols.....	39
II.4. Répartition de ces classes dans le fruit du grenadier	41
II.5. Toxicité des composés phénoliques de la grenade.....	45
II.6. Méthodes de caractérisation des composés phénoliques	46
II.6.1. Dosage des composés phénoliques totaux	46
II.6.2. Dosage des composés individuels par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	47
II.7. Détermination de l'activité antioxydante	48

II.7.1. Méthode ORAC	49
II.7.2. Méthode DPPH	49
II.7.3. Méthode TEAC	52
II.7.4. Méthode FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power.....	52
Chapitre III. Procédés de transformation et Sécurité microbiologique.....	54
III.1. Généralités	54
III.2. Procédé de fabrication du jus frais extrait à partir des fruits entiers	54
III.3. Extraction du jus à partir des arilles.....	57
III.4. Procédé de fabrication du jus à base de concentré	57
III.4.1.Pasteurisation après extraction et raffinage.....	57
III.4.2.Concentration et congélation	58
III.5. Contrôle de la qualité.....	59
2^{EME} PARTIE : DEMARCHE SCIENTIFIQUE.....	60
I.1. Contexte	62
I.2. Problématiques.....	62
I.3. Objectifs	62
I.4. Axes de recherche	63
3^{EME} PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	66
Chapitre I . Caractérisation pomologique, physico-chimique et biochimique de dix huit cultivars collectionnés à l'INRA de Meknès	67
I.1. Généralités	67
I.2. Matériels et méthodes	67
I.2.1. Matériel végétal utilisé.....	67
I.2.2. Caractérisation physique et qualité organoleptique des graines	68
I.2.3. Préparation des échantillons pour analyse	69
I.2.4. Acidité titrable, pH, degré Brix, Indice de maturité et matière sèche.....	Erreur ! Signet non défini.
I.2.5. Composition en protéines totaux.....	71
I.2.6. Dosage des polyphénols des jus.....	73
I.2.7. Détermination des flavonoïdes.....	73
I.2.8. Composition en anthocyanes totaux.....	73

I.2.9. Détermination des tanins hydrosolubles.....	74
I.2.10. Détermination des tanins condensés	74
I.2.11. Identification et quantification des composés phénoliques des jus extrait des arilles par CLHP :.....	75
I.2.12. Détermination de l'activité antioxydante.....	76
I.2.12.1. Méthode DPPH.....	76
I.2.12.2. Méthode FRAP.....	77
I.2.12.3. Méthode ABTS.....	77
I.2.13. L'analyse statistique	78
I.3. Résultats et discussion	78
I.3.4. Acidité titrable, pH, degré de Brix, indice de maturité et matière sèche	84
I.3.5. Détermination des protéines totaux et de l'Humidité.....	85
I.3.6. Polyphénols totaux (PT), des flavonoïdes totaux (FT) et composition en anthocyanes totaux (CAT).....	86
I.3.7. Tanins hydrolysables et tanins condensés	88
I.3.8. Identification et quantification des composés phénoliques par l'analyse de CLHP	89
I.3.9. Détermination de l'activité antioxydante.....	93
I.3.10. Analyse en composantes principales (ACP).....	95
I.3.11. Analyse des groupes.....	97
Chapitre II . Etude de la stabilité microbiologique et évolution des composés phénoliques des jus de grenade lors des traitements thermiques	99
II.1. Généralités	99
II.2. Matériel et méthodes.....	99
II.2.1. Préparations des échantillons.....	99
II.2.2. Pasteurisation des jus.....	100
II.2.3. Analyse microbiologique	100
II.2.4. Caractérisation chimique.....	101
II.2.4.1. Détermination des polyphénols totaux et anthocyanes totaux	101
II.2.4.2. Détermination de l'activité antioxydante.....	101
II.3. Résultats et discussion	101
II.3.1. Analyse microbiologique	101
II.3.2. Caractérisation chimique.....	103
II.3.2.1. Composition en polyphénols totaux	103
II.3.2.3. Composition en anthocyanes totaux.....	104

