

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH –ALGER

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر-

DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Option : Sciences Alimentaires

THEME

**Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux
(cas de la grenade *Punica granatum* L.) en vue de leur utilisation alimentaire**

Présenté par : BENDJABEUR Salah

Soutenu le : 04 / 12 / 2012

Jury :

Président : M. YOUYOU A. Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Directeur de thèse : M. AMMOUCHE A. Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Examineurs : M. BELLAL M.M. Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

M. BENCHABANE O. Maitre-Assistant (E.N.S.A. El Harrach)

Année universitaire 2011-2012

ملخص :

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم الخصائص المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة لمستخرج قشور الرمان (م.ق.ر) Punica granatum L. في المختبر والاستقرار للأكسدة لزيت عباد الشمس وزيت الصويا أثناء التخزين المسرع.

وأظهرت النتائج أن (م.ق.ر) غني جدا في إجمالي البوليفينول (448.4 ملغم/غ GAE), الفلافونويد (30.37 ملغ/غ QE), القابلة للتحليل المائي (374,37 ملغ/غ TAE). أنها فعالة ضد نمو البكتيريا *Pseudomonas a.*, *Bacillus s.*, *Staphylococcus a.*, *Klebsiella p.* وأعطى مناطق تثبيط قطرها يتراوح ما بين 10 إلى 26 مم وقيم MIC تتراوح ما بين 62,5 و500 ميكروغرام / مل. أظهر (م.ق.ر) نشاط مضادات الأكسدة عالي: و IC50 (اختبار DPPH) التي تم الحصول عليها لح. الاسكوربيك، BHT، و α -توكوفيرول هي على التوالي: $2,903 \pm 0,002$ ، $5,49 \pm 0,039$ ، $7,113 \pm 0,166$ ، $28,15 \pm 0,767$ (كانت الطاقة الارجاعية): $11,05 \pm 0,01$ ، $25,78 \pm 0,10$ ، $26,74 \pm 0,17$ في $0,17 \pm 49,95$ في $0,01 \pm 500$ ميكروغرام/ مل على التوالي. نشاط تثبيط البيروكسيد عند 0,5 ملغ / مل مرتفع حسب الترتيب التالي: α -توكوفيرول \square EPG \approx BHT. نشاط تثبيث المعدن Fe^{+2} عالي ولكن أقل من EDTA. نتائج الزيوت المؤكسدة تشير إلى أن (م.ق.ر) أظهرت النشاط المضادة للأكسدة أعلى من ذلك من (200 جزء في المليون BHT) في زيت عباد الشمس (500 و1000 جزء في المليون) ونفس النشاط في زيت الصويا (1000 جزء في المليون).

ولذلك، فإن هذه الدراسة تشير إلى أن يمكن اعتبار المستخرج من جلد الرمان مصدر جيد للمركبات الطبيعية يمكن استخدامها مع نشاط مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات في الصناعات الغذائية كمادة حافظة في المنتجات الغذائية متعددة الوظائف.

كلمات مفتاحية :

مستخرج قشور الرمان (م.ق.ر)، مادة البوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط البكتيري، الاستقرار التأكسد، زيت عباد الشمس، زيت الصويا.

Résumé :

Le but de cette étude est d'évaluer les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de l'extrait de la peau de grenade *Punica granatum L.* (EPG) *in vitro* ainsi que la stabilité oxydative des huiles de tournesol et de soja stabilisées avec cet extrait pendant le stockage accéléré.

Les résultats ont montré que l'EPG est très riche en polyphénols totaux (448,4 mg/g EAG), en flavonoïdes (30,37 mg/g EQ) et en tanins hydrolysables (374,37 mg/g EAT). Il est efficace contre la croissance des bactéries *Staphylococcus a.*, *Bacillus s.*, *Pseudomonas a.*, *Klebsiella p.* et a donné des zones d'inhibition dont le diamètre varie entre 10 à 26 mm et des CMI variant entre 62,5 et 500 μ g/ml. L'EPG a montré une activité antioxydante élevée : Les IC₅₀ (test DPPH) obtenus pour Ac. Ascorbique, EPG, BHT, et α -Tocophérol sont respectivement : $2,903 \pm 0,002$; $5,49 \pm 0,039$; $7,113 \pm 0,166$; $28,15 \pm 0,767$ μ g/mL. Les EC₅₀ (pouvoir réducteur) sont : $11,05 \pm 0,01$; $25,78 \pm 0,10$; $26,74 \pm 0,17$; $49,95 \pm 0,01$ μ g/mL respectivement. Une activité d'inhibition de la peroxydation à 0,5 mg/ml élevée et qui suit l'ordre suivant : EPG \approx BHT \square α -tocophérol. Une activité de chélation élevée mais inférieure à celle de l'EDTA. Les résultats de la stabilité oxydative des huiles indiquent que l'EPG a montré une activité antioxydante plus élevée que celle du BHT (200 ppm) dans l'huile de tournesol (500 et 1000 ppm) et la même activité dans l'huile de soja (1000 ppm).

Par conséquent, cette étude indique que l'extrait de la peau de grenade peut être considéré comme une bonne source des composés naturels aux activités antioxydante et antimicrobienne pouvant être utilisés dans l'industrie alimentaire comme conservateur multi-fonctionnel dans les produits alimentaires.

Mots clés :

Extrait de peau de grenade (EPG), Polyphénols, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, stabilité oxydative, huile de tournesol, huile de soja.

Summary:

The purpose of this study is to evaluate the antimicrobial and the antioxidant pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract (PPE) of in vitro and the oxidative stability of sunflower oil and soybean oil stabilized by this extract during accelerated storage.

The results showed that the PPE is very rich in total polyphenols (448.4 mg/g GAE), flavonoids (30.37 mg/g QE) and hydrolysable tannins (374,37 mg/g TAE). It is effective against *Staphylococcus a.*, *Bacillus s.*, *Pseudomonas a.*, *Klebsiella p.* bacteria growth and gave inhibition zones diameters that vary between 10 to 26 mm and MIC values ranging between 62.5 and 500 mg/ ml. The PPE showed a high antioxidant activity: The IC₅₀ (DPPH test) obtained for A. Ascorbic, PPE, BHT, and α -tocopherol are respectively: 2.903 ± 0.002 , 5.49 ± 0.039 , 7.113 ± 0.166 , 28.15 ± 0.767 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The EC₅₀ (reducing power) were: 11.05 ± 0.01 , 25.78 ± 0.10 , 26.74 ± 0.17 , 49.95 ± 0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. A high inhibition activity of peroxidation at 0.5 mg / ml following the order: BHT \approx EPG \square α -tocopherol. High chelating activity but less than the EDTA's. The results of oxidative stability of oils indicate that the PPE showed a higher antioxidant activity than that of the BHT (200 ppm) in sunflower oil (500 and 1000 ppm) and the same activity in soybean oil (1000 ppm).

Therefore, this study indicates that the pomegranate peel extract can be considered as a good source of natural compounds with antioxidant activity and antimicrobial and used in the food industry as a preservative in multi-functional food products.

Keywords :

Pomegranate peel extract (PPE), Polyphenols, Antioxidant activity, antimicrobial activity, oxidative stability of sunflower oil, soybean oil.

REMERCIEMENTS

Louange à Allah le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à M. AMMOUCHE Ali, Professeur à l'ENSA, pour m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à remercier M. YOUYOU Achène, Professeur à l'ENSA, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande considération.

Mes vifs remerciements vont également à M. BELLAL Mohand Mouloud, Professeur à l'ENSA pour avoir accepté de faire partie du jury d'examen.

Je remercie M. BENCHABANE Othmane, Maître-assistant classe A pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu voir la lumière du jour sans l'aide précieuse des personnes suivantes :

- L'ensemble du personnel du département de technologie alimentaire et nutrition humaine en particulier M. BEN LAHMER Mohammed et M. BEN ALIA Mohammed.
- L'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie de CRD-SAIDAL en particulier M. SALAH Mohammed et Mlle. AKKACHE Lynda.
- M. HADJAL Samir Directeur adjoint chargé de la recherche et du développement et M. ALLIANE Khellaf ingénieur chargé du développement produit à l'entreprise CEVITAL SPA.
- Tous mes collègues du département de technologie alimentaire et de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et que j'ai peut-être omis de citer.

DEDICACES

A mes chers parents que Dieu protège

En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses

A mes chers frères qui m'ont toujours encouragé et soutenu. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma grande gratitude

A tous mes amis

A moi-même

SOMMAIRE

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'oxydation des lipides	3
1.1. Théorie de l'oxydation lipidique	4
1.2. Définition et propriétés des radicaux libres	5
1.3. Oxydation des graisses et des huiles.....	6
1.4. Evaluation de l'état d'oxydation	9
1.5. Les conséquences de l'oxydation des lipides	11
1.6. Inhibition de la peroxydation des lipides.....	11
II. Les antioxydants	12
2.1. Définition d'un antioxydant.....	12
2.2. Utilité alimentaire	12
2.3. Propriétés	12
2.3.1. Les antioxydants synthétiques	13
2.3.2. Les antioxydants naturels	13
2.4. Mécanismes d'action des antioxydants :.....	14
2.4.1. Antioxydants préventifs	14
- La détoxification des ERO.....	15
- Les chélateurs de métaux de transition.	15
- Désactivateurs de l'oxygène singulet	16
2.4.2. Antioxydants « chain breaking » ou mécanisme briseur de chaîne	16
- Les donneurs d'hydrogène	17

- Les antioxydants « sacrifiés »	17
2.5. Les études d'efficacité des antioxydants	17
2.5.1. des tests très modélisés.	18
2.5.2. des tests d'oxydabilité accélérée types test Rancimat.	18
2.5.3. les tests en conditions accélérées en enceinte thermostatée.	18
III. Polyphénols	19
3.1. Définition	19
3.2. Structure et classification des polyphénols	19
3.2.1. Formes les plus simples	20
a. Les acides phénoliques	20
b. Les flavonoïdes	21
c. Autres exemples	22
3.2.2. Formes condensés	23
a. Les tanins	23
b. Lignines	24
3.3. Les grands aspects de la biosynthèse des polyphénols	24
3.4. Rôle des polyphénols	27
3.5. Propriétés antioxydantes des polyphénols	28
3.5.1. Composés phénoliques comme piègeurs de radicaux libres et chélateurs des métaux	28
3.5.2. Activité pro-oxydante des composés phénoliques	29
IV. Grenadier	30
4.1. Classification botanique	31
4.2. Le grenadier en Algérie	32
4.3. Composition biochimique du fruit	33
4.4. Les constituants du fruit de grenade	34
4.4.1. Tanins	34
4.4.2. Flavonoïdes	36

4.4.3.	Alcaloïdes	38
4.4.4.	Acides organiques	38
4.4.5.	Triterpènes et stéroïdes.....	38
4.4.6.	Autres composés	38
4.5.	Activités biologiques de grenade	40
4.5.1.	Activité antioxydante	40
4.5.2.	Activité antidiabétique :	41
4.5.3.	Activité antifatigue	42
4.5.4.	Activité antimicrobienne	43
4.5.5.	Activité cicatrisante	43
4.5.6.	Action anti-ulcère	44
4.5.7.	Action anticancéreuse	44
4.6.	Toxicité des polyphénols de grenade	44
4.7.	Extrait de peau de grenade comme additif fonctionnel	45

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I.	Extraction, dosage et évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.....	48
1.1.	Matériel végétal	48
1.2.	Extraction des polyphénols de la poudre de peau de grenade	48
1.2.1	Calcul du rendement de l'extraction	48
1.3.	Dosage des composés phénoliques	48
1.3.1.	Polyphénols totaux	48
1.3.2.	Flavonoïdes	49
1.3.3.	Tanins hydrolysables	50
1.4.	Détermination de l'activité antioxydante	50
1.4.1.	Pouvoir réducteur	50
1.4.2.	Pouvoir de piégeage du radical DPPH	51
1.4.3.	Activité antioxydante totale dans le système acide linoléique	52

1.4.4.	Activité de chélation des métaux :	53
II.	Test de la stabilité oxydative des huiles à l'étuve ou test de Schaal	54
2.1.	Choix des huiles	54
2.2.	Préparations des concentrations	54
2.3.	Test à l'étuve ou test de Schaal	54
2.4.	Les analyses des huiles	54
2.4.1.	Détermination des diènes conjugués (DC)	54
2.4.2.	Détermination de l'indice de peroxyde (IP)	55
2.4.3.	Indice de <i>para</i> -Anisidine (IPA)	56
2.4.4.	Dosage des acides gras par chromatographie phase gaz (CPG)	57
III.	Activité antimicrobienne	59
3.1.	Etude de l'effet inhibiteur (analyse qualitative)	59
3.1.1.	Souches microbiennes testées	59
3.2.	Etude quantitative de l'effet antimicrobien	62
3.2.1.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide	62
3.2.2.	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	63
IV.	Analyses statistiques des données	63

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I.	Rendement et teneur en composés phénoliques de l'extrait sec	64
1.1.	Rendement en extrait sec	64
1.2.	Teneur en composés phénoliques de l'extrait sec (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins hydrolysables)	65
1.3.	Activité antioxydante	68
1.3.1.	Pouvoir de piégeage du radical DPPH	69
1.3.2.	Le pouvoir réducteur	74
1.3.3.	Peroxydation de l'acide linoléique	77
1.3.4.	Chélation de fer	81

II.	Etude de la stabilité oxydative des huiles végétales.....	85
2.1.	Indice de peroxyde.....	85
2.2.	Indice de <i>p</i> -Anisidine	89
2.3.	Les diènes conjugués	93
2.4.	Profil en acides gras des huiles étudiées	98
2.5.	Différence entre l'activité antioxydante des antioxydants liposolubles synthétiques et naturels.....	101
III.	Activité antimicrobienne.....	102
3.1.	Définition d'un antimicrobien	102
3.2.	Analyse qualitative (détermination des zones d'inhibition des souches microbiennes) ...	102
3.3.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	105
3.4.	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	108
	Conclusion générale	110
	Références bibliographiques	113
	Annexes	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mécanismes d'oxydation des lipides	5
Tableau 2 : Méthodes d'évaluation de l'état d'oxydation des huiles.....	10
Tableau 3 : Classes des composés phénoliques dans les plantes.....	20
Tableau 4 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie	33
Tableau 5 : Constituants du fruit et de l'arbre de <i>Punica granatum</i>	39
Tableau 6 : Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.....	59
Tableau 7 : Rendement et teneur en composés phénoliques.....	64
Tableau 8 : Rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs	65
Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les différents composés antioxydants..	70
Tableau 10 : La concentration inhibitrice IC ₅₀ (µg/mL) du radical DPPH.....	72
Tableau 11 : Pouvoir réducteur des différents antioxydants testés.....	74
Tableau 12 : La concentration effective EC ₅₀ (µg/mL) des différents antioxydants	76
Tableau 13 : Absorbance des produits de la peroxydation de l'acide linoléique.....	78
Tableau 14 : Activité d'inhibition de l'autooxydation de l'acide linoléique	79
Tableau 15 : Pourcentages de chélation de fer Fe ²⁺ en présence de la ferrozine	82
Tableau 16 : Indices de peroxydes (mécO ₂ /kg) de l'huile de tournesol au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours	85
Tableau 17 : Indices de peroxydes (mécO ₂ /kg) de l'huile de soja au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours	87
Tableau 18 : Indices de <i>p</i> -Anisidine de l'huile de tournesol au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours	90
Tableau 19 : Indice de <i>p</i> -Anisidine de l'huile de soja au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours.....	92
Tableau 20 : Coefficients d'extinction (<i>E</i> ₂₃₂) nm de l'huile de tournesol au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours	94

Tableau 21 : Coefficients d'extinction (E_{232}) nm de l'huile de soja au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours	95
Tableau 22 : Composition en acides gras (%) de l'huile de tournesol avant et après oxydation.....	98
Tableau 23 : Composition en acides gras (%) de l'huile soja avant et après oxydation.....	99
Tableau 24 : Vitesse relative d'oxydation avec oxygène moléculaire des acides gras de la famille C:18	100
Tableau 25 : Rapport acide linoléique/acide palmitique (C18.2/C16:0) des deux huiles étudiées.	100
Tableau 26 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches microbiennes testées	103
Tableau 27 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des souches bactériennes	105
Tableau 28 : Concentration minimale bactéricide (CMB) des souches bactériennes.....	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réactions possibles du processus d'auto-oxydation.....	6
Figure 2 : Réactions possibles de production des hydroperoxydes.....	7
Figure 3 : Formation des hydroperoxydes par photo-oxydation d'un lipide avec un sensibilisateur ..	8
Figure 4 : Schéma des réactions d'oxydation des lipides	9
Figure 5 : Formules développées du BHA et du BHT	13
Figure 6 : Acides phénoliques typiques dans les aliments.....	21
Figure 7 : Structure générique d'une molécule de flavonoïde	22
Figure 8 : Les principales classes des flavonoïdes.....	22
Figure 9 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes des composés phénoliques	26
Figure 10 : Relations biosynthétiques entre les phénylpropanoïdes et les flavonoïdes	27
Figure 11 : Voie de biosynthèse des ellagitanins dans la grenade	35
Figure 12 : Structure de l'acide ellagique, gallique et les punicalagines A & B	36
Figure 13 : Représentation schématique de la voie biosynthétique des flavonoïdes menant à la production des anthocyanines et des proanthocyanidines.....	37
Figure 14 : Effets bénéfiques de peau de grenade et ses extraits	42
Figure 15 : Réactions possibles entre le réactif de p-anisidine et le malonalaldéhyde.....	56
Figure 16 : Illustration de la méthode d'aromatogramme	61
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	65
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux	66
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables	66
Figure 20 : Composition de l'extrait de peau de grenade en composés phénoliques.....	67
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration.....	70
Figure 22 : Concentration inhibitrice IC ₅₀ du radical DPPH des différents composés antioxydants	73
Figure 23 : Evolution de pouvoir réducteur des antioxydants en fonction de la concentration.....	75

Figure 24 : Concentration effective (EC ₅₀) de pouvoir réducteur des différents antioxydants.....	76
Figure 25 : Evolution de la peroxydation de l'acide linoléique en fonction du temps	78
Figure 26 : Activité d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique	79
Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de Fe ²⁺ en présence de la ferrozine en fonction de la concentration	82
Figure 28 : Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C.....	86
Figure 29 : Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C.....	88
Figure 30 : Evolution de l'indice de <i>p</i> -anisidine de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C	90
Figure 31 : Evolution de l'indice de <i>p</i> -anisidine de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C.....	92
Figure 32 : Un hydroperoxyde d'acide gras polyinsaturé avec un diène conjugué	94
Figure 33 : Evolution de la teneur en diènes conjugués de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C.....	95
Figure 34 : Evolution de la teneur en diènes conjugués des de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C.....	96

LISTE DES ABBREVIATIONS

AG :Acides gras

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AGS :Acides gras saturés

ATCC :American Type Culture Collection

BHA :Butyl-Hydroxy-Anisole

BHT :Butyl-Hydroxy-Toluène

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG :Chromatographie en phase gaz

DC : Diènes conjugués

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent acide gallique

EAT : Equivalent acide tannique

EP : Extrait phénolique

EPG :Extrait de peau de grenade

EEG :Extrait d'écorce de grenade

EQ : Equivalent quercétine

ERO : Espèces réactives à l'oxygène

GC-MS : Gaz Chromatography-Mass Spectrometry

HPLC : High performane liquid chromatography

HS : Huile de soja

HT : Huile de tournesol

HS ou HT-TEMOIN : Huile de soja ou de tournesol témoin (sans antioxydants)

HS ou HT-BHT : Huile de soja ou de tournesol additionnée de 200 ppm du BHT

HS ou HT-250 : Huile de soja ou de tournesol additionnée de 250 ppm de l'extrait

HS ou HT-500 : Huile de soja ou de tournesol additionnée de 500 ppm de l'extrait

HS ou HT-1000 : Huile de soja ou de tournesol additionnée de 1000 ppm de l'extrait

EC50 : Concentration effective à 0,5 d'absorbance

IC50 : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux

INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

IP : Indice de peroxyde

IPA : Indice de *para*-Anisidine

Jrs : Jours

Kg : Kilogramme

L : Litre

m : Mètre

mg : Milligramme

MH : Gélose Mueller-Hinton

mM : Millimole

min : Minute

ml : Millilitre

mm : Millimètre

nm : Nanomètre

ppm : Partie par million

SAB : Gélose Sabouraud

tr/mn : Tour par minute

TAG : Triacylglyceride

TBHQ : Tertiary-butyl-hydro-quinone

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-Violet

µg : Microgramme

¹O₂ : Oxygène singulet

³O₂ : Oxygène triplet

INTRODUCTION GENERALE

L'oxydation des lipides, qui est la cause principale de la détérioration de la qualité dans beaucoup de systèmes alimentaires, peut mener à une perte significative de la qualité alimentaire d'un aliment et causer des mauvais goûts et la formation des composés toxiques. Ce processus peut être lancé par exposition aux enzymes lipoxygénases, catalyseurs de métalloprotéines, chaleur, radiation ionisante, lumière et ions métalliques (**Daker et al., 2008**).

Pour cette raison, les antioxydants synthétiques tels que le butyl-hydroxy-anisole (BHA), butyl-hydroxy-toluène (BHT) et la tertiary-butyl-hydro-quinone (TBHQ) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme inhibiteurs potentiels de l'oxydation des lipides. Des rapports récents révèlent que ces composés peuvent être impliqués dans beaucoup de risques de santé, y compris le cancer et la carcinogénèse (**Hou, 2003; Prior, 2004**). Par conséquent, il y a une tendance vers l'utilisation des antioxydants naturels d'origine végétale pour remplacer ces antioxydants synthétiques (**Zheng et al., 2010**).

L'utilisation des antimicrobiens dans les aliments est également devenue de plus en plus nécessaire pendant que l'économie globale encourage la production et le transport des aliments dans le monde entier ; cependant, pour assurer l'approvisionnement en aliments de haute qualité, l'utilisation des conservateurs est essentielle (**Davidson et Branen, 2005**). L'application potentielle des composés antimicrobiens naturels par l'industrie alimentaire est énorme, et les études sur l'incorporation des antimicrobiens dans les aliments et pour maximiser leur bio-fonctionnalité ont été conduites dans le monde entier (**Naidu, 2000**).

Les industries agro-alimentaires génèrent, à partir de leur activité de transformation, des quantités importantes de déchets et co-produits d'origine organique. La valorisation de ces déchets représente des enjeux importants pour le monde agricole et agro-alimentaire. Les co-produits d'origine végétale sont intéressants car ils contiennent d'importantes molécules tels que les polyphénols. De nombreux co-produits ont été étudiés comme source d'antioxydants et d'antimicrobiens. De ce fait, leur utilisation est encouragée, vu l'importance accordée à l'activité biologique des polyphénols présents dans ces co-produits (**Agourram, 2004**).

Avec l'intérêt croissant pour les antimicrobiens et les antioxydants naturels dérivés des fruits, des légumes et de la plupart des plantes comestibles, en raison de leur utilisation et leur avantage dans la conservation des aliments et comme additifs alimentaires naturels, la recherche sur la grenade a été également un domaine scientifique intéressant pour les chercheurs (**Orak et al., 2011**).

La peau de grenade (*Punica granatum* L.) est une partie non comestible obtenue pendant le traitement du jus de grenade. La peau de grenade est une source riche en tanins, flavonoïdes et autres composés phénoliques (**Li et al., 2006**). Les propriétés antioxydantes et antibactériennes de la peau de grenade dans les systèmes modèles *in vitro* ont été rapportées (**Negi et Jayaprakasha 2003; Reddy et al., 2007; Opara et al., 2009; Alzoreky 2009**).

L'objectif de la présente étude est de déterminer les activités antioxydante et antimicrobienne de la peau de grenade, un sous-produit de jus afin d'exploiter son potentiel comme conservateur naturel et nutraceutique.

Cette étude est axée sur 3 parties principales :

- La première partie de ce travail est consacrée à l'extraction et le dosage des composés bioactifs tels que les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins hydrolysables ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de la peau de grenade;
- Dans la seconde partie, un essai de valorisation de l'extrait phénolique comme antioxydant naturel a été testé sur deux huiles végétales raffinées sans antioxydants à savoir : l'huile de tournesol et l'huile de soja.
- Dans la troisième partie, une évaluation du pouvoir antimicrobien a été réalisée par une analyse qualitative : par détermination des zones d'inhibition et par analyse quantitative: par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

I. L'oxydation des lipides :

En science des aliments, lorsque l'on parle de la réaction de l'oxygène moléculaire avec des TAG. On parle de l'« oxydation ». Plus formellement, cependant, il s'agit d'une réaction d'addition d'une molécule d'oxygène qui aboutit à la formation de radicaux peroxy (ROO^*). C'est la raison pour laquelle on utilise plutôt le terme de peroxydation des lipides insaturés. Globalement, il s'agit d'une réaction d'addition ou mieux d'insertion d'une molécule d'oxygène dans une liaison C-H. La peroxydation des lipides concerne tous les lipides contenant des AG insaturés quelle que soit leur provenance. Par ailleurs, elle intervient aussi dans de nombreux processus biologiques (**Bauer et al., 2010**).

La peroxydation lipidique est le facteur nuisible le plus commun dans les huiles végétales parmi les causes principales de la détérioration d'huile pendant le stockage ou le traitement des aliments contenant une grande quantité d'huile. L'oxydation des lipides se produit quand l'oxygène réagit avec des lipides particulièrement riches en acides gras insaturés et une série de réactions en chaîne de radicaux de libres mène aux complexes changements chimiques. L'oxydation provoque une saveur désagréable et un goût rance aussi bien que la perte de la valeur nutritionnelle des aliments et la formation des composés potentiellement toxiques pour la santé humaine (**Pan et al., 2007; Lambropoulos et Roussis, 2007**).

In vitro, l'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire qui utilise de plus en plus des acides gras hautement insaturés tels que ceux de la série n-3 (ω 3) très susceptibles à l'auto-oxydation. L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement), nutritionnelles (perte en vitamines) voir même une toxicité due aux produits issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes) (**Cillard et Cillard, 2006**).

In vivo, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules. Les lipoprotéines telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les LDL oxydées sont fortement incriminées dans l'athérogenèse.

De nombreuses autres pathologies sont associées à la peroxydation des lipides. C'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement... (Cillard et Cillard, 2006).

1.1. Théorie de l'oxydation lipidique :

L'oxydation des lipides est un phénomène complexe induit par l'oxygène en présence des initiateurs tels que la chaleur, les radicaux libres, la lumière, les pigments photosensibilisateurs et les ions métalliques. Elle se produit par l'intermédiaire de trois processus réactionnels :

- i. auto-oxydation non-enzymatique à chaîne par l'intermédiaire des radicaux libres ;
- ii. photo-oxydation non-enzymatique et non radicalaire et ;
- iii. oxydation enzymatique (Laguerre et al., 2007a).

Les deux premiers types de l'oxydation consiste en une combinaison de réactions impliquant l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$, qui pourrait être considéré comme état fondamental biradical $^{\circ}\text{OO}^{\circ}$, et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, qui correspond à un état excité de la molécule. Il y a de nombreuses sources de $^1\text{O}_2$ mais sa présence est souvent couplée à l'impact photonique UV en présence des photosensibilisateurs (Laguerre et al., 2007a).

Selon Frankel (1998), il y a deux types de photosensibilisateurs : type I pour la riboflavine, et type II pour la chlorophylle et l'érythrosine. Brièvement, le mécanisme de la photo-oxydation dépend du type de photosensibilisateur. Dans le type II de réactions, un photosensibilisateur triplet ($^3\text{sens}$, réaction (1)) absorbe des photons et devient un singulet, transmettant ensuite son énergie à l'oxygène moléculaire, qui à son tour devient excité et forme l'oxygène singulet – autour de 1500 fois plus réactif que l'oxygène triplet :

$h\nu$



L'oxygène singulet formé par la réaction (1) est électrophile et peut se lier ainsi directement aux doubles liaisons C=C, menant à la formation d'hydroperoxydes. Cependant, cette photo-oxydation non radicalaire semble être une réaction mineure par rapport à l'auto-oxydation (tableau 1) à chaînes radicales induite par $^3\text{O}_2$. Il a été ainsi suggéré que la photo-oxydation génère principalement des hydroperoxydes qui se décomposent en radicaux libres qui pourraient initier des réactions d'auto-oxydation (Cillard et Cillard, 2006).

L'auto-oxydation est la voie la plus importante et un mécanisme principal dans l'oxydation des lipides. Elle produit principalement des hydroperoxydes et des composés volatils, généralement

par un processus triphasé (initiation, propagation et terminaison). D'autres substances non polaires, tels que les terpènes, les stérols et les caroténoïdes, sont oxydées suivant des mécanismes similaires (Pokorny, 2003 ; Laguerre et al., 2007a).

Tableau 1 : Mécanismes d'oxydation des lipides (Pokorny, 2003)

Type d'oxydation	Lipides oxides	Catalyseur	Agent oxydant	Prévention
L'auto-oxydation	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	Antioxydants
Oxydation enzymatique	Lipides polyinsaturés	Lipooxygénases	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes
Oxydation due à l'oxygène singulet	Tous les lipides insaturés	Molécules photosensibles	Oxygène singulet	Piégeurs d'oxygène singulet

1.2. Définition et propriétés des radicaux libres :

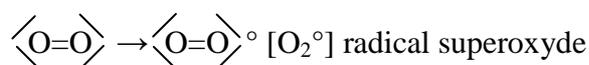
Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes dont les couches électroniques périphériques ont un électron en surnombre. Ils sont très réactifs vis-à-vis des autres radicaux libres ou de molécules désaturées. Ils donnent naissance à un édifice stable et alors la réaction s'arrête, ou bien il apparaît un nouveau radical à l'origine d'une réaction en chaîne (Frénot et Vierling, 2001).

La «réaction en chaîne» débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui «accaparant» son électron, et «la molécule attaquée» devient alors elle-même un radical libre (Pelli et Lyly, 2003).

Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN ou la membrane cellulaire. Suite à une exposition aux radicaux libres, il peut se produire une prolifération (multiplication anormale) des cellules, entraînant un cancer, un dysfonctionnement cellulaire ou la mort des cellules (Pelli et Lyly, 2003).

Les principaux radicaux libres oxygénés sont formés à partir de :

- l'oxygène moléculaire :



- l'eau :

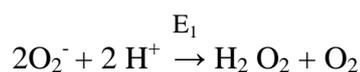


Le radical OH° est beaucoup plus oxydant que le superoxyde.

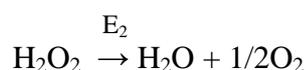
- l'ozone de la haute atmosphère :



- les substrats des transferts d'électrons dans les cellules. La cellule se défend en les éliminant par la voie enzymatique de la superoxyde dismutase.



E_1 = superoxyde dismutase des mitochondries, du cytoplasme



E_2 = catalase des peroxysomes (**Frénot et Vierling, 2001**).

1.3. Oxydation des graisses et des huiles

Dans les graisses et les huiles, le processus de l'oxydation est semblable à celui de l'oxydation de n'importe quel autre matériel organique insaturé et exige un processus d'initiation, afin de produire des radicaux libres à partir du substrat (**Wanasundara et Shahidi, 2005**).

- L'auto-oxydation :

L'auto-oxydation est la détérioration oxydative des acides gras insaturés par l'intermédiaire d'un processus auto-catalytique consistant en un mécanisme de chaîne de radicaux libres. Cette chaîne comprend les réactions d'initiation, propagation, et terminaison qui pourraient être cycliques une fois déclenchées.

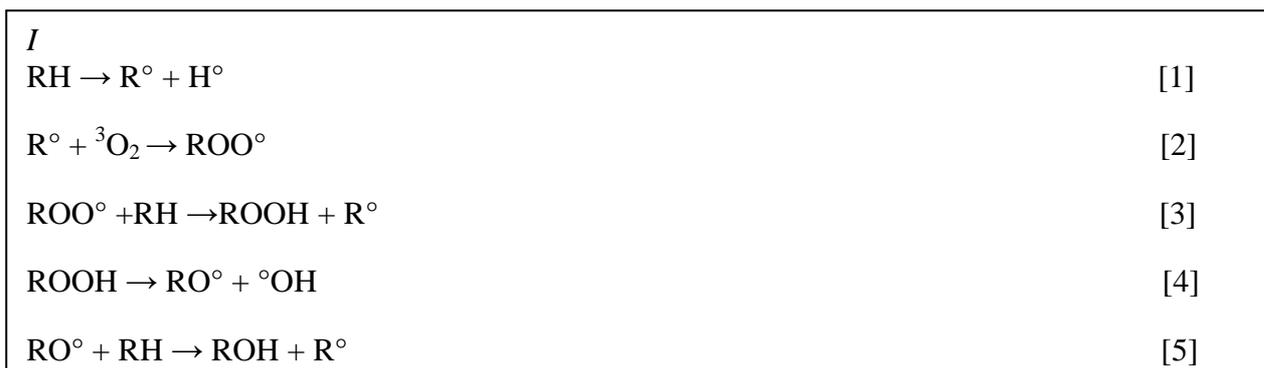


Figure 1 : Réactions possibles du processus de l'auto-oxydation (R est un groupe alkyle d'une molécule lipidique insaturée, H est un atome hydrogène α -méthylénique facilement détachable à cause de l'influence de l'activation de la double liaison ou des liaisons voisines, RO° est un radical alcoyle, ROO° est un radical peroxyde, I est un initiateur (**Wanasundara et Shahidi, 2005**).

Le processus d'initiation génère des radicaux libres à partir du substrat. L'atome H α -méthylénique est capté à partir de la molécule lipidique insaturée pour former un radical lipidique (alkyle). Le radical lipidique est fortement réactif et peut réagir avec l'oxygène atmosphérique ($^3\text{O}_2$), une réaction facile résultant de la nature di-radicalaire de la molécule d'oxygène, et il produit un radical peroxyde (ROO°) (réaction [2]).

Dans les réactions de propagation, le radical peroxyde réagit avec une autre molécule lipidique insaturée pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical lipidique instable (réaction [3]).

Pendant qu'un nouveau radical libre est produit à chaque étape, plus d'oxygène est incorporé au système. Le radical lipidique nouvellement propagé réagira alors avec l'oxygène pour produire un autre radical peroxyde, ayant pour résultat un mécanisme cyclique auto-catalysé (réaction [4]).

Les hydroperoxydes sont instables et peuvent se dégrader en radicaux qui accélèrent les réactions de propagation. Ce sont des étapes embranchantes du processus de l'auto-oxydation lipidique (réactions [5] et [6]).

Ces réactions en chaîne procèdent, et l'arrêt se produit seulement quand deux radicaux libres se combinent pour former un produit non radicalaire. L'auto-oxydation décompose les molécules du substrat aussi bien qu'elle forme de nouvelles molécules causant des gros changements dans les propriétés chimiques et physiques du substrat oxydé.

Un lipide qui contient des doubles liaisons subit l'auto-oxydation induite par de diverses manières. Il est maintenant clair que la décomposition des hydroperoxydes préformés, catalysée par un métal est la cause la plus susceptible du processus d'initiation.

L'oxydation thermique est également auto-catalytique et considérée comme catalysée par un métal parce qu'il est très difficile d'éliminer les traces des métaux (des graisses et huiles ou des aliments) qui agissent comme catalyseurs et elle peut se produire comme proposé dans la réaction [4]. Les métaux redox de valence variable peuvent également catalyser la décomposition des hydroperoxydes (réactions [6] et [7]).



Figure 2 : Réactions possibles de production des hydroperoxydes (M^{n+} est l'ion métallique à valence transitoire) (Wanasundara et Shahidi, 2005).

L'oxydation photosensibilisée ou l'oxydation catalysée par la lipoxygénase produisent également des hydroperoxydes.

- **La photo-oxydation ou auto-oxydation par l'oxygène singulet :**

La photo-oxydation directe est provoquée par les radicaux libres produits par le rayonnement ultraviolet qui catalyse la décomposition des hydroperoxydes et des peroxydes. Cette oxydation procède comme réaction en chaîne de radicaux libres. Bien qu'il devrait y avoir une irradiation directe de la lumière UV pour le substrat lipidique, qui est habituellement rare sous pratiques normales, les métaux et les complexes métalliques de l'oxygène peuvent s'activer et générer des radicaux libres ou de l'oxygène singulet.

L'oxydation photosensibilisée est une réaction directe activée par la lumière, l'oxygène singulet avec les acides gras insaturés, et par la suite, les hydroperoxydes se forment.

L'oxydation photosensibilisée se produit à cause de la présence des molécules qui peuvent absorber la lumière visible ou UV proche pour devenir électroniquement excitées (sensibilisateurs) (réaction 8).

Les pigments initiant l'oxydation photosensibilisée dans les aliments incluent les chlorophylles, les hémoprotéines, et la riboflavine. Le type sensibilisateur I sert de radical libre initiateur photo-chimiquement activé, et le type sensibilisateur II dans l'état triplet interagit avec l'oxygène par transfert d'énergie pour former l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui réagit de même avec un lipide insaturé (réaction 9). Dans des conditions d'oxydation photosensibilisée, la réaction des lipides insaturés avec l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) mène à la formation rapide des hydroperoxydes (réaction 10).

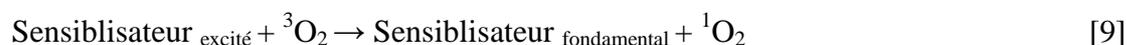


Figure 3 : Formation des hydroperoxydes par photo-oxydation d'un lipide avec un sensibilisateur ($h\nu$ est l'énergie sous forme de lumière UV, les sensibilisateurs qui sont naturellement présents dans les pigments photosensibles, leurs produits de dégradation, ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques capables de transférer l'énergie à partir de la lumière aux molécules chimiques) (Wanasundara et Shahidi, 2005).

Qu'ils soient formés par l'un ou l'autre des mécanismes décrits ci-dessus, les hydroperoxydes ROOH s'accumulent dans l'huile. Ce sont des molécules instables, surtout en présence d'ions

métalliques tels que Fe^{2+} et Cu^+ ou à des températures dépassant $60\text{ }^\circ\text{C}$. Les nouveaux radicaux qu'ils produisent, notamment les alcoxyles RO^\bullet et les hydroxyles OH^\bullet , vont à leur tour alimenter l'auto-oxydation des AGI ou trouver pour cibles d'autres composés tels que les vitamines, les pigments, ou encore les protéines dans le cas de produits formulés. Les radicaux alcoxyles sont également à l'origine de réactions de scission, de cyclisation et de polymérisation. Ces réactions, dites de terminaison, vont donner naissance à une multitude de composés, parmi lesquels des composés volatils et très odorants responsables de l'apparition de la note rance. Les produits non volatils sont plus ou moins oxygénés, cyclisés et polymérisés. S'y ajoutent les polymères d'origine thermique en cas de chauffage intensif, qui peu à peu vont contribuer à l'augmentation de la viscosité de l'huile (Cuvelier et Maillard, 2012).

Les réactions de l'oxydation mentionnées ci-dessous sont résumées dans la figure 4.

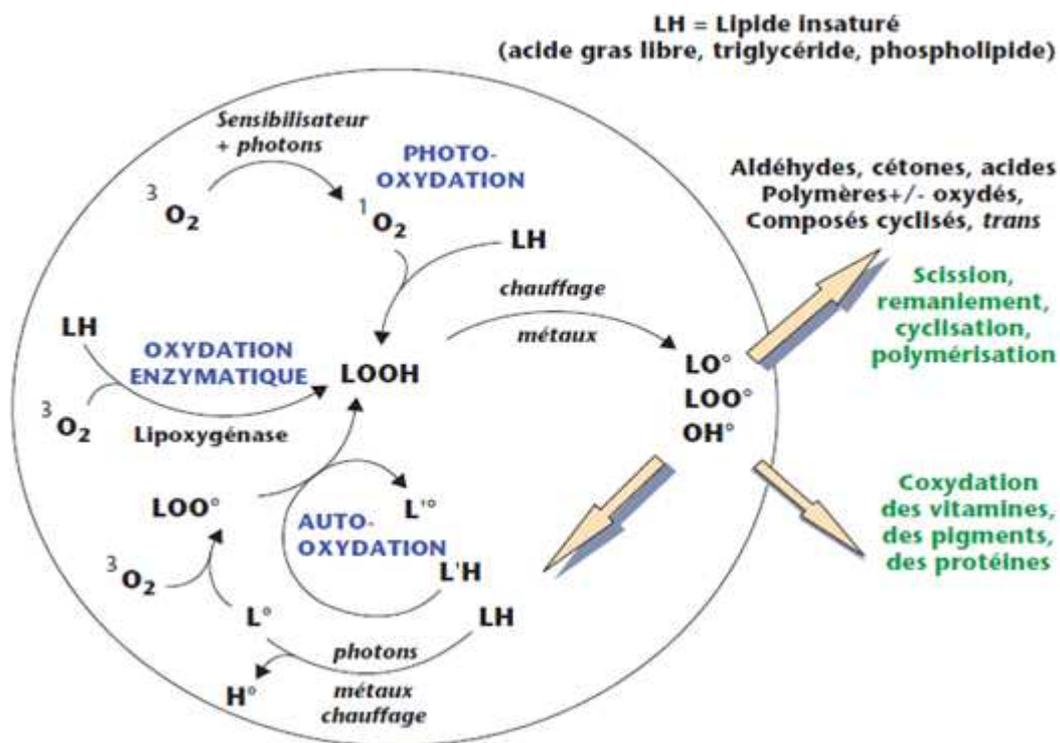


Figure 4 : Schéma des réactions d'oxydation des lipides (d'après Berset et Cuvelier, 1996)

1.4. Evaluation de l'état d'oxydation :

L'état d'oxydation dans lequel se trouve une huile peut être mesuré de diverses manières, selon que l'on dose l'apparition des produits primaires d'oxydation (diènes conjugués, hydroperoxydes) ou des produits secondaires (polymères, composés volatils. . .), la consommation d'oxygène ou des acides gras insaturés, ou encore la co-oxydation d'autres substrats, tels que des pigments ou des protéines (Cuvelier et Maillard, 2012).

Le tableau 2 présente les diverses méthodes et normes françaises ou internationales actuellement disponibles. La diversité des techniques avec leurs limites, leurs sensibilités et leurs spécificités rend difficile la comparaison des résultats. L'analyse sensorielle reste bien sûr la méthode de choix puisqu'elle est la seule à rendre compte parfaitement de l'état d'acceptabilité mais elle reste lourde à mettre en œuvre (Cuvelier et Maillard, 2012).