II.3.3. Détermination de l'activité antioxydante.....	104
Chapitre III . Clarification enzymatique du jus de grenade.....	106
III.1. Généralités	106
III.2. Matériels et méthodes	107
III.2.1. Préparations des échantillons.....	107
III.2.2. Clarification expérimentale.....	107
III.2.3. Acidité titrable, pH, matière sèche dissoute et le rapport °Brix/Acidité titrable	108
III.2.4. Détermination de la turbidité	108
III.2.5. Mesure de la Clarté	108
III.2.6. Détermination de la teneur en pectine, protéines totaux et les polyphénols totaux	108
III.3. Résultats et discussion	109
III.3.1. Effet des traitements de la clarification enzymatique sur la turbidité du jus de grenade	109
III.3.2. Effet des traitements de clarification sur le jus de grenade	112
III.3.3. Acidité titrable, pH, degré de Brix et le rapport °Brix/Acidité titrable	112
III.3.4. Polyphénols totaux, pectine, et teneurs en protéines.....	113
Chapitre IV. Etude de la stabilité microbiologique en se basant sur la microbiologie prédictive	114
IV.1. Généralités	114
IV.2. L'intérêt de la prévision en microbiologie alimentaire.....	115
IV.3. Principe de la méthode.....	116
IV.4. Démarche de la modélisation	116
IV.4.1. Identification des paramètres limitant de la conservation du produit	116
IV.4.2. Délimitation du champ de l'expérimentation.....	116
IV.4.3. Planification de l'expérimentation.....	117
IV.4.4. Recueil des données.....	117
IV.4.5. Modélisation	118
IV.4.6. La validation	118
IV.5. Matériel et méthodes.....	119
IV.5.1. le matériel utilisé	119
IV.5.2. Outil informatique « ComBase ».....	120
IV.5.2.1. Boîte à outils de modélisation.....	121
IV.5.2.2. Outils de modélisation intégrée dans le navigateur ComBase.....	123

IV.5.3. Méthodes d'analyses microbiologiques	130
IV.5.3.1. Technique de prélèvement	130
IV.5.3.2. Technique de dilution	130
IV.5.3.3. Germes recherchés dans cette étude	130
IV.6. Résultats et discussion	132
IV.6. 1. Résultats fournis par les modèles ComBase.....	132
IV.6. 2. Résultats des tests microbiologiques	136
IV.6.3.Comparaison des résultats microbiologiques avec le modèle ComBase.....	137
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144
LISTE DES ABREVIATIONS	162
LISTE DES FIGURES	164
LISTE DES TABLEAUX	167
TABLE DES MATIERES	169
VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	175

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

- 1) HMID, I., ELOTHMANI, D., HANINE, H., OUKBALI, A., 2013. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*. ISSN : 1878-5352. (Accepted).
- 2) HMID, I., ELOTHMANI, D., HANINE, H., OUKBALI, A., 2013. Effects of enzymatic clarification of pomegranate juice by protease and pectinase treatments. *Arabian Journal of Chemistry*. (Acceptation de l'éditeur et en cours de révision).
- 3) Legua, P., Melgarejo, P., Haddioui, A., Martinez, J.J., Martinez, R., Hmid, I., Hanine, H., Hernández, F., 2012. Total Phenols and Antioxidant Capacity in 10 Moroccan Pomegranate Varieties. *Journal of Food Science*. 71 (1). 115-120.

Communication à des congrès internationaux avec comité de lecture et publication des proceedings

- **HMID I., HANINE H., ELOTHMANI D., OUKABLI A., HADDIOUI A.** Diversité génétique et biochimique du grenadier au Maroc : Innovations au service des boissons et produits dérivés. Symposium international sur les composés phénoliques à Agadir- MAROC. 17 et 18 Décembre 2009 **(Communication orale)**.
- **HMID I., ELOTHMANI D., HANINE H., OUKABLI A., MEHINAGIC E., HADDIOUI A.** Identification et quantification des composés phénoliques et leurs effets sur l'activité antioxydante du jus des différents cultivars du grenadier au Maroc. The International Meeting on Molecular Chemistry and Development (RICMED4'2010). 24-27 Novembre 2010. Marrakech. Maroc **(poster)**.
- **HMID I., ELOTHMANI D., HANINE H., OUKABLI A., MEHINAGIC E., HADDIOUI A.** Pouvoir antioxydant et composition en polyphénols des différents cultivars du grenadier marocains. 3^{ème} congrès des sciences analytiques CSA2010 CASABLANCA 24-26. Novembre 2010 **(Communication orale)**.

- **AGUENNOUZ B., HANINE H., ELOTHMANI D., HMID I., OUKABLI A., HADDIOUI A.** Le grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolution thérapeutique. Le Premier Colloque International Pluridisciplinaire de l'Arbre. 21- 22 Mars 2012 à Béni Mellal **(Communication orale)**.
- **ZIDOUH M., HANINE H., ELOTHMANI D., HMID I., AGUENNOUZ B.** Le grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolution thérapeutique. Le Premier Colloque International Pluridisciplinaire de l'Arbre. 21- 22 Mars 2012 à Béni Mellal **(Poster)**.
- **MAAOUNI My A., HANINE H., HMID I., OUKABLI A., ELOTHMANI D.** Etude de la variabilité pomologique et de la composition en acides gras de l'huile des arilles de différents cultivars de grenadier marocain (*Punica granatum*). The Second International Symposium on « Analytical Chemistry for a Sustainable Development » -ACSD 2013- The 4th Federation of African Societies of Chemistry (FASC) Congress. 7-9 Mai 2013 **(Poster)**.