Tableau 2 : Méthodes d'évaluation de l'état d'oxydation des huiles

<i>Marqueurs d'oxydation</i>	<i>Méthodes</i>
<i>Niveau d'insaturation</i>	Indice d'iode (mesure colorimétrique) (Norme AFNOR NF EN ISO 3961)
<i>Profil en acides gras</i>	Dosage par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse des triglycérides (Norme AFNOR NF EN ISO 12966-2 et 5508)
<i>Teneur en acides gras libres</i>	Indice d'acide par colorimétrie (Norme AFNOR NF EN ISO 660)
<i>Teneur en diènes conjugués</i>	Mesure par spectrophotométrie UV (Norme AFNOR NF EN ISO 3656)
<i>Taux de peroxydes</i>	Indice mesure par iodométrie (Norme AFNOR NF EN ISO 3960) ou potentiométrie (ISO 27107)
<i>Présence d'aldéhydes</i>	Indice de para-Anisidine par spectrophotométrie (Norme AFNOR NF EN ISO 6885) Test TBA (acide 2-thiobarbiturique) par spectrophotométrie
<i>Taux de polymères</i>	Mesure directe par chromatographie liquide haute performance d'exclusion (AFNOR NF EN ISO 16931) ou par viscosité
<i>Taux de composés polaires</i>	Chromatographie liquide d'absorption et gravimétrie (Norme AFNOR NF EN ISO 8420)
<i>Composés volatils</i>	Mesure par chromatographie en phase gazeuse de l'espace gazeux (AOCS Recommended Practice Cg 1-83, 4-94)
<i>Rancidité</i>	Analyse sensorielle avec juges experts (AOCS Recommended Practice Cg 2-83)

Chaque mesure apporte ainsi une information partielle sur un phénomène global, l'idéal étant d'évaluer l'état d'oxydation par plusieurs méthodes complémentaires, permettant de suivre en parallèle la formation des produits primaires et secondaires (Cuvelier et Maillard, 2007 ; Frankel, 1998).

1.5. Les conséquences de l'oxydation des lipides :

La conséquence la plus perceptible de l'oxydation des lipides est l'apparition d'odeurs et de saveurs désagréables souvent qualifiées de rance. Ces odeurs qui conduisent souvent au rejet de l'aliment par le consommateur peuvent être perçues très précocement. Elles sont liées à la formation de composés volatils aux seuils de détection olfactifs très bas. L'oxydation des lipides peut également induire une modification de la couleur des produits par co-oxydation des pigments qu'ils soient liposolubles ou hydrosolubles (**Villière et Genot, 2006**). C'est le cas par exemple des caroténoïdes dans la margarine ou le pain (**Prior., 2003**), ou de l'accélération de l'oxydation de la myoglobine dans la viande (**Genot, 2000**). L'oxydation peut affecter la texture des aliments, en raison de la réaction des protéines avec les produits d'oxydation (**Kanner, 1994 ; Genot et al., 2003 ; Pokorny, 2003**). Elle affecte également la valeur nutritionnelle des aliments en entraînant la perte d'acides gras essentiels mais aussi de vitamines et d'acides aminés indispensables.

Enfin, la toxicité de produits d'oxydation des lipides a été observée lors de l'administration de doses importantes de ces composés à des animaux. Or, même s'il est rare de consommer des aliments contenant des quantités importantes de produits d'oxydation, notamment en raison de l'odeur que ces produits développent, il existe à ce jour peu de données quant aux risques liés à une ingestion régulière d'aliments faiblement oxydés. Enfin, les risques liés à la peroxydation lipidique au cours du passage et de la transformation des aliments dans le tractus digestif commencent seulement à être considérés (**Villière et Genot, 2006**).

1.6. Inhibition de la peroxydation des lipides

L'auto-oxydation des lipides insaturés ne peut être évitée qu'en l'absence totale d'oxygène. En pratique, elle ne peut jamais être totalement exclue, mais uniquement freinée ou retardée en mettant en œuvre les moyens suivants :

- exclusion partielle de l'oxygène: possible par un emballage sous vide ou par adjonction de glucose oxydase dont l'action est de consommer l'oxygène résiduel.
- entreposage à basse température et dans l'obscurité. La vitesse de l'auto-oxydation s'en trouve réduite. Pour les fruits et légumes qui contiennent l'enzyme lipoxygénase, cette mesure est en règle générale insuffisante: une dégradation peut uniquement être évitée si l'enzyme a été inactivée par un blanchiment préalable,
- addition d'antioxydants (**Bauer et al., 2010**).

II. Les antioxydants :

2.1.Définition d'un antioxydant:

Dans un système biologique, un antioxydant est défini comme toute substance qui, si présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Halliwell, 1995 ; Halliwell et Gutteridge, 1999**).

En termes d'aliments, les antioxydants peuvent être définis comme toutes les substances qui sont capables de retarder ou empêcher le développement de la rancidité ou de toute autre détérioration de saveur dans les aliments due à l'oxydation. Les antioxydants retardent le développement des mauvaises odeurs en étendant la période d'induction. L'addition des antioxydants après la fin de cette période tend à être inefficace à retarder le développement de rancidité (**Gülçin, 2011**).

Le substrat oxydable peut être toute molécule qui se trouve dans les aliments ou matériaux biologiques, y compris les hydrates de carbone, l'ADN, les lipides, et les protéines. L'aliment est un système à plusieurs composants constitué de variété de biomolécules, et donc, cette définition décrit bien un antioxydant (**Wanasundara et Shahidi, 2005**).

2.2.Utilité alimentaire :

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences sur la sécurité alimentaire. L'activité antioxydante est évaluée soit par le dosage des produits formés (en particulier des hydroperoxydes) par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres.

Pour limiter l'oxydation, l'industrie agroalimentaire peut baisser le taux d'oxygène (immersion, vide, atmosphère sous azote), ralentir les réactions par réfrigération ou congélation, détruire les enzymes d'oxydation (polyphénols oxydases) par blanchiment, et user d'antioxydants inhibant l'oxydation induite par l'oxygène moléculaire.

En limitant les risques de radicaux libres, la présence d'antioxydants, combinée à d'autres techniques, est indispensable à la stabilité des produits. (**Marc et al., 2004**).

2.3.Propriétés :

L'antioxydant alimentaire idéal, et facilement incorporable et efficace à faible dose, est non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable. Il est résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini (**Marc et al., 2004**).

Il s'agit, en fait, d'agents de prévention ou de terminaison capables d'éviter ou de piéger les radicaux libres en bloquant l'initiation, en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène ou en déviant de l'aliment les effets de lumière ou les rayonnements (Wannas, 2000).

Bien que la plupart des matières premières utilisées contiennent déjà des antioxydants naturels, durant les procédés de fabrication des aliments, ils en sont appauvris, nécessitant l'addition d'antioxydants synthétiques. Les antioxydants peuvent être efficaces à de très faibles concentrations, 0,01%, mais ils ne peuvent ni rendre le processus d'oxydation réciproque ni prévenir la rancidité hydraulique (Madhavi et al., 1996).

2.3.1. Les antioxydants synthétiques :

Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes: ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à de faibles concentrations (0,01-0,02%) et être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment. De ce fait, les antioxydants fortement lipophiles sont particulièrement indiqués pour des émulsions de type huile dans eau H/E (p. ex. BHA, BHT, tocophérol, gallate de dodécyle). En revanche, les antioxydants TBHQ, plus fortement polaires, et les gallates de propyle sont particulièrement actifs dans les graisses et les huiles, étant donné qu'ils se trouvent surtout dans l'interface lipide-air. Ces antioxydants doivent pouvoir résister aux opérations unitaires de la technologie alimentaire.

Cependant l'utilisation des antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) (figure 5) dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (Chavéron, 1999).

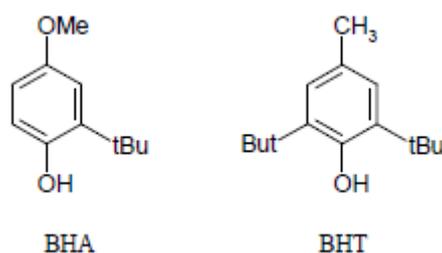


Figure 5 : Formules développées du BHA et du BHT

2.3.2. Les antioxydants naturels :

Le remplacement des antioxydants synthétiques par ceux naturels peut avoir des avantages dus aux implications de santé et à la fonctionnalité telle que la solubilité dans l'huile et l'eau, d'intérêt pour les émulsions, dans les systèmes alimentaires. Cependant, certains d'entre eux comme

ceux des épices et des herbes (origan, thym, dictame, marjolaine, lavande, romarin) ont des applications limitées malgré leur activité antioxydante élevée, parce qu'ils donnent une saveur caractéristique de l'herbe à l'aliment, et donc, des étapes de désodorisation sont requises (**Reglero et al., 1999**).

Les caractéristiques organoleptiques des extraits doivent convenir à l'incorporation dans les produits alimentaires sans conférer la saveur intense de l'herbe qui peut limiter quelques applications, comme se produit pour l'extrait naturel de romarin qui a d'excellentes propriétés antioxydantes (**Moure et al., 2001**).

La majorité des antioxydants naturels sont les composés phénoliques, et les groupes les plus importants des antioxydants naturels sont les tocophérols, les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Gülçin, 2011**).

2.4.Mécanismes d'action des antioxydants :

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation (**Leger, 2006**).

Selon cette classification, certains antioxydants présentent plus d'un mécanisme d'activité, par conséquent, appelés antioxydants multiples-fonctions. Une autre classification couramment utilisée catégorise les antioxydants en antioxydants primaires : piègeurs de l'oxygène, et antioxydants secondaires : enzymatiques et chélateurs/séquestrants (**Wanasundara et Shahidi, 2005**).

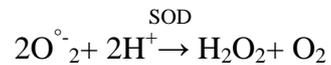
Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs (ou retardeurs), empêchent la formation ou piègent les ERO responsables de l'initiation de l'oxydation (O_2^- , 1O_2 ...). Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne interceptent les radicaux propagateurs de l'oxydation (lipoperoxyradicaux, ou $ROO\bullet$) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation radicalaire en chaîne (**Laguerre et al., 2007a**).

2.4.1. Antioxydants préventifs

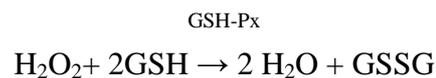
Il y a différentes voies préventives d'anti-oxydation en raison de la gamme diverse des initiateurs disponibles d'oxydation. Ces voies incluent la chélation des métaux de transition, de la désactivation de l'oxygène singulet, de la désintoxication enzymatique de ERO, de la filtration UV, de l'inhibition des enzymes pro-oxydant, des cofacteurs antioxydants d'enzymes, etc... Ici, nous décrirons seulement les plus renommés.

– **La détoxification des ERO** constitue une voie de prévention primordiale de l'oxydation, principalement relayée par les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes.

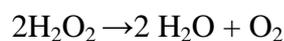
Tout d'abord, la superoxyde dismutase, une métalloenzyme ubiquitaire chez les eucaryotes, catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**Laguerre et al., 2007a**).



La glutathion peroxydase (GSH-Px), une autre enzyme, ayant une activité de détoxification qui concerne trois espèces réactives : le peroxyde d'hydrogène, hydroperoxydes des lipides et peroxydinitrite, qui est une espèce d'azote fortement réactive. GSH-Px est une enzyme sélénio-dépendant contenant quatre atomes de sélénium situés, sous forme de sélénio-cystéine, au noyau actif de l'enzyme. En particulier, cette enzyme détoxifie le peroxyde d'hydrogène en accélérant la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique) par le peroxyde d'hydrogène, qui est alors réduit en eau (**Laguerre et al., 2007a**).



Une troisième enzyme, la catalase (CAT), a également comme substrat le peroxyde d'hydrogène qu'elle réduit en eau et en oxygène moléculaire. Cette enzyme héminique se produit principalement dans les peroxysomes et les érythrocytes (**Laguerre et al., 2007a**).



In vivo, il est classiquement admis qu'il existe une coopération étroite entre ces différentes enzymes. Ainsi, l'activité superoxyde dismutase conduit à la formation de peroxydes d'hydrogène dont la détoxification est alors prise en charge par le système catalase et/ou glutathion peroxydase (**Laguerre et al., 2007a**).

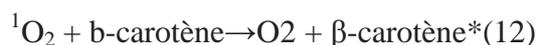
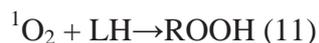
– **Les chélateurs de métaux de transition** comme le cuivre et le fer peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Il s'agit de protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, ou encore la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le cuivre. Les polyphosphates, l'acide éthylènediaminetétracétique, l'acide citrique, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont également connus pour leur capacité à chélater les métaux de transition (**Laguerre et al., 2007b**).

Il semblerait cependant que l'importance de ce type d'antioxydation dépende étroitement de la cible à protéger. Comparé à l'activité antiradicalaire par capture de ERO, ce mode d'action serait

mineur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais prédominant dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN (Dangles, 2006).

– Désactivateurs de l'oxygène singulet

Selon Buettner (1999), ils peuvent agir par désactivation chimique en se fixant sur une molécule tel qu'un acide gras pour donner un hydroperoxyde (réaction 11) ou encore par désactivation physique éliminant l'énergie d'excitation sans changement chimique (réaction 12).



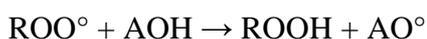
Les caroténoïdes sont, en l'état actuel de nos connaissances, les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet. Les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) (Krinsky, 1998).

Le lycopène est le plus réactif. Sa vitesse de réaction avec ${}^1\text{O}_2$ est particulièrement élevée ($31 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$) [13]. Le β -carotène réagit avec ${}^1\text{O}_2$ avec une vitesse de réaction 6 fois plus faible ($5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

Les tocophérols ($2,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$), les thiols, l'acide ascorbique ($1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$) sont moins efficaces vis à vis de la désactivation de ${}^1\text{O}_2$. Néanmoins ces composés ont des concentrations élevées dans les systèmes biologiques et contribuent à égalité avec les caroténoïdes à la désactivation de ${}^1\text{O}_2$. Un acide aminé comme l'histidine est aussi un bon « quencher » de ${}^1\text{O}_2$ (Cillard et Cillard, 2006).

2.4.2. Antioxydants « chain breaking » ou mécanisme briseur de chaîne

Les antioxydants primaires, également appelés antiradicalaires, sont des molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques R° , RO° et ROO° par transfert d'un H° :



L'antioxydant devient alors lui-même porteur d'un radical, mais à la différence des radicaux lipidiques, il est peu réactif, ce qui stoppe la propagation radicalaire. Ce groupe d'antiradicalaires est constitué presque exclusivement de composés phénoliques en raison de la grande stabilité apportée par leur cycle aromatique. On trouvera ainsi dans ce groupe les additifs antioxydants, BHA, BHT, TBHQ, gallates, mais aussi les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols végétaux (flavonoïdes, acides phénoliques, diterpénoïdes) (Berset, 2006).

Cette catégorie d'antioxydants va réagir le plus souvent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes, interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation. Il est à noter que ces antioxydants n'inhiberont pas par conséquent l'auto-oxydation des lipides par l'oxygène singulet. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes :

– **les donneurs d'hydrogène** : C'est le cas le plus fréquent. Ils doivent avoir un potentiel de réduction inférieur au potentiel des AGPI ($E = 0,6 \text{ V}$) et doivent pouvoir donner un hydrogène au radical alcoyle ($E = 1,6\text{V}$) et au radical peroxyde ($E = 1\text{V}$). Ces antioxydants sont principalement des composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés (tocophérols, tocotriénols, BHT, BHA, flavonoïdes...) avec diverses substitutions sur les noyaux.

Après la réaction d'oxydation, l'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant.

Ces antioxydants introduisent une phase de latence ou « lag phase » pendant laquelle la peroxydation lipidique est très faible et qui persiste tant que l'antioxydant n'est pas consommé par les radicaux peroxydes. Après la disparition complète de l'antioxydant, la vitesse de la peroxydation augmente très rapidement (**Cillard et Cillard, 2006**).

– **Les antioxydants « sacrifiés »** : Le qualificatif de « chain breaking antioxidant sacrificial » employé par Buettner concerne des molécules, elles-mêmes radicalaires, qui réagissent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation.

Deux radicaux sont connus pour se combiner avec les radicaux peroxydes : le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde (O_2^-) (**Cillard et Cillard, 2006**).

2.5. Les études d'efficacité des antioxydants

Pour mesurer l'efficacité d'un antioxydant, deux possibilités s'offrent au formulateur :

- Soit mettre en œuvre un test de vieillissement en conditions normales de stockage : parfaitement représentatif, ce type de test est long et incompatible avec les contraintes de développement d'un produit.
- Soit mettre en œuvre un test accéléré, pour « gagner » du temps lors des développements de produits. Plusieurs types de tests accélérés peuvent être envisagés :

2.5.1. des tests très modélisés, mettant en œuvre des substrats modèles (esters) dans des milieux modèles parfois éloignés de la matrice « huile », et dans des conditions souvent assez drastiques. Citons à titre d'exemples le test DPPH (dipicrylphénylhydrazine), le test de co-oxydation au β -carotène, et plus récemment mis au point, le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Le principe de ce dernier est le suivant : mesure de la destruction d'une protéine végétale, qui possède la propriété de fluorescer lorsqu'elle est soumise à un rayonnement lumineux spécifique. Sous l'action des radicaux libres présents dans le milieu réactionnel, la protéine est détruite et perd sa fluorescence, tandis qu'en présence d'un capteur de radicaux libres (antioxydant) la fluorescence persiste : ce test permet d'évaluer la capacité globale d'antioxydation (pouvoir antiradicalaire) d'un extrait végétal, par référence à un standard qui est le TROLOX (vitamine E sous forme hydrosoluble, dépourvue de chaîne carbonée). Ces tests modélisés permettent de réaliser un premier screening conduisant au classement des antioxydants testés en deux groupes : ceux qui ont une efficacité, ceux qui en ont aucune (**Judde, 2004**).

2.5.2. des tests d'oxydabilité accélérée types test Rancimat (ISO 6886), Oxydograph ou Oxipress. Le test Rancimat est le plus connu : la spécification de TIR (soit le Temps d'Induction au test Rancimat, exprimé en heures) est encore utilisée dans les cahiers des charges des corps gras. Elle correspond au temps pendant lequel l'huile végétale a résisté à un stress oxydatif. Le principe est le suivant : la prise d'essai de corps gras est soumise à une température élevée (98 °C) et à un bullage intensif d'air, ce qui déclenche les réactions d'oxydation, et notamment la libération d'acides organiques volatils, entraînés et piégés dans une cellule contenant de l'eau distillée, dont la conductivité va varier consécutivement. L'enregistrement repère le moment à partir duquel cette conductivité varie et qui correspond au TIR. L'avantage de ce type de test est la possibilité de suivre en parallèle plusieurs échantillons, avec des durées d'analyse réduites. L'inconvénient majeur repose sur les conditions mêmes du test, très drastiques, et peu représentatives des conditions normales de stockage. En conséquence, les résultats obtenus grâce à un test Rancimat ne peuvent être transposés directement (**Judde, 2004**).

2.5.3. les tests en conditions accélérées en enceinte thermostatée: les conditions de ces tests doivent être ajustées au cas par cas, à l'objectif de l'essai, à la nature de la matrice, à la nature du corps gras, et débouchent sur le choix des facteurs accélérateurs de l'oxydation (niveau de température, présence de la lumière), sur la sélection des méthodes d'évaluation de l'oxydation et sur la définition des points de cinétique (**Judde, 2004**).

Dans tous les cas, les conditions seront choisies les plus douces possible, ce qui implique des tests assez lents (en semaines en général), mais qui réservent l'approche la plus cohérente avec ce qui se passe en conditions normales de stockage.

III. Polyphénols :

3.1. Définition :

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et al., 2004).

3.2. Structure et classification des polyphénols :

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés selon le nombre et l'arrangement des atomes de carbone qui les composent, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Cheynier et al., 1997 ; Bravo, 1998).

En dépit de cette diversité structurale, ces composés sont souvent désignés sous le nom des polyphénols (Balasundram et al., 2006).

La plupart des composés phénoliques naturels sont présents conjugués avec des mono et des polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénoliques (Harborne, 1989; Harborne et al., 1999 ; Chira et al., 2008) et peuvent également se produire comme dérivés fonctionnels tels que les esters et les esters méthyliques. Cependant une telle diversité structurale a comme conséquence l'éventail de composés phénoliques qui se produisent dans la nature, ces composés phénoliques peuvent fondamentalement être classés par catégorie dans plusieurs classes comme montré dans le tableau 3 (Harborne, 1989; Harborne et al., 1999).

Les principales classes des polyphénols sont définies selon la nature de leur squelette de carbone : acides phénoliques, flavonoïdes, stilbènes moins communs, et lignanes. Les acides phénoliques sont abondants dans les aliments. Les plus fréquemment rencontrés sont l'acide caféique et, à un moindre degré, l'acide férulique.

De ces classes, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques alimentaires (King et Young, 1999).

Tableau 3 : Classes des composés phénoliques dans les plantes (Harborne, 1989; Harborne et al., 1999).

<i>Classe</i>	<i>Structure</i>
Polyphénols simples, benzoquinones	C6
Acides hydroxybenzoïques	C6-C1
Acéthophénones, acides phénylacétiques	C6-C2
Acides hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones, chromenes)	C6-C3
Napthoquinones	C6-C4
Xanthones	C6-C1-C6
Stilbènes, anthraquinones	C6-C2-C6
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6-C3-C6
Lignanes, neolignanes	(C6-C3) ₂
Biflavonoïdes	(C6-C3-C6) ₂
Lignines	(C6-C3) _n
Tanins condensés (proanthocyanidines ou flavolanes)	(C6-C3-C6) _n

3.2.1. Formes les plus simples :

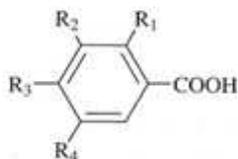
Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches. Sauf exceptions, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (Macheix et al., 2006).

a. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques se composent de deux sous-groupes, c.-à-d., les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (figure 6). Les acides hydroxybenzoïques incluent les acides : gallique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et syringique, qui ont en commun la structure C6-C1. Les acides hydroxycinnamiques, d'autre part, sont les composés aromatiques avec une chaîne latérale de trois-carbone (C6-C3), avec les acides cafféique, férulique, p-coumarique et sinapique étant les plus communs (Bravo, 1998).

Bien que les fruits et les légumes contiennent beaucoup d'acides phénoliques libres, dans les grains et les pépins en particulier dans le son ou la coque. Les acides phénoliques sont souvent sous forme liée. Ces acides phénoliques peuvent seulement être libérés ou hydrolysés par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes (Tsao, 2010)

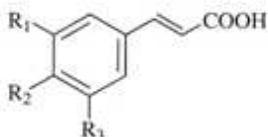
Acides hydroxybenzoïques



$R_1=R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$
 $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$

acide benzoïque (non phénolique)
 acide *p*-hydroxybenzoïque
 acide protocatéchique
 acide vanillique
 acide gallique
 acide syringique
 acide salicylique
 acide gentsique

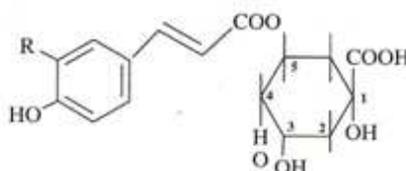
Acides hydroxycinnamiques (« phénylpropanoïdes »)



$R_1=R_2=R_3=H$
 $R_1=R_3=H, R_2=OH$
 $R_1=R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$

acide cinnamique (non phénolique)
 acide *p*-coumarique
 acide caféique
 acide férulique
 acide sinapique

Principaux acides phénoliques



Acide chlorogénique (= 5-caféoylquinique)

Figure 6 : Acides phénoliques typiques dans les aliments

b. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, les polyphénols les plus abondants dans nos régimes, les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus, peuvent être divisés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation de l'oxygène hétérocyclique (Reinli et Block, 1996; Scalbert et Williamson, 2000) : Les flavonoïdes *stricto sensu*, pigments végétaux jaune-orangé (leur nom venant du mot latin *flavus* : jaune), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet et un groupe de tanins, les proanthocyanidines, molécules incolores et très hydrosolubles (Kris-Etherton et al., 2002).

Les flavonoïdes sont les composés à faible poids moléculaire, se composant de quinze atomes de carbone, disposés dans une configuration C6-C3-C6. Essentiellement, leur structure se compose de deux anneaux aromatiques A et B, unis par un pont 3-carbones, habituellement sous forme d'anneau hétérocyclique C (Figure 7). L'anneau aromatique A est dérivé de la voie d'acétate/malonate, alors que l'anneau B est dérivé de la phénylalanine par la voie de shikimate (Bohm, 1998 ; Merken et Beecher, 2000).

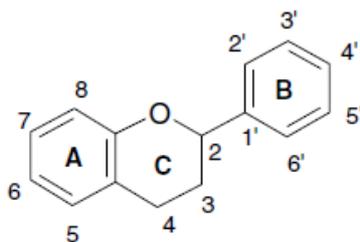


Figure 7 : Structure générale d'une molécule de flavonoïde

Les variations des modèles de substitution par rapport à l'anneau C ont comme conséquence les principales classes des flavonoïdes, c.-à-d., flavonols, flavones, flavanones, flavanols (ou catéchine), isoflavones, flavanonols, et anthocyanidines (figure 8) (Hollman et Katan, 1999), des quelles les flavones et les flavonols sont les plus largement rencontrées et structurellement diverses (Harborne et al., 1999). Les substitutions par rapport aux anneaux A et B provoquent les différents composés dans chaque classe des flavonoïdes (Pietta, 2000). Ces substitutions peuvent inclure l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (Bohm, 1998; Hollman et Katan, 1999).

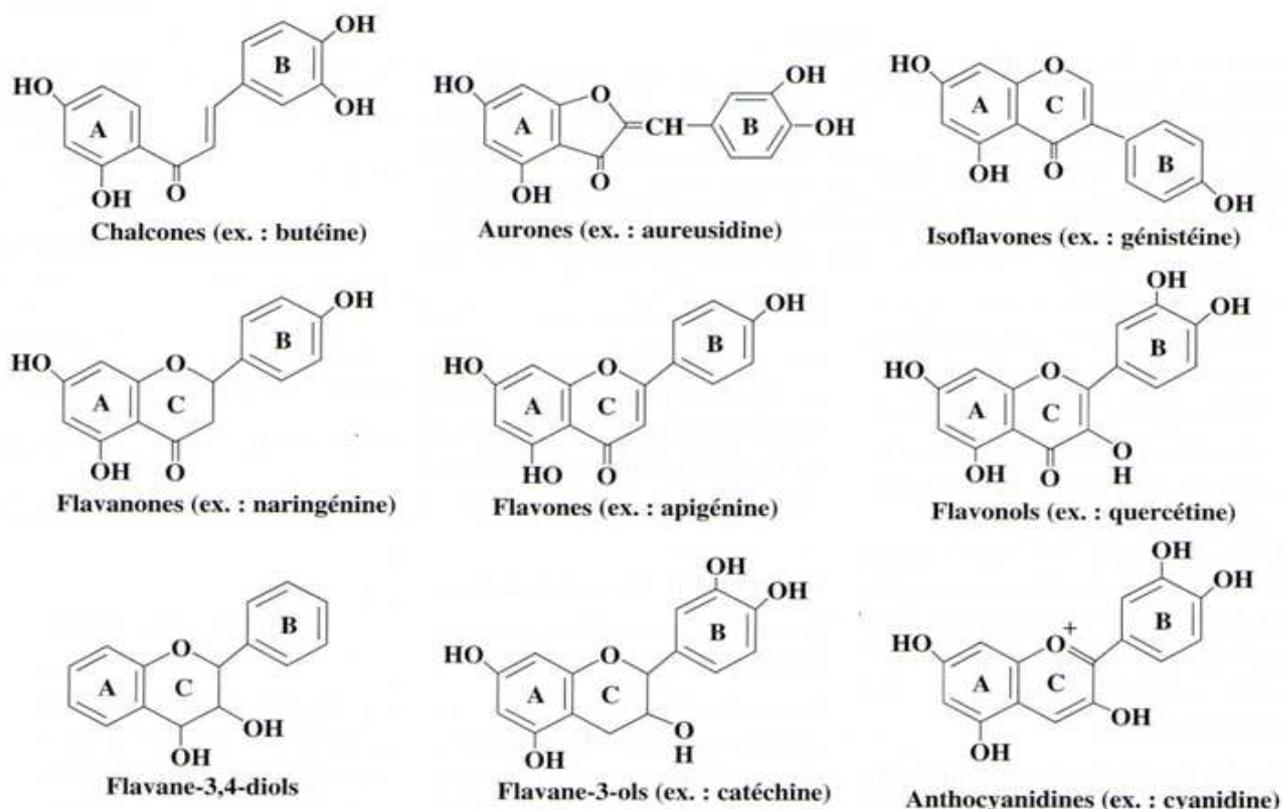


Figure 8 : Les principales classes des flavonoïdes

c. Autres exemples :

A côté des composés évoqués ci-dessous, de très nombreux autres phénols peuvent être présents chez les végétaux. Ainsi, la tyrosine est un acide aminé de nature phénolique constitutif des protéines chez tous les êtres vivants. Parmi les phénols simples, on peut citer le catéchol et le pyrogallol, un aldéhyde comme la vanilline, constituant majeure de l'arôme de la vanille, l'oleuropéine responsable de l'amertume de l'olive (**Macheix et al., 2006**).

Certains terpènes (thymol, gossypol...), des alcaloïdes (morphine, papavérine...) ou encore des composés azotés comme la bétanidine (pigment rouge de la betterave) sont également de nature phénolique, bien que rattachés à d'autres groupes de métabolites secondaires par leur origine biosynthétique et leurs propriétés. Les tocophérols (vitamine E) et les tocotriénols sont également caractérisés par un noyau portant un hydroxyle phénolique (**Macheix et al., 2006**).

Les quinones (benzoquinones, naphthoquinones dont la juglone, anthraquinones) peuvent également être rattachées aux composés phénoliques simples dont elles dérivent par processus oxydatifs (**Macheix et al., 2006**).

3.2.2. Formes condensés :**a. Les tanins :**

Les tanins sont des polyphénols végétaux de poids moléculaire élevé divisés en deux groupes chimiquement et biologiquement distinctes: les tanins condensés ou proanthocyanidines (thé, raisins, canneberges, etc), et les tanins hydrolysables : ellagitanins (Ets) (framboises, fraises, grenades) et gallotanins (GTs) (**Aguilar et al., 2008**).

Les tanins, les composés de poids moléculaire relativement élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et tanins condensés. Les premiers sont des esters d'acide gallique (gallo- et ellagi-tanins), alors que les derniers (également connu comme proanthocyanidines) sont des polymères des monomères de polyhydroxyflavan-3-ol (**Porter, 1989**). Une troisième subdivision, les phlorotanins consistant entièrement en phloroglucinol, qui a été isolé dans plusieurs genres des algues brunes (**Porter, 1989**), mais ces phlorotanins ne sont pas significatives dans le régime humain (**Bravo, 1998**).

Les tanins sont des molécules complexes caractérisées par la teneur élevée en polyphénols selon leurs structures, ces polyphénols sont divisés en trois groupes : les tanins hydrolysables, qui ont un noyau de sucre lié par estérification à l'acide gallique (gallotanins) ou à l'acide ellagique (ellagitanins) ; tanins condensés, formés du monomère flavan-3-ol ou du flavan-3,4-diol et tanins

complexes ou catéchine-gallates, qui partagent les propriétés des tanins hydrolysables et condensés (Bhardwaj *et al.*, 2003; Bhat *et al.*, 1998).

Ellagitannins (ET) sont des esters de l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) liés aux polyols, habituellement le glucose ou l'acide quinique (Aguilar *et al.*, 2007).

b. Lignines :

Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques (Haslam, 1996).

3.3. Les grands aspects de la biosynthèse des polyphénols :

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de deux voies bio-synthétiques :

- celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples;
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine bio-synthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

La grande majorité de composés phénoliques des plantes sont synthétisées par la voie de phénylpropanoïde, qui dirige les composés aromatiques de la voie acide shikimique dans une foule de métabolites de base phénolique.

La première étape dans la voie de phénylpropanoïde est la désamination de la phénylalanine pour former l'acide *trans*-cinnamique, qui contient le squelette phénylpropane C6-C3 présent dans tous les composés phénoliques excepté certains dérivés d'acide benzoïque comme les esters d'acide gallique. Cette réaction est catalysée par la phénylalanine ammonialyase (PAL), l'enzyme principale de point de branchement entre le métabolisme primaire et secondaire qui règle le flux dans la voie de phénylpropanoïde.

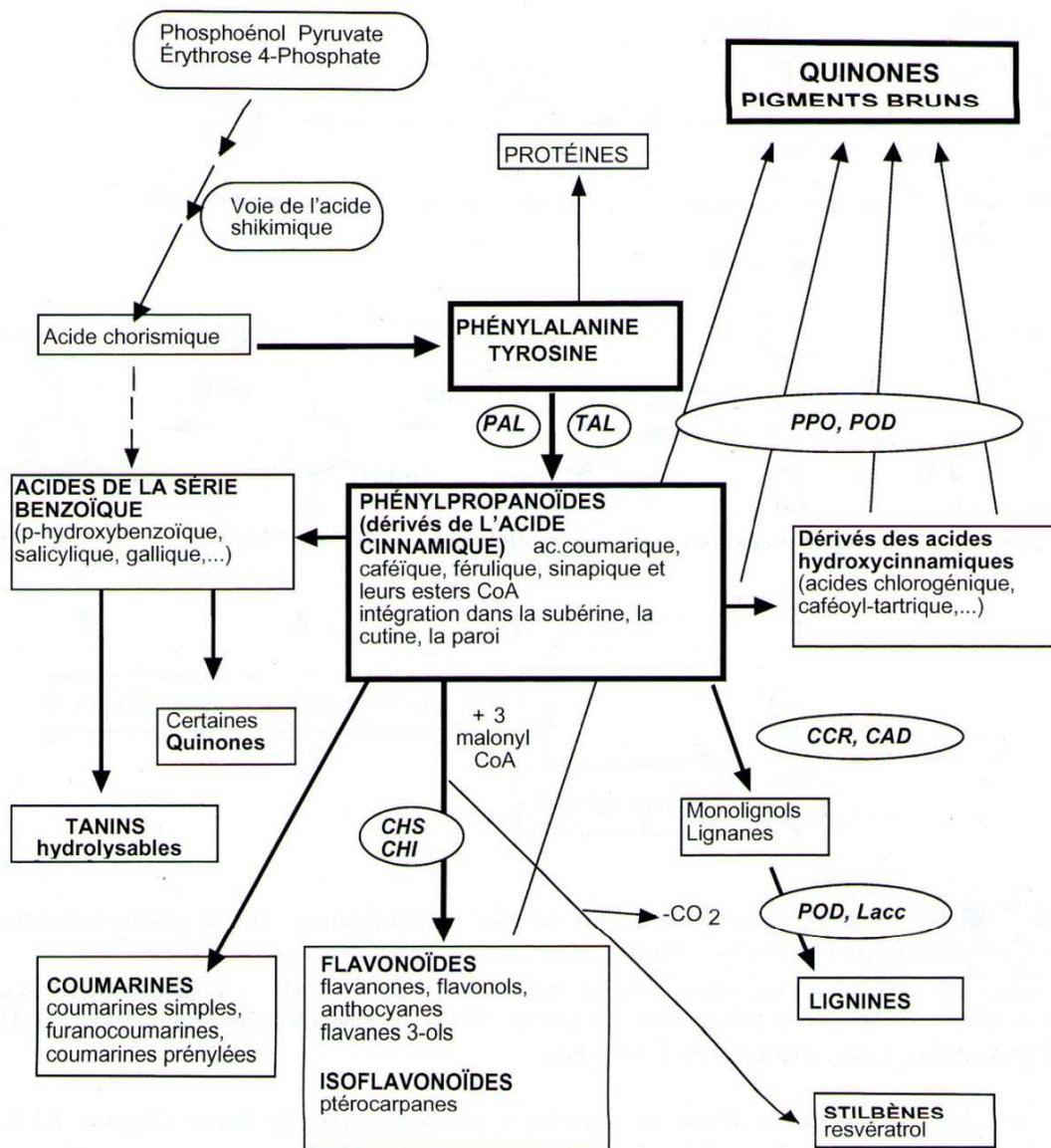
Les monocotylédones contiennent la tyrosine ammonia lyase (TAL), qui catalyse la formation du dérivé monohydroxylé de l'acide *p*-coumarique directement de tyrosine (Grace, 2005).

Les principaux produits de la voie de phénylpropanoïde sont les acides hydroxycinnamiques (HCAs), qui peuvent s'accumuler comme esters ou servir de précurseurs à d'autres métabolites phénoliques comprenant les flavonoïdes et la lignine.

Bien que souvent négligés, les esters de HCAs sont extrêmement répandus dans la nature. Par exemple, les esters de l'acide quinique, de l'acide caféique, de l'acide chlorogénique (5-O-acide caféoylquinique), se trouvent en quantité importante chez beaucoup de plantes et sont pratiquement universels dans leur distribution (Grace, 2005).

En fait, les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le coenzyme A qui permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques. On peut citer quelques orientations majeures (Macheix et al., 2006) :

- 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 (acides quinique, tartrique, shikimique...) ;
- vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosylations, prénylations...) ;
- vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases (Macheix, et al., 2006) ;
- vers les flavonoïdes. La synthèse des flavonoïdes emploie des intermédiaires de la voie de phénylpropanoïde et de la voie de polycétide pour former le squelette C_{6'}-C₃-C₆ (flavane) caractéristique de toutes les flavonoïdes. La première étape dans la synthèse des flavonoïdes implique la condensation de *p*-coumaroyl-CoA avec trois molécules d'acétate par l'intermédiaire du malonyl-CoA pour former la chalcone de narigénine. Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase (CHS), l'enzyme principale de point de branchement reliant les voies de phénylpropanoïde et de flavonoïde (Grace, 2005).



La formation des quinones, schématisée en haut à droite, peut intervenir à partir de nombreux composés appartenant à différentes classes.

Abréviations des principales enzymes : 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 9 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes des composés phénoliques (d'après Macheix, 1996)

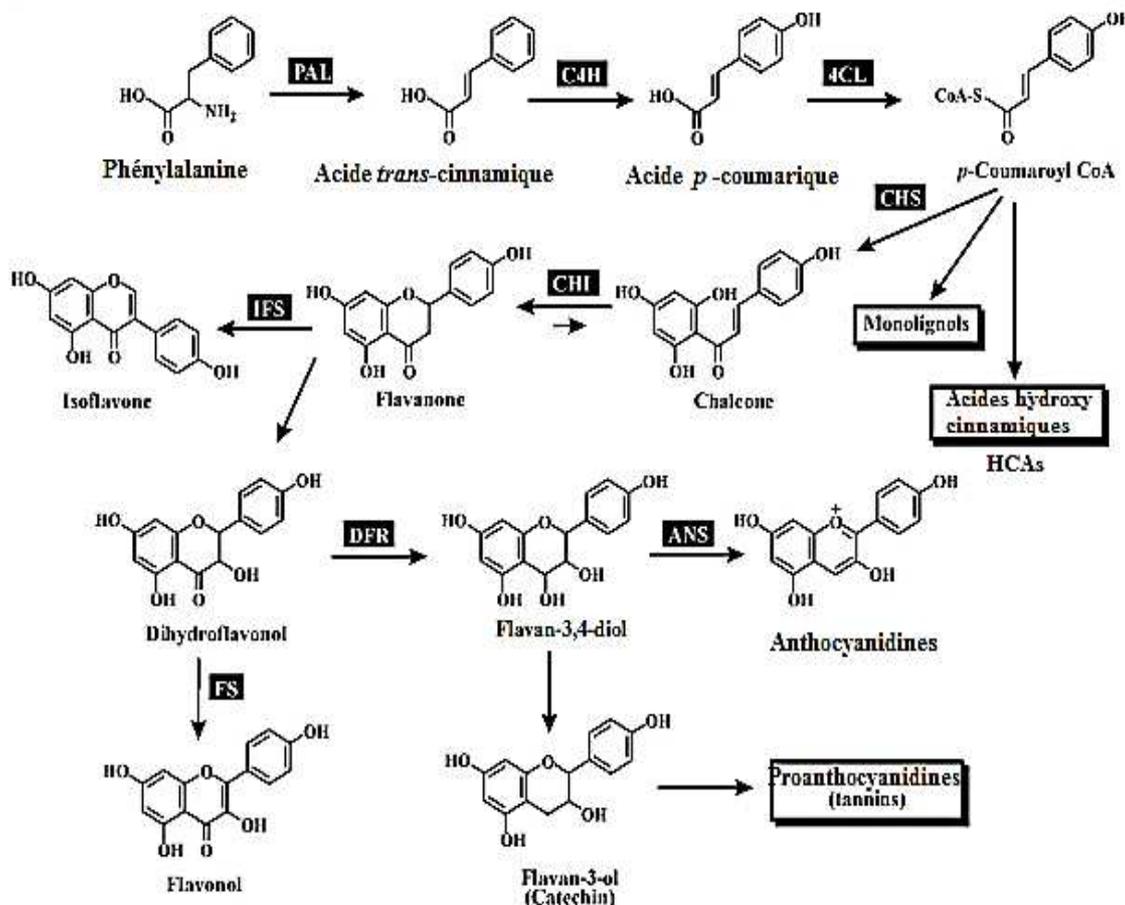


Figure 10 : Relations biosynthétiques entre les phénylpropanoïdes et les flavonoïdes

Les principales enzymes incluent phénylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate-4-hydroxylase (C4H), 4-coumarate CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomérase (CHI), isoflavone synthase (IFS), dihydroflavonol réductase (DFR), flavonol synthase (FS), anthocyanidine synthase (ANS).

3.4. Rôle des polyphénols :

Le rôle des polyphénols est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...);
- dans les interactions de la plante avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;
- dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent le choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation ;

- dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini ; dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Macheix et al., 2005).

3.5. Propriétés antioxydantes des polyphénols :

3.5.1. Composés phénoliques comme piègeurs de radicaux libres et chélateurs des métaux

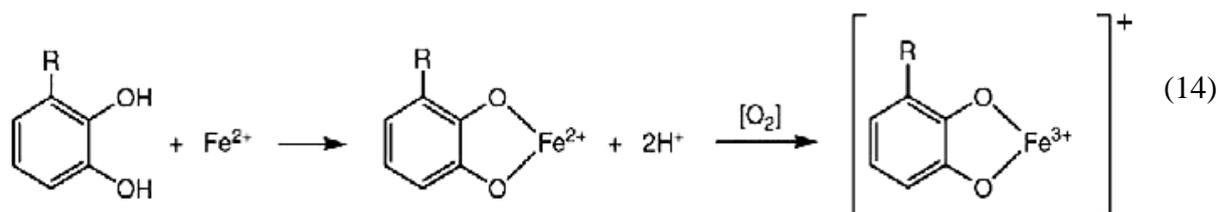
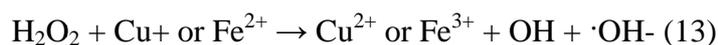
Les composés phénoliques (CPH) agissent comme accepteurs de radicaux libres et briseurs de chaînes. Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux (R) : $R + CPH \rightarrow RH + PO\cdot$

Les intermédiaires des radicaux phénoxy (PO \cdot) sont relativement stables due à la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facilement initiée. De plus, les radicaux phénoxy intermédiaires agissent également comme des terminateurs de chemin de propagation par réaction avec d'autres radicaux libres : $PO\cdot + R\cdot \rightarrow POR$

Les composés phénoliques possèdent la chimie de structure idéale pour les activités de piégeage des radicaux libres parce qu'ils ont :

1. groupes hydroxyles phénoliques qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron à un radical libre ;
2. système aromatique étendue conjugué pour délocaliser un électron non apparié (Dai et Mumper, 2010).