Communication à des congrès et séminaires nationaux

- **HMID I., HANINE H., ELOTHMANI D., OUKABLI A., HADDIOUI A.;** Valorisation des grenades par transformation : Elaboration des jus et produits dérivés de la grenade. Le Premier Séminaire sur les Potentialités du Développement de la filière Grenade. 13 Octobre 2011 à Fkih Ben Saleh **(Communication orale)**.

Participation aux Forums des doctorants

- **HMID I., HANINE H., ELOTHMANI D., OUKABLI A., MEHINAGIC E., HADDIOUI A.** Polyphénols et anthocyanes du *Punica Granatum* L. (Grenadier). 10e Forum des doctorants à Angers- FRANCE. 18 Mai 2010 **(poster)**.

Thèse de Doctorat

Ilham HMID

**Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum L.*) :
Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais**

Résumé

Le grenadier (*Punica granatum*) est adapté aux climats arides et semi-arides d'où l'intérêt d'étudier et valoriser ses fruits à cause de l'accentuation des problèmes de sécheresse qui touchent le Maroc ces dernières années. D'un autre côté, la grenade possède de fortes capacités antioxydantes et anti-inflammatoires liées à la présence d'anthocyanes, de tanins et d'acide ellagique qui est utilisé en thérapeutique pour sa capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Toutefois, le but de ce présent travail s'intéresse dans un premier temps à la caractérisation physicochimique, l'identification et quantification des polyphénols des jus en utilisant l'HPLC ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de dix-huit cultivars collectionnés au niveau de l'INRA de Meknès. Cette étude a permis de conclure que les jus ont une forte teneur en polyphénols totaux qui varie entre 1385 to 9476 mg GAE/L. L'étude a montré aussi une variabilité statistiquement significative entre les différents cultivars étudiés pour l'ensemble des paramètres mesurés. Dans la seconde partie, qui traite l'effet de la température sur la stabilité des polyphénols et surtout des anthocyanes, il a été montré que la composition de ces composés diminue après chaque traitement thermique suite à leurs dégradations. Pour la troisième partie concernant l'étude de l'efficacité des pectinases et des protéases dans les traitements de clarification du jus de grenade. Le traitement par les pectinases à une réduction significative de la turbidité par rapport à la protéase. La combinaison de ces deux enzymes donne un bon résultat en terme de réduction de la turbidité. Dans la dernière partie consacrée à la modélisation de la croissance microbienne qui consiste à appliquer les modèles mathématiques fournis par la base de données ComBase sur le jus de grenade, les résultats obtenus ont montré que à des valeurs minimales de la température, pH et l'activité de l'eau assurent une longue durée de vie pouvant aller jusqu'à un mois et que le modèle ComBase est sécurisant en général pour ce type de jus.

Mots clés

Grenadier, *Punica granatum*, Cultivar, jus de fruit, Composition phénolique, Acide ellagique, Activité antioxydante, Valorisation.

Abstract

The pomegranate (*Punica granatum*) is an important crop for the arid and semi-arid areas. For this reason, a greater interest has been observed in the last years for increasing their cultivation and diverse research has been carried out to enlarge the industrialization as much the fruit. On the other hand, the fruit possesses strong antioxidant and anti-inflammatory activities linked to the presence of anthocyanins, tannins, and ellagic acid which have an interesting therapeutic capacity to inhibit the proliferation of cancer cells. In this study, eighteen pomegranate (*Punica granatum*) cultivars collected at INRA in Meknes-Morocco were analyzed. The study also showed a statistically significant differences were observed between pomegranate cultivars investigated in all parameters measured. The antioxidant capacity and composition of phenolic compounds of pomegranate juices, which varied de 1385 to 9476 mg GAE/L, were influenced by the type of cultivar to a large extent. On the second part of this work, the stability of polyphenols and anthocyanins were determined as a function of temperature. The results showed that the composition of these compounds decreases after each thermal treatment due to their degradation. However, the third part analyzes the efficiency of pectinase and protease enzymes used in the clarification treatments of pomegranate juice. The pectinase treatment has a significant reduction of turbidity. The combination of both enzymes gives a good result in the term of reduction of turbidity. Finally the last part was devoted on modeling of microbial growth which consist to apply mathematical models provided by the data base ComBase on the pomegranate juice, the results showed that at the minimum values of temperature, pH and water activity ensure a long life of up to one month and the ComBase model is generally safe for this type of juice.

Key Words

Pomegranate, *Punica granatum*, Cultivar, Fruit juice, Phenolic composition, Ellagic acid, Antioxidant activity, valorization.