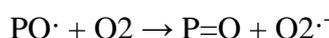
Comme une propriété antioxydante alternative, certains composés phénoliques avec des groupes dihydroxyles peuvent conjuguer les métaux de transition, empêchant la formation des radicaux libres induite par le métal. Les ions métalliques actifs comme le Cu⁺ ou Fe²⁺ interagissent avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par le biais de la chimie de Fenton (comme le montre la réaction n° 13 ci-dessous) pour former des radicaux hydroxyles (\cdot OH), qui sont les plus réactifs ERO connus, capables d'initier des réactions en chaîne de radicaux libres par abstraction de l'hydrogène à partir presque de n'importe quelle molécule. Les composés phénoliques avec des groupes catécholates et gallates peuvent inhiber la formation de radicaux d'oxygène induite par le métal soit en coordination avec le Fe²⁺ et en améliorant l'auto-oxydation du Fe²⁺ (comme le montre la réaction 14 ci-dessous), soit par la formation d'un complexe inactif avec Cu²⁺, Fe²⁺ ou Cu⁺ avec une interaction relativement plus faible (Dai et Mumper, 2010).



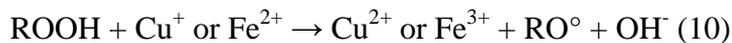
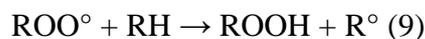
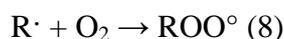
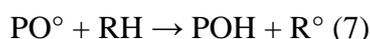
Théoriquement, ces deux activités antioxydantes peuvent causer une réduction des concentrations des radicaux libres et des espèces oxydantes à l'état d'équilibre. En conséquence, l'oxydation ultérieure des molécules cibles tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques est diminuée. Basé sur ces capacités potentielles, les études étendues ont démontré les activités antioxydantes des composés phénoliques naturels, en général, dans une myriade de systèmes biochimiques et *ex vivo* (Fraga, 2007).

3.5.2. Activité pro-oxydante des composés phénoliques :

Il est important de noter que quelques antioxydants phénoliques peuvent lancer un processus d'auto-oxydation et se comporter comme des pro-oxydants dans certaines conditions (Shahidi, et Wanasundara, 1992). Au lieu de terminer une réaction en chaîne de radicaux libres par réaction avec un deuxième radical, le radical phénoxy peut également réagir avec l'oxygène et produire des quinones ($\text{P}=\text{O}$) et des anions superoxydes ($\text{O}_2^{\circ -}$) comme montré ci-dessous :



Néanmoins, les ions métalliques de transition peuvent également induire l'activité pro-oxydante des antioxydants phénoliques comme il est montré dans les réactions suivantes :



Il a été trouvé que les antioxydants phénoliques se comportent comme des pro-oxydants dans les conditions qui favorisent leur auto-oxydation, par exemple, à pH élevé avec des concentrations élevées en ions métalliques de transition et en présence des molécules d'oxygène. Les petits composés phénoliques qui sont facilement oxydés, comme la quercétine, l'acide gallique, possèdent une activité pro-oxydante ; tandis que les composés phénoliques de haut poids moléculaire, tels que les tanins condensés et hydrolysables, ont peu ou pas d'activité pro-oxydante (Hagerman *et al.*, 1998).

IV. Grenadier :

L'explosion actuelle de l'intérêt pour la grenade comme un produit médicinal et nutritionnel est mise en évidence par une recherche sur MedLine de l'année 2000 jusqu'à présent, révélant plus de 150 nouveaux articles scientifiques relatifs à ses effets sur la santé. Entre 1950 et 1999 seulement 25 de ces publications apparaissent sur MedLine (**Lansky et Newman, 2007**).

Le grenadier (*Punica granatum L.*) est un des fruits comestibles les plus anciens et a été utilisé intensivement dans la médecine populaire de nombreuses cultures (**Li et al., 2006**).

La grenade *Punica granatum L.*, est une espèce de climat tempéré, principalement cultivée dans la région méditerranéenne, l'Asie méridionale, et dans plusieurs pays de l'Amérique du nord et l'Amérique du Sud (**Stover et Mercure, 2007**).

La popularité de la grenade a augmenté énormément surtout dans la dernière décennie en raison des effets : antimicrobien, antioxydant puissant, antiviral, anticancéreux et anti-mutagénique du fruit (**Negi et al., 2003**).

Le jus et la peau de grenade contiennent des quantités importantes de polyphénols comme les tanins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique. Il a été utilisé dans la préparation de teintures, de formule cosmétique, thérapeutique et recettes alimentaires et à cet égard la peau de grenade est une bonne source d'antioxydants (**Yasoubi et al., 2007**).

Li et al. (2006) ont rapporté que la peau de grenade montrait l'activité antioxydante la plus élevée parmi les fractions de peau, de pulpe et de graine de 28 genres de fruits de consommation courante en Chine.

La transformation d'une tonne de fruit de grenade produit approximativement 322-341 litres de jus et produit d'environ 669 kilogrammes de marc de grenade, un sous-produit composé des grains et de peaux. Le marc de grenade a été également montré pour contenir des teneurs élevées en polyphénols et ce matériel est ainsi une source potentielle pour isoler les antioxydants à valeur ajoutée (**Qu et al., 2011**).

4.1. Classification botanique :

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification :

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Punicaceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'*Angiosperm Phylogeny Group* ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un gène nucléaire de ribosome. Ainsi, pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales, il est nécessaire de modifier leur position dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres (**Spichiger, Savolainen, et al., 2004**).

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Ordre : Myrtales

Famille : Lythraceae

Genre : *Punica*

Espèce : *Punica granatum*

Il convient donc de retenir que dans cette nouvelle classification, la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces (**Spichiger, Savolainen et al., 2004**).

- **Le genre *Punica* :**

Le nom botanique de la grenade est *Punica granatum*, *Punica* étant le nom de l'ancienne ville phénicienne du nord de l'Afrique où les soldats romains en route pour la première des trois guerres puniques au III^e siècle av. J.-C. ont pour la première fois rencontré le grenadier, et *granatum* signifiant « riche en pépins ». Sur le plan botanique, *Punica granatum* partage son nom de famille avec son ancêtre génétique rare, *Punica protopunica*, dont l'habitat se limite à l'île de Socotra à la rencontre de mer et de l'océan indien, dépendance du Yémen (Storey, 2007 ;Joannet, 2009).

- **Description :**

Le grenadier (arbre ou arbuste) atteint 3 à 5 mètres de haut et se reconnaît à ses feuilles vert vif, ovales ou en forme de lance, qui tombent l'hiver. Le fruit, qui arrive à maturité en septembre dans l'hémisphère nord (et en mars dans l'hémisphère sud, encore faut-il en trouver !) a la forme d'une pomme, une couleur brun-jaune ornée d'une touche de rouge et un calice dur semblable à une couronne. En cassant l'écorce dure, on peut voir les fruits translucides blancs, rosâtres ou écarlates serrés les uns contre les autres à l'intérieur. Les pépins juteux peuvent être doux ou quelque peu acides, selon la variété, et l'on doit parfois les sucrer avant de les consommer. Le jus extrait des pépins, autrefois transformé en vin, est aujourd'hui employé comme sirop pour aromatiser les boissons (Storey, 2007).

La grenade est formée de trois parties principales, ayant chacune leur propre caractère métaphysique, botanique et chimique. Ces parties sont les pépins ou « arilles », le jus et la peau. En outre, l'écorce, les racines, les feuilles et les fleurs de l'arbre renferment toutes des éléments spécifiques et uniques, possédant chacun des effets complexes et intéressants lorsqu'ils sont préparés sous forme de médicaments pour la consommation humaine ou animale (Storey, 2007).

4.2.Le grenadier en Algérie :

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze, ..). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat (tableau 4) (INRAA, 2006).

Tableau 4 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006)

Espagne rouge	Gajin	Selection station
Corda travita	Sefri	Chelfi
Moller huesso	Zemdautomne	Doux de kolea
Mellisse	Sulfani	Messaad
Papers shell	Spanish duoy	

4.3.Composition biochimique du fruit :

Le fruit de grenade se compose de trois parties : les graines, le jus, et les écorces (**Lansky et Newman, 2007**).

La partie comestible du fruit de grenade (50%) se compose 40% des arilles (jus) et 10% des graines. Les arilles contiennent 85%eau, 10% sucres totaux, principalement fructose et glucose, et 1.5% pectine, acides organiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique, et l'acide malique, et les composés bioactifs tels que les composés phénoliques et les anthocyanines, du potassium, du phosphore et des minéraux, ainsi que diverses vitamines dont une forte teneur en vitamine C : 20 mg pour 100g. Sa composition est proche de celle des organes (**Joannet, 2009 ; Viuda-Martos, Fernández-López et Pérez-Álvarez, 2010**).

La plupart des analyses chimiques des grenades se sont focalisées sur le jus, la peau, le péricarpe et l'huile de pépins. Le jus contient de grandes quantités de tanins hydrolysables, notamment des ellagitanins (acide gallique et acide ellagique), des anthocyanines (cyanidine, delphinidine, pèlargonidine) ainsi que des acides phénoliques (acide ellagique, acide caféique et acide chlorogénique). Le péricarpe est également riche en tanins hydrolysables (remarque : Le péricarpe est la peau entourant le pépin, l'« arille ». Le pépin n'est que la partie interne blanche et dure ; les sacs rouges juteux comestibles, incluant le pépin, sont appelés arilles). En pressant le fruit entier, on obtient un jus bien plus riche en polyphénols. On trouve aussi de la lutéoline, de la quercétine, du kaempférol et de la narigénine dans les peaux (**Storey, 2007**).

L'huile de pépins est composée à environ 63,5 % d'acide punicoïque, un acide gras trans à 18 atomes de carbone (dont la structure rappelle celle de l'acide linoléique conjugué). Le pépin contiendrait en outre la plus forte concentration d'œstrone du règne végétal, environ 17 mg/kg de graines séchées (**Storey, 2007**).

4.4. Les constituants du fruit de grenade :

4.4.1. Tanins :

Les tanins hydrolysables de structures diverses comprenant les ellagitanins et les gallotanins constituent les composés les plus prédominants dans les diverses parties de la grenade. Les tanins condensés, cependant, sont rarement trouvés dans cette plante (**Wang et al., 2010**).

Les tanins hydrolysables, sont principalement situés dans la peau et le mésocarpe du fruit de grenade. Ils sont extraits dans le jus lors de la transformation commerciale des fruits entiers (**Gil et al., 2000**).

La fraction tannique se compose d'esters de l'acide gallique et de l'acide ellagique, des molécules à noyau de polyol. Le grand nombre de combinaisons possibles de monomères donne lieu à une diversité structurale énorme. Ces structures sont subdivisées en gallotanins (type I - des tanins) et ellagitanins (type II - des tanins) comprenant les gallagylesters plus uniques, tel que le tannin hydrolysable prédominant des grenades connu sous le nom de punicalagine (**Haslam, 2007; Khanbabaee et van Ree, 2001; Okuda et al., 2000**).

La punicalagine, ellagitanin complexe, caractéristique de la peau de grenade, est formé d'un glucose lié à l'acide ellagique et à l'acide gallagique. elle est extraite dans le jus de grenade à partir de la peau pendant la transformation de jus et qui est responsable de plus de 50% de l'activité antioxydante du jus de grenade (**Adams et al., 2006**).

D'autres classes d'ellagitanins comprennent les dehydroellagitanins (type III de tanins) et les dehydroellagitanins transformés (type IV tanins) (**Okuda et al., 2000**).

La biosynthèse des ellagitanins dans la grenade suit la voie commune de ce genre de composés (figure 11). L'acide ellagique est bio-synthétisé à partir de l'acide hexa-hydroxy-diphényldicarboxylique, à travers la lactonisation entre les groupes carboxyles et hydroxyles, qui peut être considéré comme un composant central (Figure 12).

Les groupes hydroxyles de l'acide ellagique sont substitués pour former les différents dérivés de l'acide ellagique, comme l'acide 3-O-méthylellagique, l'acide 3,3'-di-O-méthylellagique, l'acide 4,4'-di-O-méthylellagique, l'acide 3,3',4'-tri-O-méthylellagique, et l'acide 3'-O-méthyl-1,3,4-méthylènedioxy-ellagique.

L'acide ellagique et ses dérivés génèrent les glycosides par glycosylation avec les saccharides. Plusieurs acides hexa-hydroxy-diphényldicarboxylique peuvent être polymérisés en polymères par estérification entre les groupes carboxyles d'un monomère et les groupes hydroxyles d'un autre (Wang *et al.*, 2006).

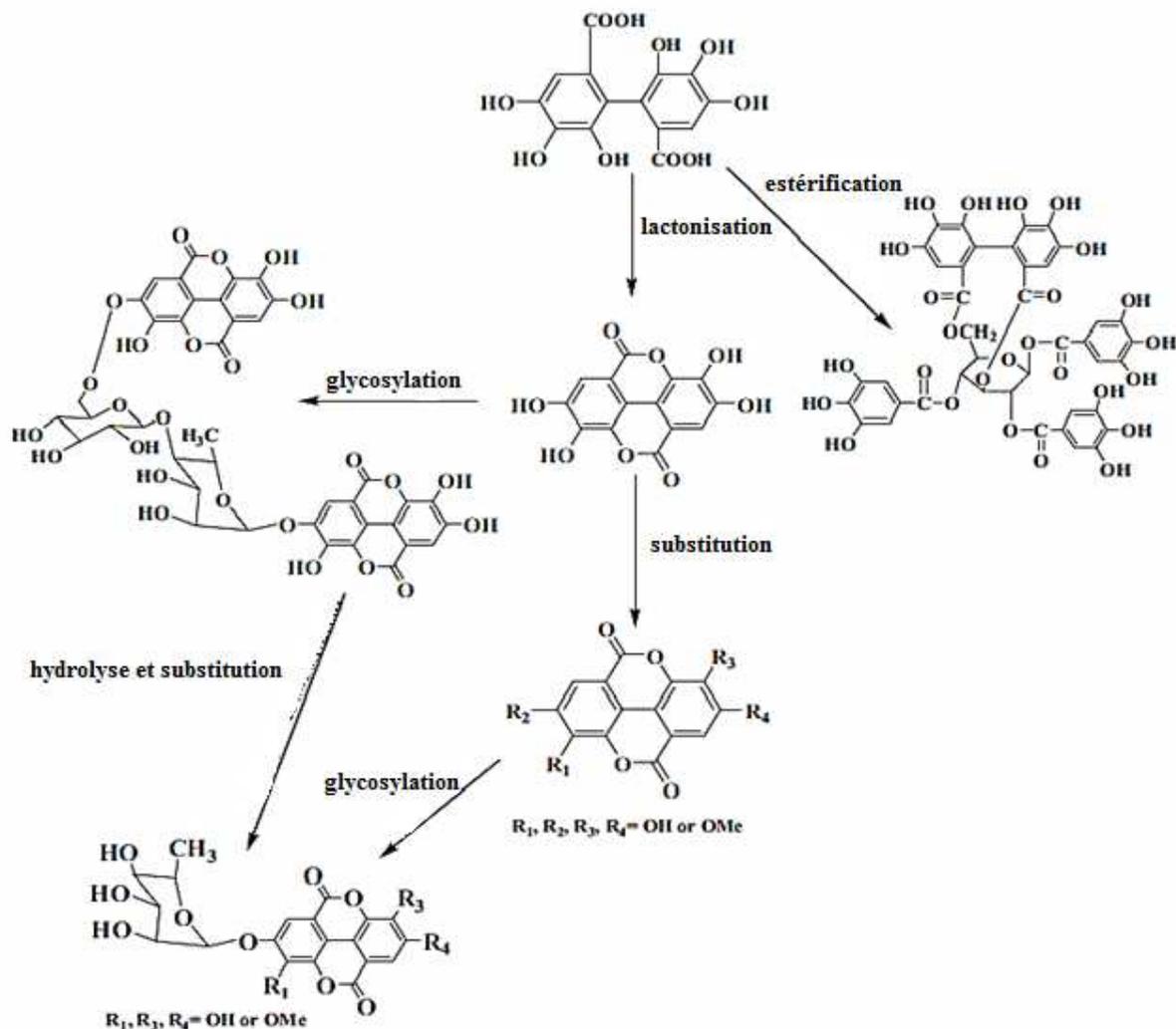


Figure 11 : Voie de biosynthèse des ellagitanins dans la grenade

Les gallotanins, qui sont surtout présents dans les feuilles et rarement signalés dans d'autres parties de la grenade se composent généralement d'un couple de groupes galloyl et, par conséquent, ils peuvent être considérés comme des dérivés de l'acide gallique (Li HX *et al.*, 2002).

De point de vue biosynthèse, ces composés sont, comme les ellagitanins, synthétisés par estérification, lactonisation et glycosylation entre les parties d'une seule molécule ou des molécules multiples (Wangs *et al.*, 2006).

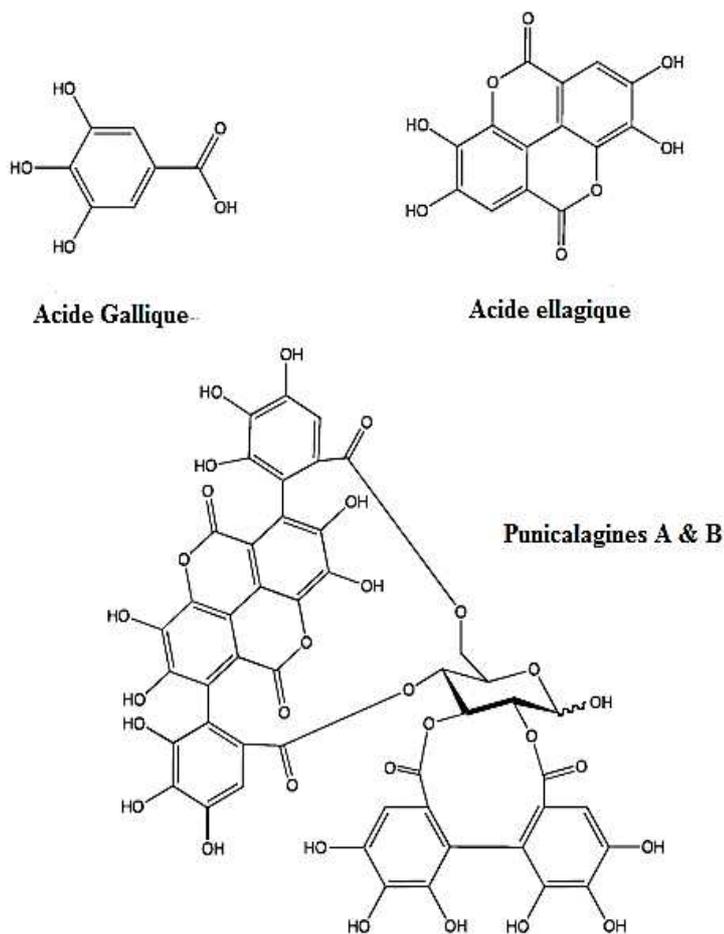


Figure 12 : Structure de l'acide ellagique, gallique et les punicalagines A & B

4.4.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes isolées à partir de la grenade incluent les flavones, les flavonols, les anthocyanidines et flavan-3-ols. Les couleurs brillantes du péricarpe et du jus sont attribuées aux anthocyanidines et aux flavan-3-ols, dont la teneur diminue ou augmente avec de la période de la maturation (Wang *et al.*, 2010).

Les anthocyanidines rapportées dans la grenade sont habituellement présentes sous forme de glucoside avec des aglycons de delphinidine, de cyanidine et de pelargonidine, alors que les flavan-3-ols trouvés dans cette plante sont seulement présents sous la forme déglucosylée comprenant la catéchine, l'épicatéchine, l'epigallo-catéchine et leurs dérivés. Les flavones et les flavonols constituent les principales flavonoïdes du péricarpe et des feuilles, qui existent fréquemment comme glucosides avec des aglycons de lutéoline, de kaempferol, de quercétine, d'apigénine et de naringine (Wang *et al.*, 2010).

Les anthocyanines sont des glucosides, qui lors de l'hydrolyse donnent un sucre et un aglycon appelée *anthocyanidine*. Ceci à la suite a une structure composée d'un noyau benzopyryl et d'un anneau phénol, connu comme cation flavilio, qui est déficient enélectrons et donc très réactif (**Maestre, 2000**).

La couleur rouge dépend de la concentration et du type d'anthocyanines contenues dans le fruit. Les dérivés de delphinidine donnent les nuances bleues et pourpres, tandis que le pelargonidine est responsable des nuances de rouge orangé (**Harborne, 1982**).

Six anthocyanines ont été isolées et identifiées comme étant responsables de la couleur du jus de grenade : delphinidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside, cyanidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside, et pelargonidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside (**Du et al., 1975, Kriventsov et Arendt, 1981; Gilet al., 1995**).

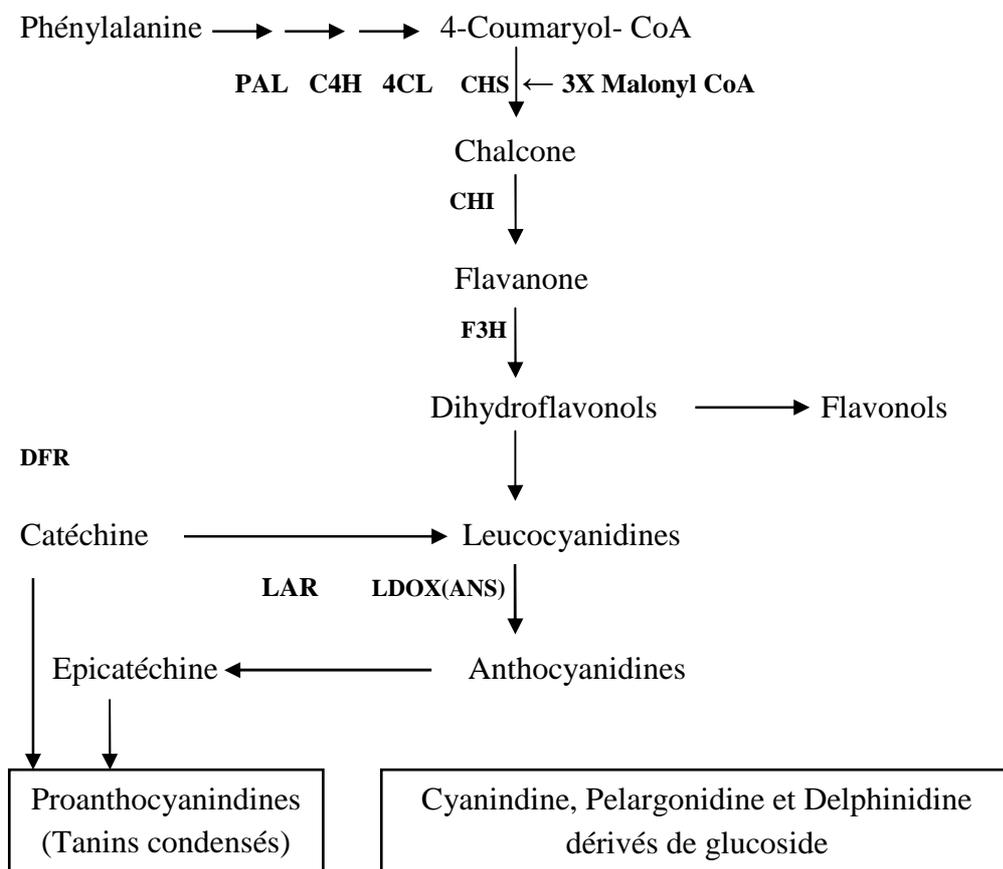


Figure 13 : Représentation schématique de la voie biosynthétique des flavonoïdes menant à la production des anthocyanines et des proanthocyanidines

Les abréviations nommées d'enzymes sont comme suit : **PAL**, Phénylalanine ammonia-lyase; **C4H**, cinnamate 4-hydroxylase; **4CL**, 4-coumarate: CoA ligase; **CHS**, chalcone synthase; **CHI**, chalcone isomérase; **F3H**, Flavanone 3-hydroxylase; **FLS**, Flavonol synthase; **DFR**, dihydroflavonol reductase; **LAR**, leucoanthocyanidine réductase; **LDOX**, leucoanthocyanidine oxidase/**ANS**, anthocyanidine synthase; **ANR**, anthocyanidine réductase; **GT**, glucosyltransférase; **AT**, acyltransférase; **MT**, méthyltransférase

4.4.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont principalement trouvés dans l'écorce de la tige et de la racine aussi bien que dans le jus de grenade. Il y a principalement deux genres d'alcaloïdes comprenant les pipéridines et les pyrrolidines rapportées dans cette plante.

Habituellement, les pipéridines ont un squelette d'anneau de six-membres et les pyrrolidines ont un squelette d'anneau de cinq-membres. Les espèces et le contenu des pipéridines sont relativement plus importants que ceux des pyrrolidines (Wang *et al.*, 2010).

4.4.4. Acides organiques

Les graines sont riches en acides gras insaturés comprenant l'acide punique, l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, et l'acide linoléique, et la teneur totale en ces acides gras représente 15.26% du poids des graines (Li *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 1999).

Le jus contient principalement les acides gras de chaîne droite, dont l'acide citrique et l'acide malique qui sont les principaux composés avec une teneur de 4.85 et 1.75 g/l, respectivement (Neuhofer, 1990). En outre, l'acide tartrique, l'acide oxalique et l'acide succinique ont été également trouvés dans le jus (Poyrazoglu *et al.*, 2002).

Les acides phénoliques se composent de l'acide caféique, de l'acide fumarique, de l'acide chlorogénique et de l'acide p-coumarique qui sont habituellement présents dans le jus et/ou le péricarpe (Artik, 1998 ; Amakura *et al.*, 2000).

4.4.5. Triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont fréquemment trouvés dans les fleurs et les graines de grenade. Ces composés comprenant l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acide maslinique, l'acide punicanolique, la *friedeline*, l'acide betulinique et l'acide asiatique apparaissent habituellement sous forme de triterpénoïdes pentacycliques avec un C-28 carboxylique et une double liaison entre C-12 et C-13.

Les stéroïdes sont seulement trouvés dans les graines, qui se composent des stérols, tels que le cholestérol, le stigmastérol, le camestérol, le β -sitostérol et le daucostérol ; et des stéroïdes de sexe, tels que 17- α -estradiol, estrone, testostérone et oestriol (Wang *et al.*, 2010).

4.4.6. Autres composés

D'autres composés comprenant les saccharides, les coumarines et les lignanes ont été également rapportés dans la grenade tels que le coumestrol, le coniferyl 9-*O*-[β -dapiofuranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glucoopyranoside, le sinapyl 9-*O*-[β -dapiofuranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glucoopyranoside, le phénéthyl rutinoside et l'icaraside D1 ont été isolés dans les graines (Wang *et al.* 2004). Le glucose, le fructose et le saccharose ont été trouvés dans le jus (Cui *et al.*, 2004).

L'analyse par GC-MS a montré que la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait d'écorce de *Punica granatum* contient le Pyrogallol (41.88%), le 5-Hydroxyméthylfurfural (14.10%), le D-Allose (9.17%), le 2-Methoxy-1, 4 Benzènediol (8.34%) et l'acide 2, 3diméthylfumarique (3.96%) (Sangeetha et Vijayalakshmi, 2011).

Tableau 5 : Constituants du fruit et de l'arbre de *Punica granatum* (Jurenka, 2008)

<i>Composé</i>	<i>Constituants</i>
<i>Jus</i>	Anthocyanines, glucose, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique ; acide caféique; catéchine, EGCG, quercétine, rutine; nombreux minéraux particulièrement le fer; acides aminés.
<i>Grain</i>	95 % acide punique ; autres constituants, y compris l'acide ellagique ; autres acides gras; stérols.
<i>Péricarpe (peau, écorce)</i>	Punicalagines phénoliques, acide gallique et autres acides gras, catéchine, EGCG, quercétine et autres flavonoles, flavones, flavonones, anthocyanidines
<i>Feuilles</i>	Tanins (punicaline et punicafoline; et flavone glucosides y compris la lutéoline et l'apegenine
<i>Fleur</i>	Acide gallique, acide ursolique, triterpénoïdes, y compris l'acide asiatique et l'acide maslinique, autres constituants non identifiés
<i>Racine et écorce</i>	Ellagitanins, y compris la punicaline et la punicalagine; nombreux alcaloïdes pipéridines

4.5. Activités biologiques de grenade :

La grenade a été longtemps approuvée comme aliment et médicament et comme régime dans la convalescence après diarrhée. La partie officinale, l'écorce du fruit est astringente, digestive, cardiotonique, agent stomachique et elle est fortement efficace dans la diarrhée et la dysenterie chronique, la dyspepsie, le colite (inflammation de l'intestin), les hémorroïdes et les désordres utérins (**Sivarajan et Balachandran , 1994**).

La peau de grenade est riche en polyphénols comprenant les ellagitanins, les gallotanins, l'acide ellagique, l'acide gallique, la catéchine, les anthocyanines, l'acide férulique, et la quercétine. Ces polyphénols montrent de diverses activités biologiques, telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de l'oxydation et de la croissance microbienne, et la diminution du risque des maladies cardio- et cérébrovasculaires et quelques cancers. Beaucoup de chercheurs ont prouvé que les préparations contenant l'extrait de la peau de grenade peuvent être utilisées pour empêcher et/ou traiter l'athérosclérose, la diarrhée, l'ulcère gastrique, la maladie vénérienne, et les maladies relatives à l'œstrogène (**Reddy et al., 2007**).

4.5.1. Activité antioxydante :

Les études chez le rat et la souris confirment les propriétés antioxydantes de l'extrait des sous-produits de la grenade préparés à partir de fruits entiers, moins le jus, montrant une réduction de 19% du stress oxydatif dans les macrophages péritonéaux de souris (MPM), soit une baisse de 42% de la teneur cellulaire en peroxydes lipidiques, et une augmentation de 53% des niveaux du glutathion réduit (**Rosenblat et al., 2006**).

Une étude séparée chez les rats avec des dommages au foie induits par le CCl₄ a démontré que le prétraitement avec l'extrait de l'écorce de grenade (EEG) a amélioré ou maintenu l'activité de piégeage des radicaux libres des enzymes hépatiques : la catalase, la superoxyde dismutase, et la peroxydase, et a abouti à 54% de réduction des valeurs de la peroxydation lipidique par rapport aux témoins (**Chidambara et al., 2002**).

Autres études ont démontré que l'extrait de la peau de *grenade* diminue la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques, cardiaques, et rénaux (**Parmar et Kar, 2008**) et a un effet facilitant sur les capacités de piégeage de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.

Abdel Moneim (2012) a examiné l'extrait méthanolique de la peau de *Punica granatum* (grenade) pour son activité antioxydante sur le cerveau des rats mâles adultes albinos Wistar en mesurant les paramètres antioxydants (le glutathion réduit, la catalase, la superoxyde dismutase, la

glutathion réductase, la glutathion-S-transférase, et la glutathion peroxydase), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxyde nitrique (NO) et la peroxydation lipidique (MDA) dans l'homogénat de cerveau. Le traitement avec la peau de grenade a eu comme conséquence l'augmentation marquée de la plupart des paramètres antioxydants avec la réduction des oxydants : H₂O₂ (-15.6%, *p* < 0.005), NO (-23.6%) et MDA (-10.9%).

4.5.2. Activité antidiabétique :

Une étude visant à évaluer le rôle de l'extrait de la poudre de peaux de *Punica granatum* dans sa dose thérapeutique humaine sur le nombre des cellules bêta, la glycémie et les taux plasmatiques d'insuline chez des rats normaux et des rats diabétiques alloxanes pendant 4 semaines de traitement. Le traitement a révélé que l'extrait aqueux de grenade a diminué significativement le niveau de glucose du sang et augmenté le niveau d'insuline dans les rats normaux et les rats diabétiques traités. Le pancréas a montré une augmentation du nombre des cellules bêta dans les rats normaux et les rats diabétiques traités (**Khalil, 2004**).

Dans une autre étude (**Labib Ahmed Hossin, 2009**) qui a été réalisée pour évaluer l'effet de la poudre de peau de grenade et son extrait sur le métabolisme des lipides chez les rats males hypercholestérolémiques, la poudre de la peau de grenade a été ajoutée à un régime hypercholestérolémique par 5, 10 ou 15% comme fibre diététique tandis que l'extrait de la peau de grenade a été ajouté à un régime hypercholestérolémique par 1, 2 ou 3%.

Les résultats ont montré que les rats hypercholestérolémiques ont subi des changements très importants dans tous les paramètres lipidiques testés en comparaison avec le groupe témoin négatif (rats normaux). Tous les rats hypercholestérolémiques administrés avec différentes doses de la poudre de la peau de grenade (5, 10 et 15%) ont montré une diminution significative de la consommation alimentaire et du taux de gain de poids corporel en comparaison avec le groupe témoin positif (rats hypercholestérolémiques) (**Labib Ahmed Hossin, 2009**).

Le poids des organes rate, reins, foie par rapport au poids corporel et tous les paramètres lipidiques testés, sauf HDL ont montré une diminution hautement significative pour tous les rats hypercholestérolémiques administrés avec différentes doses de poudre de peau de grenade (5, 10 et 15%) ou administrés avec différents niveaux d'extrait de peau de grenade (1, 2 et 3%) en comparaison au groupe témoin positif (**Labib Ahmed Hossin, 2009**).

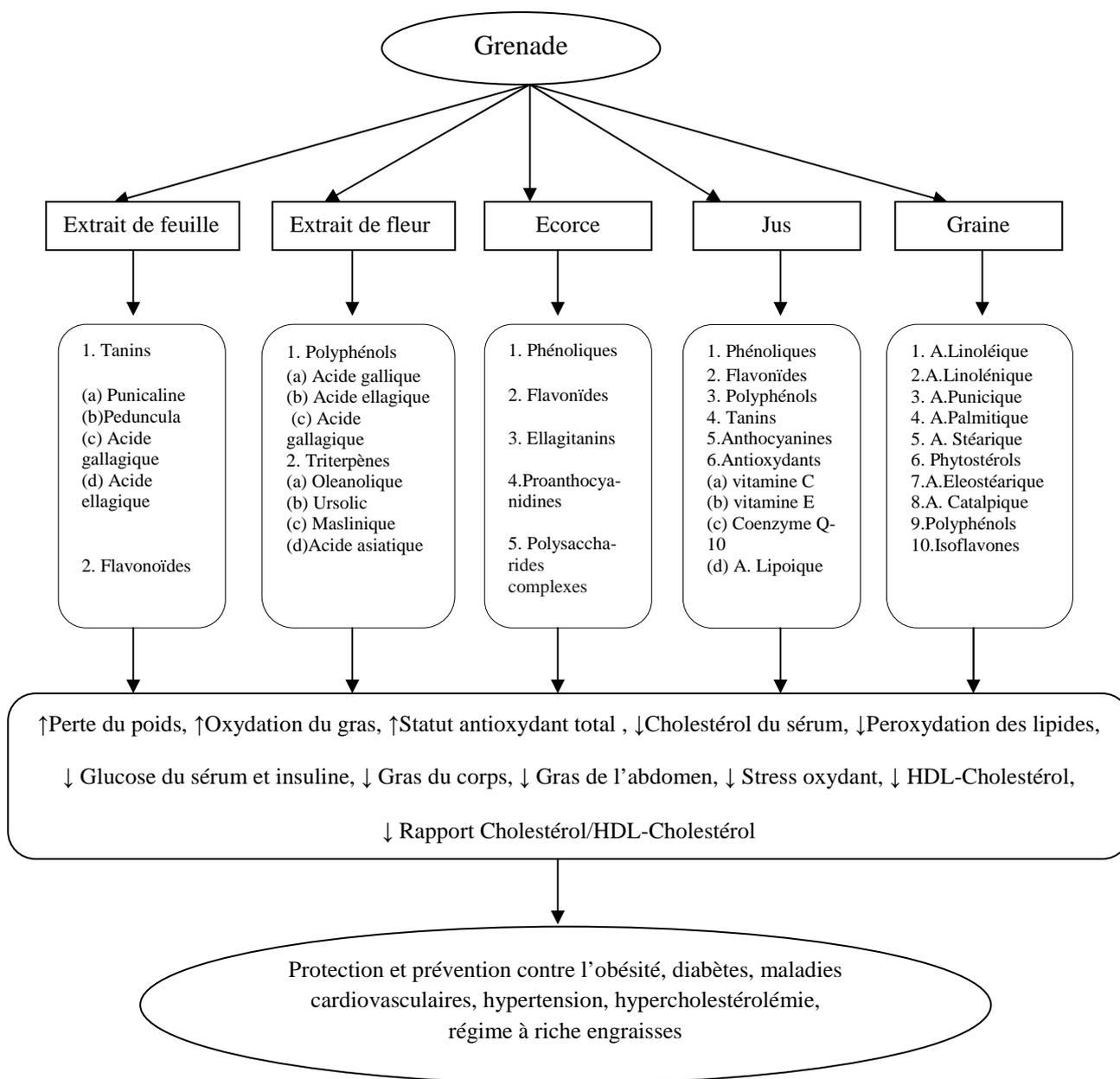


Figure 14 : Effets bénéfiques de peau de grenade et ses extraits (Nasser Al-Muammar et Khan, 2012)

4.5.3. Activité antifatique

L'effet des polyphénols extraits à partir de la peau de grenade (EPG) a été étudié sur la performance de natation chez le rat. Dans la présente étude, la propriété antifatique de l'EPG a été clairement établie pour la première fois; grâce à des activités enzymatiques réduites de la lactate déshydrogénase (LDH), lacréatine pyruvate kinase (CPK) et de la peroxydation lipidique,

l'augmentation de la production d'ATP avec un contenu en glycogène meilleur dans le foie et le muscle a appuyé les conclusions. Les niveaux accrus de la teneur en ADN et en ARN dans les tissus indiquant un catabolisme réduit des protéines dans les tissus aussi contribuent à la propriété antifatique des polyphénols de l'EPG (Swamy et al., 2011).

4.5.4. Activité antimicrobienne :

Selon Machado et al. (2003), les ellagitanins isolés dans la grenade ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistant et méthicilline-sensible, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 62.5 µg/ml.

Les fractions de l'acide ellagique, de l'acide gallagique, des punicallines, et des punicalagines extraits à partir de la grenade ont révélé une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistant, et d'autres bactéries nocives (Reddy et al., 2007).

Braga et al. (2005) ont évalué l'effet de l'extrait méthanolique de fruit entier de grenade sur *S. aureus* et la production ultérieure de l'entérotoxine. Ils ont suggéré que les extraits de grenade ont pu être considérés comme une thérapeutique antibactérienne potentielle avec la capacité additionnelle d'inhiber la production d'entérotoxine. Ils ont ajouté que les propriétés antibiotiques de l'extrait sont d'un intérêt extrême à la suite de la menace croissante des souches bactériennes développant une résistance aux antibiotiques conventionnels.

Endo et al. (2010) ont suggéré que la punicalagine isolée des peaux de grenade possède une forte activité contre *Candida albicans* et *Candida parapsilosis* de même la combinaison du punicalagine et du fluconazole a montré une action synergique très efficace.

Al-Zoreky (2009) a montré que l'extrait méthanolique 80% des peaux de grenade était un inhibiteur efficace contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica*.

4.5.5. Activité cicatrisante :

Comparée à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44 % de composés phénoliques) à 5 % permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de dix jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris, alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins. Les analyses par HPLC montrent que les composants

majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy et al., 2004).

4.5.6. Action anti-ulcère

L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol, grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait de grenade à 70 %, le pourcentage d'inhibition s'élève, respectivement, à 22,37 et 74,21 pour les ulcères induits par l'aspirine et à 21,95 et 63,41 pour ceux induits par l'éthanol. Chez les animaux traités, les taux *in vivo* d'antioxydants telles que la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion et la glutathion peroxydase ont été augmentés pour atteindre des valeurs proches de la normale.

Le taux de peroxydation lipidique des tissus est diminué chez les animaux traités par rapport au groupe témoin. De plus, alors que l'estomac des animaux témoins montre une érosion sévère de la muqueuse gastrique, des œdèmes sous-muqueux et une infiltration par les neutrophiles, celui des animaux traités à l'extrait de peau de grenade ne montre aucun de ces symptômes (Ajaikumar et al., 2005).

4.5.7. 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 intéressant pour le traitement de la leucémie, mais aussi des cancers du sein ou de la prostate. Ainsi, les fractions riches en polyphénols de grenade ont une activité antiproliférative, anti-invasive, anti-eïcosanoïde, anti-angiogène et proapoptose sur des cellules cancéreuses de sein et de prostate. Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que des extraits riches en flavonoïdes, obtenus l'un à partir de jus de grenade fermenté et l'autre à partir de péricarpe de grenade, sont fortement promoteurs de différenciation, alors que l'extrait de jus de grenade frais a un effet plutôt faible. Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (Kawaii et Lansky, 2004).

4.6. Toxicité des polyphénols de grenade :

Il a été dit que la punicalagine, le tanin ellagique hydrosoluble et le polyphénol antioxydant très abondant dans le jus de grenade (□2 g/l) étaient toxiques pour le bétail. Une étude a donc été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ce composé via un régime enrichi en punicalagine à hauteur 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 adverse significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa moindre appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang, sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (Cerda et al., 2003).

4.7.Extrait de peau de grenade comme additif fonctionnel :

De nombreux conservateurs sont ajoutés aux aliments comme antioxydants ou agents antimicrobiens. Les composés phénoliques sont connus pour posséder les deux propriétés (Shahidi et Naczki, 2004).

De ce point de vue, l'extrait de grenade peut servir d'additif fonctionnel avec l'action d'antioxydant et entre-temps exercer un effet antibactérien. L'extrait de peau de grenade a été trouvé efficace comme antioxydant dans le pâté de poulet en le protégeant contre la rancidité oxydante. L'industrie de viande pourrait utiliser ces fruits ou sous-produits de fruit comme une source potentielle des composés phénoliques due à leur immense valeur nutraceutique et qui peut être employée pour produire la viande fonctionnelle (Naveena et al., 2008).

Une étude a été effectuée par Naveena et al. (2008) pour évaluer le potentiel antioxydant du jus de grenade (JG), de l'extrait de poudre de l'écorce (EPE) et de butyl-hydroxy-toluène (BHT) dans les pâtés cuits de viande de poulet pendant le stockage réfrigéré (en conditions aérobies à 4°C pendant 15 jours). Les résultats obtenus ont montré que les composés phénoliques de peau de grenade inhibent de manière significative l'oxydation de lipides dans les pâtés à une étendue beaucoup plus grande que JG et BHT (augmentation de la teneur en polyphénols totaux, réduction des valeurs de TBARS sans affecter les attributs sensoriels). L'addition de JG ou l'EPE à un niveau de 10 mg équivalent polyphénols/100 g de viande serait suffisant pour protéger les pâtés de poulet contre la rancidité oxydante pendant des périodes plus longues que l'antioxydant synthétique le plus généralement utilisé comme le BHT.

Dans une autre étude, Devatkal et al. (2010) ont évalué l'effet antioxydant des extraits des sous-produits de fruit à savoir, la poudre d'écorce de kinnow (PEK), de la poudre d'écorce de grenade (PEG) et de la poudre de graine de grenade (PGG) dans les pâtés de viande de chèvre pendant le stockage réfrigéré (à 4°C pendant 12 jours).

Les petits pâtés traités ont montré une réduction significative de la valeur Hunter Lab L et de la valeur de TBARS par rapport aux pâtés témoins. La poudre de peau de grenade a donné les meilleurs résultats suivie de la poudre de graine de grenade (PGG) et la poudre d'écorce de kinnow.

Kanatt, Chander et Sharma (2010) ont montré que l'addition de l'extrait de peau de grenade aux produits de viande de poulet a augmenté la durée de conservation à 2 à 3 semaines pendant le stockage réfrigéré grâce à une bonne activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas* et une activité antioxydante efficace en inhibant la rancidité oxydative des produits de poulet.

- **Probiotiques :**

L'effet supplémentation de l'acide ellagique, de l'acide gallique, de l'extrait de graine de raisin, de l'extrait de peau de grenade, et de l'huile essentielle de menthe poivrée sur les propriétés sensorielles et antioxydantes de la crème glacée probiotique produite en utilisant *Lactobacillus casei* Shirota a été déterminé. En plus, la survie de *L. casei* dans la crème glacée et son interaction avec les suppléments ont été également étudiées.

La supplémentation avec l'extrait de peau de grenade a donné le meilleur résultat pour tous les paramètres. Elle a apporté la meilleure contribution à la teneur phénolique et à l'activité antiradicalaire à la crème glacée avec un score sensoriel acceptable. Les meilleurs comportements bactériens : adaptation et survie élevées faible diminution du nombre bactérien ont été observés dans la crème glacée supplémentée avec l'acide gallique et l'extrait de peau de grenade (**Sagdic et al., 2011**).

L'addition de l'extrait sec de peau de grenade à 0.5% dans les jus de tomates et jus d'orange avec les fraises a donné de bons résultats avec une augmentation significative des polyphénols et de l'activité antioxydante avec une meilleure acceptation de jury de dégustation (**Salgado et al., 2012**).

- **Alimentation animale :**

Les déchets restants de la production de jus peuvent être utilisés par exemple comme matière première pour l'extrait de peau de grenade. La pratique de son utilisation comme source des antioxydants en alimentation de bétail est développée. **Shabtay et al. (2008)** ont étudié l'effet de la supplémentation diététique des veaux avec les peaux fraîches de grenade et ont constaté qu'elles favorisaient des augmentations significatives de la prise d'alimentation et de la concentration en α -tocophérol dans le plasma, avec la tendance positive envers le gain de poids accru des veaux.

- Produit fongicide :

L'application de l'extrait de la peau de grenade comme fongicide efficace, respectueux à l'environnement contre les champignons pathogènes des plantes a été étudiée.

L'aérosolisation avec l'extrait de la peau de grenade a confirmé son efficacité comme agent d'aseptisation antifongique contre *Penicillium digitatum*. La prévention et le contrôle des agrumes récoltés envahis par la moisissure verte de citron *P. digitatum*, *in vivo*, ont été appliqués avec succès en immergeant le fruit blessé dans des solutions d'EPG. Par conséquent, l'application de ce dernier pour le contrôle de ce champignon via l'hygiène des salles d'entreposage et de traitement du fruit récolté a été recommandé (Tayel et al., 2009).

- Substrat de fermentation :

Des études effectuées ont suggéré que les résidus du fruit de grenade peuvent être utilisés comme substrat alternatif attrayant pour la production biotechnologique de l'acide ellagique comme résultat de l'hydrolyse des ellagitanins.

L'importance de ce composé est due à ses propriétés diverses rapportées comme fortes telles que les capacités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tumorale, antimicrobienne, antivirale, antiproliférative (Aguilera-Carbo et al., 2007).

Les peaux de grenade (*Punica granatum*) ont été caractérisées pour leur utilisation comme source d'antioxydants, substrat et support de fermentation à l'état solide.

Aguilar et al. (2008) ont montré que le processus de la fermentation fongique par *Aspergillus niger* GH1 a conduit à une forte accumulation de l'acide ellagique, une diminution de la teneur en sucres réducteurs et augmentation de la fraction de masse de protéines 19 fois après 96 h de culture

Robledo et al. (2008) ont caractérisé deux souches d'*Aspergillus niger* (GH1 et PSH) préalablement isolées à partir d'une région semi-aride du Mexique pour leur efficacité dans la bioconversion. L'activité de l'enzyme tanin acyle hydrolase (TAH) n'a pas été clairement associée à la production de l'acide ellagique. L'acide ellagique qui s'est accumulé dans les cultures d'*A. Niger* GH1 était remarquablement pur après un procédé d'extraction simple.

I. Extraction, dosage et évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols

1.1. Matériel végétal :

Les grenades (*Punicagranatum* L., variété Sefri) ont été achetées du marché local. Seuls les fruits mûrs et intacts ont été sélectionnés pour cette étude.

Pour préparer la poudre de l'écorce (ou peau) de grenade, les fruits sont d'abord lavés 2 fois avec de l'eau distillée, les écorces sont enlevées manuellement, puis séchés au soleil et pulvérisées à l'aide d'un broyeur Moulinex pour les faire passer à travers un tamis de 1 mm (**Iqbal et al., 2008**).

1.2. Extraction des polyphénols de la poudre de peau de grenade :

Les polyphénols ont été extraits de la poudre au moyen d'un extracteur Soxhlet en utilisant les solvants suivants : méthanol (polaire avec une constante diélectrique de 33); acétone (polaire avec une constante diélectrique de 21) et acétate d'éthyle (non polaire avec une constante diélectrique de 6). 8 h pour chacun afin d'extraire les différents types de composants antioxydants.

L'extrait obtenu a été ensuite filtré à l'aide du papier filtre Whatman n° 41 pour enlever les particules de l'écorce puis concentré sous vide à 40 °C (**Singh et al., 2001; Li et al., 2006; Ardekani et al., 2011**).

1.2.1. Calcul du rendement de l'extraction :

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule suivante :

$$R\% = (PES / PE) * 100$$

- R% : Rendement en pourcentage
- PES : poids de l'extrait sec (g)
- PE : poids de l'échantillon (poudre) (g).

1.3. Dosage des composés phénoliques :

1.3.1. Polyphénols totaux:

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait est déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

Protocole expérimental :

Les polyphénols totaux ont été déterminés selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par **Li et al.(2006)** :

- Dans un tube à essai, 0,5 ml de l'extrait méthanolique (10 mg d'extrait sec dans 100 ml du méthanol) est ajouté à 2,5 ml de réactif de Folin–Ciocalteu dilué dix fois.
- Juste après un moment variant entre 30 secondes et 8 minutes, 2 ml de carbonate de sodium à 7.5% (75 g/L) sont additionnées.
- Les tubes à essai sont maintenus à l'obscurité pendant 30 min à température du laboratoire, l'absorbance est mesurée à 760 nm.
- Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait méthanolique par le méthanol.
- Les polyphénols totaux sont quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par mesure des absorbances des concentrations connues de solutions étalons de l'acide gallique (20-100 µg/ml dans le méthanol).
- Les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique par rapport à la matière sèche (mg EAG/g MS).

1.3.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont été déterminées selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) de **Blasa et al.(2005)** modifié par **Viuda-Martos et al. (2011)**.

- 1 ml de l'extrait méthanolique (10 mg de l'extrait sec dans 10 ml du méthanol) est ajouté dans un tube à essai avec 4 ml d'eau distillée.
- Au temps 0 (T₀), 0,3 ml de sodium nitrite (NaNO₂) à 5% sont additionnés.
- Après 5 minutes, 0,3 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% sont ajoutés.
- A la 6^{ème} minute, 2 ml de NaOH 1M sont ajoutés.
- Le mélange est dilué avec 2,4 ml d'eau distillée pour avoir un volume final de 10 ml.
- L'absorbance est lue à 510 nm contre le blanc (méthanol).
- Les flavonoïdes sont quantifiées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par mesure des absorbances des concentrations connues de solutions étalons de la quercétine (20-100 µg/ml dans le méthanol).
- Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait sec (mgEQ/g).

1.3.3. Tanins hydrolysables :

Les anthocyanines ont été déterminées selon la méthode de **Willis et Allen (1998)** modifié par **Çam et Hişil (2010)** :

- Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait dilué dix fois et 5ml de KIO_3 à 2,5% sont mélangés et vortexés pendant 10 secondes.
- Le temps de réaction optimal pour obtenir la valeur maximale d'absorbance a été déterminé de 2 minutes pour les extraits de peau de grenade et de 4 minutes pour les solutions étalons de l'acide tannique.
- L'absorbance du mélange de couleur rouge a été déterminée à 550 nm contre le blanc (eau distillée).
- Six concentrations différentes de solutions d'acide tannique (500-2000 $\mu\text{g/ml}$) sont préparées pour l'étalonnage.
- Les résultats finaux sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par g de matière sèche(mg EAT/g MS).

Tous les dosages ont été réalisés en triplicata (3 répétitions pour toutes les concentrations).

1.4. Détermination de l'activité antioxydante :

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de peau de grenade, 4 tests ont été réalisés : pouvoir réducteur, pouvoir de piégeage du radical DPPH, peroxydation de l'acide linoléique et chélation de fer.

1.4.1. Pouvoir réducteur :

L'aptitude des phénols totaux à réduire le fer ferrique Fe (III) en Fe (II) est évaluée par la méthode d'**Oyaizu (1986)**.

Protocole expérimental :

- 0,125 ml de différentes concentrations de l'extrait méthanolique (2, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) sont mélangés avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de hexacyanoferrate de potassium [$\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$] à 1 %.
- Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (p/v) sont ajoutés, le mélange est centrifugé à 3000 t/min pendant 10 min.

- La phase supérieure de la solution (2,5 ml) est mélangée avec 2,5 ml de l'eau distillée et 0,5ml de chlorure de fer (III) (FeCl₃) à 0,1 %.
- L'absorbance est mesurée spectrophotométriquement à 700 nm.
- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'acide ascorbique, α -Tocophérol et le BHT à différentes concentrations sont utilisés comme standard.

Une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé. La concentration en extrait fournissant 0.5 d'absorbance (EC50) ou la concentration effective a été calculée à partir du graphique de l'absorbance à 700 nm contre la concentration en extrait (**Ferreira et al., 2007**).

1.4.2. Pouvoir de piégeage du radical DPPH

Principe :

Le diphenyle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (**Sanchez-Moreno, 2002**). On peut résumer la réaction de la manière suivante :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyle picrylhydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Protocole expérimental :

Le test utilisant le radical DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Sahin et al. (2004)**.

25 μ l de la solution méthanolique de l'extrait phénolique (reconstitué selon la concentration voulue) et 0.975 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.0024 g/100 ml méthanol) sont ajoutés dans une cuvette après incubation pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre le méthanol.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT, l'acide ascorbique et l' α -Tocophérol pris comme antioxydant standard. L'activité antiradicalaire (AA) est estimée selon la formule suivante :

$$AA\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

- **Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)**

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

1.4.3. Activité antioxydante totale dans le système acide linoléique :

La méthode de thiocyanate ferrique (FTC) mesure la quantité de peroxydes produits à l'étape initiale de l'émulsion d'acide linoléique pendant l'incubation. Ici, le peroxyde réagit avec du chlorure ferreux $FeCl_2$ pour former le chlorure ferrique $FeCl_3$, qui réagit alternativement avec du thiocyanate d'ammonium pour produire le thiocyanate ferrique, un pigment rougeâtre. Une valeur faible d'absorbance mesurée par l'intermédiaire de la méthode de FTC indique une activité antioxydante élevée (**Kim et Kim, 2010**).

Protocole expérimental :

La peroxydation de l'acide linoléique a été déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique (FTC) décrite par **Zou et al. (2004)** :

- L'émulsion d'acide linoléique est préparée en mélangeant 0.28 g d'acide linoléique, 0.28 g de Tween 20 comme émulsifiant, et 50 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 7.0), et alors le mélange est homogénéisé.
- 0.5 ml de la solution (0.5 mg/ml) est mélangée à 2.5 ml de l'émulsion d'acide linoléique (0.2 M, pH 7.0) et 2 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 7.0).
- Le mélange réactionnel est incubé à 37 °C dans l'obscurité pour accélérer la peroxydation. Les niveaux de peroxydation sont déterminés selon la méthode de thiocyanate (0.1 ml, 30%),
- Un volume de 0.1 ml du mélange est ajouté à 5.0 ml d'éthanol à 75%, 0.1 ml de thiocyanate d'ammonium à 30% et 0.1 ml de chlorure ferreux 20 mM dans HCl 3.5% et laissé à la température ambiante pendant 3 mn précisément après addition de chlorure ferreux au mélange de la réaction, l'absorbance est lue à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- La même procédure est appliquée aux standards (références de comparaison) : BHT et α -Tocophérol.

L'activité antioxydante exprimée comme le pourcentage d'inhibition de la peroxydation (IP%) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{IP\%} = \{[1 - (\text{abs de l'échantillon}) / (\text{abs de témoin})] \times 100\}$$

1.4.4. Activité de chélation des métaux :

Principe :

L'activité de chélation de l'ion fer est donc, un indicateur important de la capacité antioxydante d'un composé. La méthode employée est basée sur la formation d'un complexe coloré de Fe^{2+} □ Ferrozine qui absorbe au maximum à 562 nm. En présence d'un composé chélateur, Fe^{2+} n'est plus disponible pour former un complexe coloré, comme reflété par une diminution d'absorbance (Ates et al., 2008).

Protocole expérimental :

La capacité de chélation du fer a été déterminée selon la méthode de **Dinis et al. (1994)**.

- Dans un tube à essai, 1 ml de l'extrait méthanolique (concentrations 100, 200, 500 et 1000 µg/ml) est mélangé à 3.7 ml de méthanol et à 0.1 ml de FeCl_2 2 mM.
- La réaction est initiée par l'addition de 0.2 ml de ferrozine 5 mM.
- Le méthanol au lieu de la solution de l'extrait est utilisé comme témoin.
- Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 562 nm contre le blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la ferrozine (0.2 ml) par le méthanol (b), et qui est employé pour la correction d'erreurs en raison de la couleur inégale des solutions d'échantillons.
- Dans le but de comparer les résultats, l'EDTA a été utilisé comme standard de référence.

Une absorbance faible indique une activité de chélation de fer élevée. L'activité de chélation de l'ion de fer est calculée comme suit

$$\% \text{ CCIF} = \{[1 - (\text{abs de l'échantillon}) / (\text{abs de témoin})] \times 100\}$$

- **CCIF** : Capacité de chélation de l'ion ferreux

Tous les dosages des différents tests de l'activité antioxydante ont été réalisés en triplicata (3 répétitions pour chaque concentration).

II. Test de la stabilité oxydative des huiles à l'étuve ou test de Schaal

2.1. Choix des huiles :

Le choix des huiles pour l'essai a été basé sur la composition en acides gras polyinsaturés. L'huile de tournesol contient une teneur élevée en acide linoléique (18:2 n-6) et l'huile de soja est riche en acide linoléique (18:3 n-3) en plus de l'acide linoléique. Le test à l'étuve ou test de Schaal (**Fennema, 1976**) est effectué pour évaluer l'effet des antioxydants contre l'oxydation des huiles pendant le stockage accéléré.

2.2. Préparations des concentrations :

Trois concentrations de l'extrait phénolique de la peau de grenade (250, 500, 1000 ppm) (**Iqbal et al., 2008**) et une concentration de l'antioxydant synthétique le BHT qui est utilisé à sa limite légale de 200 ppm (**Duh et Yen, 1997**) sont ajoutées à l'huile de tournesol et à l'huile de soja (huiles raffinées sans antioxydants CEVITAL) pour examiner leur activité antioxydante.

Un volume de l'extrait dissous dans le méthanol est ajouté aux huiles. Les échantillons sont agités pendant 30 minutes à 50° C pour une dispersion uniforme (**Sultana et al., 2008**). Un échantillon témoin est préparé en ajoutant la même quantité de méthanol utilisée pour dissoudre l'antioxydant synthétique et l'extrait.

2.3. Test à l'étuve ou test de Schaal :

La température de 63 °C a été utilisée comme méthode rapide pour simuler les conditions réelles de stockage (**Besbes et al., 2004**).

Tous les échantillons (150 ml de chaque) ont été placés dans une série de bouteilles en verre transparentes ayant un volume de 250 ml, sans bouchon et stockés dans une étuve à la température fixe du 63° C

Les échantillons témoins ont été également placés dans les mêmes conditions de stockage. Les analyses sont effectuées après des intervalles réguliers de 4 jours (96 h) pendant 20 jours.

2.4. Les analyses des huiles :

2.4.1. Détermination des diènes conjugués NF ISO 3656

Tous les corps gras naturels contenant au moins une faible quantité de l'acide linoléique, l'oxydation d'un corps gras conduit à la formation d'hydroperoxyde linoléique, diène conjugué qui absorbe au voisinage de 232 nm.

Plus l'extinction à 232 nm est forte, plus l'huile est peroxydée.

Protocole expérimental :

Dissoudre 100 mg d'huile dans 10 ml de cyclohexane. Diluer 25 fois cette solution, et mesurer sur la solution à 0.1 % obtenue l'absorbance à 232 nm

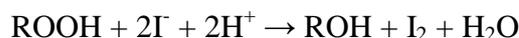
Les diènes conjugués sont calculés à partir de leur absorbance et exprimés comme coefficient d'extinction E :

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{A_{\lambda}}{(c_L \times l)}$$

- A_{λ} : Absorbance mesurée à 232 nm ;
- C_L : Concentration de la solution lipidique ;
- l : Longueur de trajet dans la cuvette en cm.

2.4.2. Détermination de l'indice de peroxyde (IP) :**Principe :**

Les peroxydes en général (ROOH) peuvent être mesurés par les méthodes titrimétriques basées sur leur potentiel d'oxydation de l'iodure (I^-) à l'iode (I_2) :



qui est ensuite titré contre une solution standard de thiosulfate de sodium :

Amidon

**Protocol expérimental :**

L'indice de peroxyde est déterminé d'après la méthode décrite par Zhang et al. (2010) :

- 2 g d'huile sont dissous dans 30 ml de mélange acide acétique glacial : chloroforme (3:2, v/v). Puis 1 ml d'une solution saturée de KI est ajouté.
- Le mélange est secoué à la main pendant 1 minute et ensuite il est maintenu dans l'obscurité pendant 5 minutes.
- Après l'addition de 75 ml d'eau distillée, le mélange est titré contre le thiosulfate de sodium (0.02 M) jusqu'à presque la disparition de la couleur jaune.
- Ensuite, 0.5 ml de solution d'empois d'amidon (1%) est additionné.
- La titration continue jusqu'à la disparition de la couleur bleue.
- Un blanc est également analysé dans les conditions semblables.

L'indice de peroxyde (meq/kg) a été calculé selon la formule suivante :

$$IP = C \times (V - V_k) \times 12,69 \times 78,8/m$$

où :

- **C** : est la concentration du thiosulfate de sodium (m) ;
- **V** et **V_k** : sont le volume (ml) de thiosulfate de sodium épuisé par l'échantillon et blanc, respectivement;
- **m** : est la masse d'huile de tournesol (g).

2.4.3. Indice de *para*-Anisidine (IUPAC, 1987) :

Principe :

La méthode de l'indice de *p*-anisidine (IPA) mesure la teneur des aldéhydes (principalement 2-alkenals et 2,4-alkadienals) produits générés pendant la décomposition des hydroperoxydes. Elle est basée sur la coloration du *p*-methoxyaniline (anisidine) et les composés aldéhydiques (Doleschall *et al.*, 2002).

La réaction du réactif de *p*-anisidine avec les aldéhydes sous des conditions acides donne des produits jaunâtres qui absorbent à 350 nm (figure 15) (Shahidi et Zhong, 2005).

Plus l'absorbance est grande plus sera grande la concentration des aldéhydes, et plus sera faible la stabilité oxydante d'huile (Anwar *et al.*, 2004).

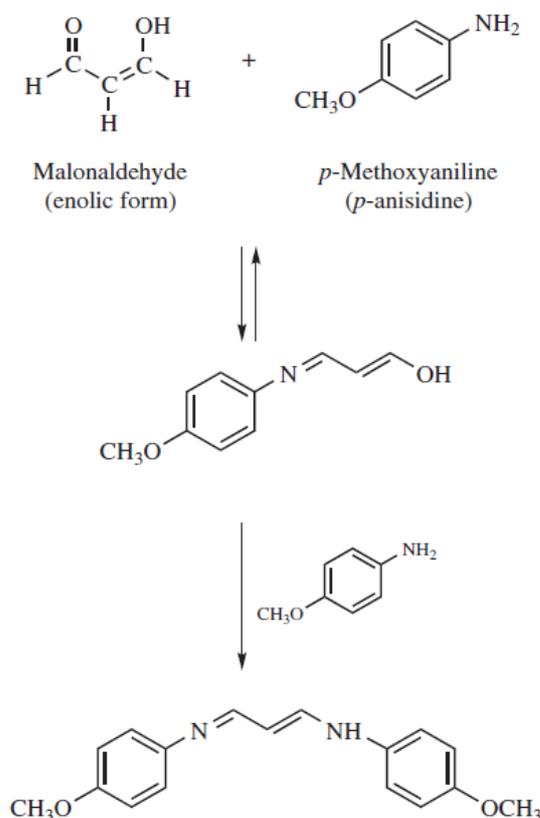


Figure 15 : Réactions possibles entre le réactif de *p*-anisidine et le malonaldéhyde

Protocole expérimental :

2 g d'huile sont mélangés avec 25 ml de n-hexane. L'absorbance A_1 de la solution est mesurée contre le n-hexane. Dans une manipulation séparée, 5 ml de la solution d'échantillon sont mélangés avec 1 ml de p-anisidine (2,5 g/L) préparé dans l'acide acétique glacial. Un blanc est préparé avec 5 ml de n-hexane. L'échantillon et le blanc sont maintenus dans l'obscurité à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance A_2 de l'échantillon est mesurée contre le blanc.

La valeur de p-anisidine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{VPA} = 25 (1,2A_2 - A_1)/M$$

- **M** : masse de l'huile
- **A_1** : Absorbance de la solution avant réaction avec le réactif *p*-anisidine
- **A_2** : Absorbance de la solution après réaction avec le réactif *p*-anisidine

2.4.4. Dosage des acides gras par chromatographie en phase gaz (CPG)

La teneur en acide gras totaux a été réalisée avant et après stockage (étuvage) à 63°C durant 20 jours par chromatographie en phase gaz (CPG). L'injection en CPG d'un corps gras est précédée d'une méthylation des acides gras, présents sous forme libre ou estérifiée dans le mélange, afin de les rendre plus volatils.

Principe :

Le corps gras est estérifié en présence de méthanol, les esters méthyliques d'acides gras sont séparés sur une colonne polaire en fonction de leur poids moléculaire. La surface correspondant à chacun d'eux est calculée et rapportée à la surface totale des différents acides gras pour obtenir un pourcentage.

Protocole expérimental :

La méthylation a été faite selon la méthode décrite par **Patumi et al. (2003)**. C'est une méthode simple, rapide et ne demande qu'une petite quantité de matière grasse. Elle fait appel à un traitement par l'hydroxyde de potassium (KOH) méthanolique 2 M et de l'hexane.

- 0.3 g d'huile est ajouté à 4 ml d'hexane et 400 µl de la solution KOH méthanolique 2M.
- Agiter vigoureusement pendant une minute et laisser décanter.
- La phase hexanique contenant les acides gras méthylés est séparée puis analysée par chromatographie phase gaz (CPG), selon les conditions opératoires suivantes :

**Conditions opératoires pour les esters méthyliques des huiles
alimentaires**

Chromatographe	Chrompack CP 9002
Détecteur	FID
Injecteur	SPLIT 1/100
Colonne capillaire	DB 23
Longueur	30 m
Diamètre intérieur	0.32 mm
Epaisseur	0.25 μm
Gaz vecteur	Azote
Température de l'injecteur	250°C
Température de détecteur	250°C
Température du Four	190°C
Quantité injectée	0.2 μl
Vitesse du papier	0.5 cm/min

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

3.1. Etude de l'effet inhibiteur (analyse qualitative) :

La méthode utilisée pour cette analyse est celle de la diffusion sur milieu gélosé ou technique de l'aromatogramme qui permet de déterminer la sensibilité des germes aux extraits végétaux étudiés.

C'est une technique microbiologique récente et la plus utilisée par les laboratoires de diagnostic. Elle est validée par le laboratoire de microbiologie de CRD-SAIDAL. Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (**Pharmacopée Européenne, 2002**).

Principe :

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 9 mm de diamètre imprégné de la solution méthanolique d'extrait, sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant, appelée : *Halo* ou *zone d'inhibition*.

3.1.1. Souches microbiennes testées :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait, 7 souches microbiennes de références ATCC (American Type Culture Collection) issues de la collection du CRD-SAIDAL ont été testées. La liste des souches microbiennes est mentionnée dans le tableau 6.

Tableau 6: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae
<i>Candida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	Saccharomycetaceae

Protocole expérimental :

a. Préparation de l'inoculum :

- A partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures), réaliser des suspensions microbiennes qu'on dépose dans 9ml d'eau physiologique stérile puis agiter au vortex.
- Réaliser une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm en estimant la transmittance entre 22 et 32% (0.2 à 0.3) pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 30 et 40% (0.3 à 0.4) et entre 2 et 3% pour les levures, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml.
- Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessous correspondent à une concentration optimale de $10^7 - 10^8$ germes/ml, si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, elle est ajustée en ajoutant de l'eau physiologique si elle est supérieure à la valeur maximale ou en ajoutant des colonies si elle est inférieure à la valeur minimale. A chaque fois, une nouvelle lecture de la transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

b. Préparation de la première couche du milieu de culture :

- Faire fondre les milieux Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures dans un bain marie réglé à 95°C.
- Verser aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte avec 2 répétitions par souche.
- Laisser refroidir et solidifier sur paillasse.

c. Préparation de deuxième couche du milieu :

- Faire fondre les deux milieux MH et SAB.
- Laisser refroidir jusqu'à une température de 45°C.
- Mettre dans des flacons de 50 ml le milieu correspondant pour chacune des souches.
- Ensemencer les milieux avec 200 µl de la suspension microbienne.
- Agiter manuellement puis transvaser rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme.
- Laisser solidifier sur la paillasse.

d. Dépôt des disques :

- Prélever un disque de cellulose stérile à l'aide d'une pince stérile.
- A l'aide d'une micropipette, imbiber avec la solution d'extrait (30 μ l) à tester en mettant en contact seulement le bout des disques, et celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Les disques en papier sont laissés pendant 3 minutes pour que le méthanol s'évapore avant de les placer dans les boîtes inoculées. (**Hayrapetyan et al., 2012**).
- Déposer les disques sur la surface de la gélose (figure 16).
- Laisser diffuser pendant 30 mn.
- Incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

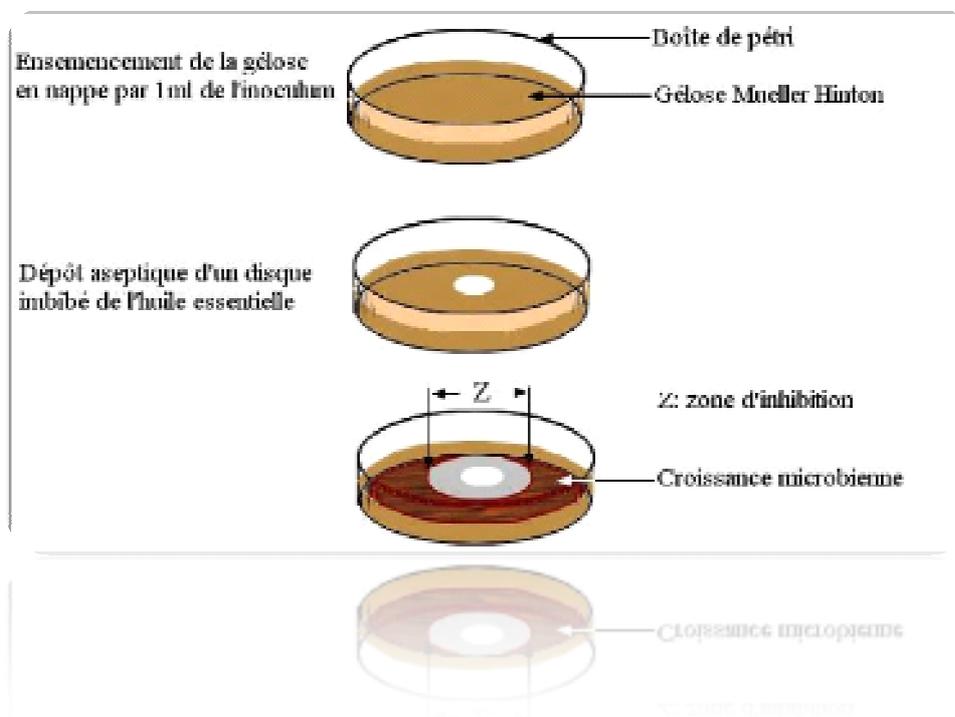


Figure 16 : Illustration de la méthode d'aromatogramme

e. Lecture des résultats :

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour chacune des souches à l'aide d'une règle à coulisse.

- Présence de zone claire autour du disque : présence d'activité inhibitrice.
- Absence de zone claire autour du disque : absence d'activité inhibitrice.

3.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien

Cette étude est réalisée dans le but de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) des souches les plus sensibles aux échantillons testés.

3.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide :

Principe :

Les concentrations minimales inhibitrices sont définies comme la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après 24 h d'incubation pour les bactéries et 48 h pour les levures.

La CMI est déterminée selon la méthode de dilution dans un milieu gélosé (Muller-Hinton).

Protocole expérimental :

a. Préparation de l'inoculum :

A partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures), on réalise des suspensions de 10^8 germes/ml (dilution 10^0), à partir de cette suspension on prépare une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} .

b. Préparation de la gamme de dilutions de la solution méthanolique de l'extrait testé :

- Liquéfaction de 200 ml du milieu MH à 95°C dans un bain marie ; en lui additionnant 1 ml de tween 80, puis on le laisse 10 min dans l'étuve à 45°C.
- Préparer une série de dilution de l'extrait allant de 2 jusqu'à 0,03% , en diluant 1ml de l'extrait méthanolique (concentrations 25, 50 et 100 mg/ml) dans 50 ml de milieu dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 2%.
- Verser la moitié du 1^{er} flacon dans un 2^{ème} flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution 1%.
- Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0,03%.
- Verser chaque dilution dans la boîte de Pétri et laisser solidifier.

c. Ensemencement des boîtes :

- Diviser la boîte de Pétri en deux et déposer les disques correspondant à chaque souche bactérienne dans la première moitié de la boîte
- Ensemencer les boîtes par spotage à l'aide d'une micro seringue à raison de 2-3 µl des suspensions microbiennes de 10^4 germes/ml dans le disque et dans le milieu de façon à ce que les deux spots soient opposés.

3.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

Après repérage des disques où aucune croissance bactérienne n'est présente lors de la détermination de la CMI, ces disques seront utilisés dans la détermination de la CMB.

Cette partie consiste à déterminer la plus faible concentration de l'extrait où aucune subcroissance microbienne n'est visible après subculture dans un milieu indemne de l'extrait.

Protocole expérimental :

- Liquéfier le milieu MH à 95°C dans un bain marie
- Couler les boîtes de pétri et laisser solidifier
- Avec une pince stérile, on prélève aseptiquement les disques correspondants aux concentrations de l'extrait où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination de la CMI.
- On replace les disques dans les boîtes de pétri déjà préparée
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture des résultats :

La lecture se fait à l'œil nue, la CMB sera là où aucune subcroissance d'une souche donnée n'est constatée après subculture.

Le rapport CMB/CMI permet de déterminer les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des extraits végétaux. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand ce rapport est inférieur ou égal à 4 (**Dramane et al., 2010**).

IV. Analyses statistiques des données

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques, et lors du test de la stabilité oxydative des huiles étudiées ont fait l'objet d'une analyse statistique à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics version 19.0 :

- Analyse de la variance à intervalle de confiance de 95 % (ANOVA), dans le but de donner une signification statistique aux résultats trouvés ;
- Test de Student pour échantillons appariés.

I. Rendement, teneur et activité antioxydante des composés phénoliques de l'extrait sec

1.1. Rendement en extrait sec :

La polarité d'un solvant en dehors du moment dipolaire, la polarisabilité et la liaison d'hydrogène déterminent quel type de composés est capable de dissoudre (Wang *et al.*, 2011).

Les antioxydants à base de plantes sont extraits des matières premières ou des déchets de l'industrie alimentaire par les solvants organiques tels que le méthanol, l'acétone et l'éther diéthylique. Le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, donc c'est un solvant fréquemment utilisé à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle. Il est facilement accessible et à bon marché (Wang *et al.*, 2004).

Les polyphénols de la peau de grenade sont extraits principalement par le méthanol ou des combinaisons de méthanol et autres solvants organiques par les techniques classiques d'extraction (Çam et Hisil, 2010).

Singh *et al.* (2002) ont extrait les antioxydants à partir de la peau et de la pulpe de grenade en utilisant du méthanol, de l'acétone ou de l'eau et ont constaté que le méthanol a donné le meilleur rendement.

Iqbal *et al.* (2008) ont observé que le rendement le plus élevé est obtenu avec le méthanol suivi de l'éthanol, de l'acétone, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et de l'eau, respectivement. Ces résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment par Iqbal *et al.* (2005), qui ont rapporté que le méthanol est habituellement recommandé pour l'extraction des composés antioxydants.

Li *et al.* (2006) ; Aderkani *et al.* (2011) considèrent qu'une combinaison de différents solvants peut être plus efficace pour extraire les antioxydants parce que les antioxydants peuvent différer par leur solubilité dans les différents solvants.

Tableau 7 : Rendement et teneur en composés phénoliques

	Rendement (%) ^a	Polyphénols totaux ^b	Flavonoïdes ^c	Tanins hydrolysables ^d
EPG	46	448,4 ± 5,68	30,37 ± 0,4	374,92 ± 5,44

a : pourcentage en matière sèche

b : mg/g équivalent acide gallique (EAG)

c : mg/g équivalent quercétine (EQ)

d : mg/g équivalent acide tannique (EAT)

L'extraction des polyphénols de grenade par différents solvants (méthanol, acétone et acétate d'éthyle) a donné un rendement de 46% de matière sèche. Comparativement à certaines études

(tableau 8), ce mode d'extraction apparaît très efficace dans l'extraction des antioxydants de la peau de grenade.

Tableau 8 : Rendement en extrait sec de peau de grenade rapporté par certains auteurs

Auteur	Solvant	Rendement (% MS)
Okonogi <i>et al.</i> (2007)	Ethanol à 95 %	6.21%
Sultana <i>et al.</i> (2008)	Méthanol 80 %	29.9%
Iqbal <i>et al.</i> (2008)	Méthanol	29%
	Acétone	27%
	Ethanol	21%
Li <i>et al.</i> (2006)	Mélange de solvants	31.5(% MF)

Des études précédentes rapportent que les plantes ayant des rendements élevés en extraits contiennent une forte teneur en composés phénoliques (Lehtinen et Laakso, 1998 ; Borneley et Peyrat-Maillard, 2000).

Li *et al.* (2006) ont trouvé que l'activité antioxydante (mesurée par le test FRAP) de l'extrait de peau de grenade obtenu au moyen d'un mélange, composé de méthanol, éthanol, acétone et eau, était sensiblement plus élevée que celle des extraits obtenus en utilisant différents solvants, à savoir le méthanol, l'éthanol ou l'acétone.

1.2.Teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins hydrolysables)

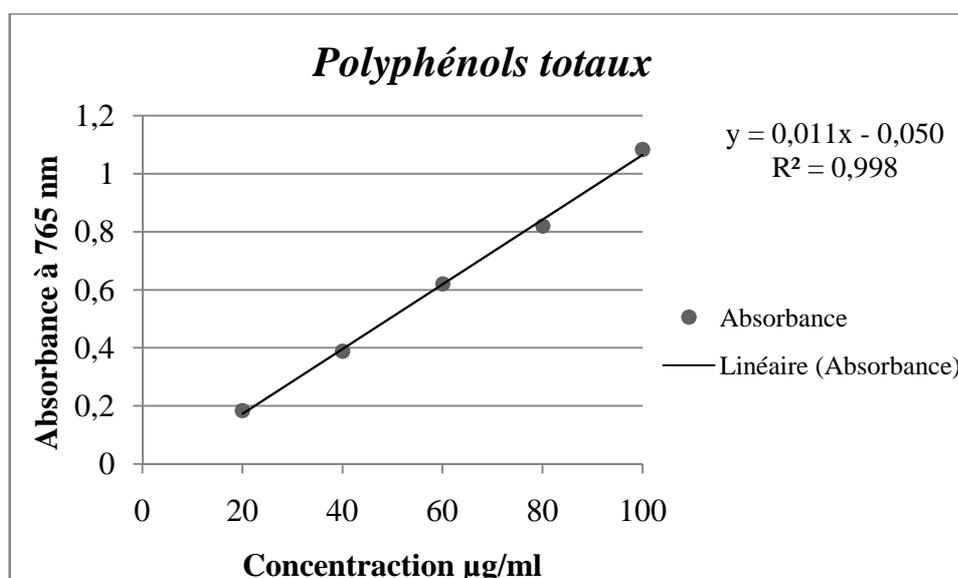


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

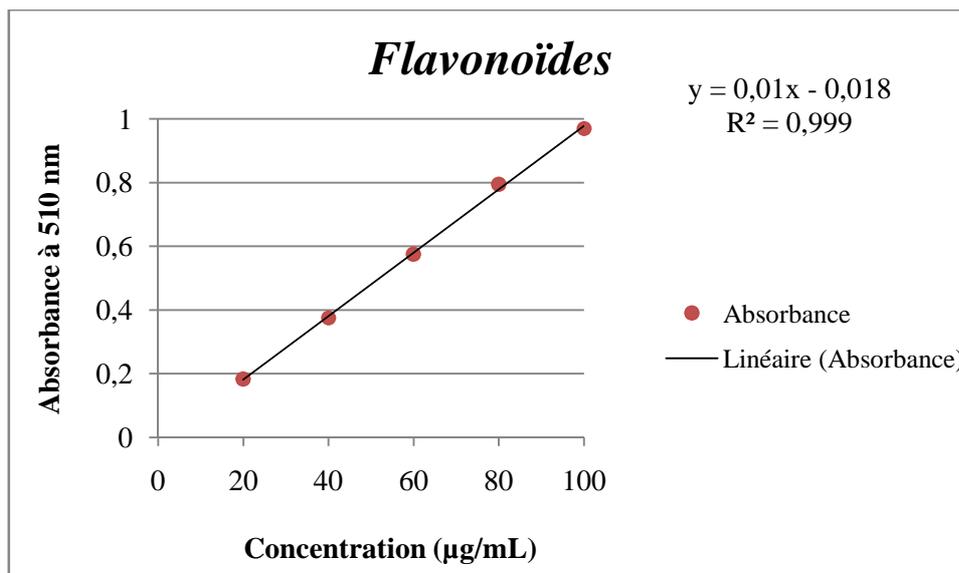


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

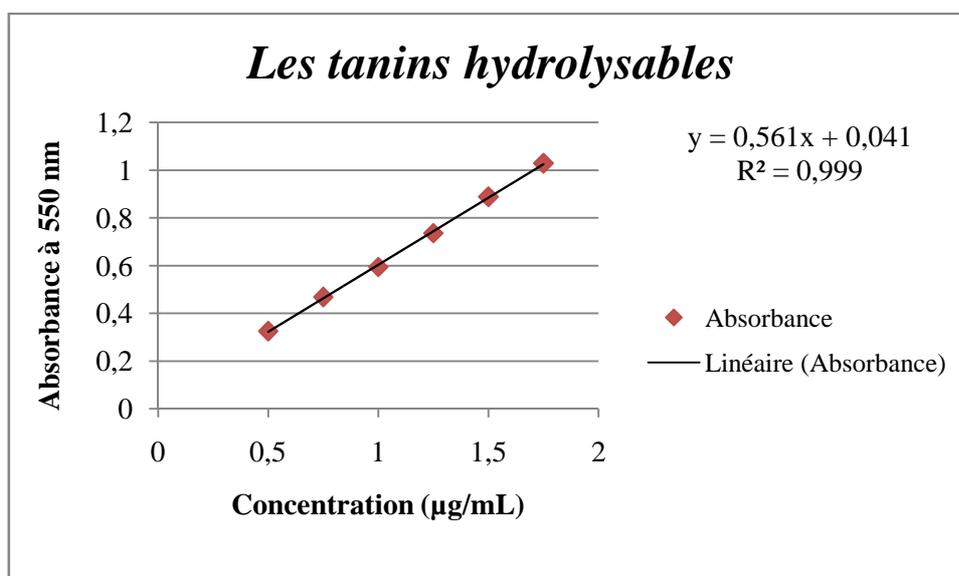


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes peuvent servir comme indicateurs importants de la capacité antioxydante et être utilisés comme une sélection préliminaire pour n'importe quel produit quand il est destiné comme source naturelle des antioxydants dans les aliments fonctionnels (Viuda-Martos et al., 2011).

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible de l'extrait des écorces de fruit de *Punica granatum* étudiées sont consignés dans le tableau 7. Dans cette composition, nous constatons que les écorces sont quantitativement riches en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tanins hydrolysables).

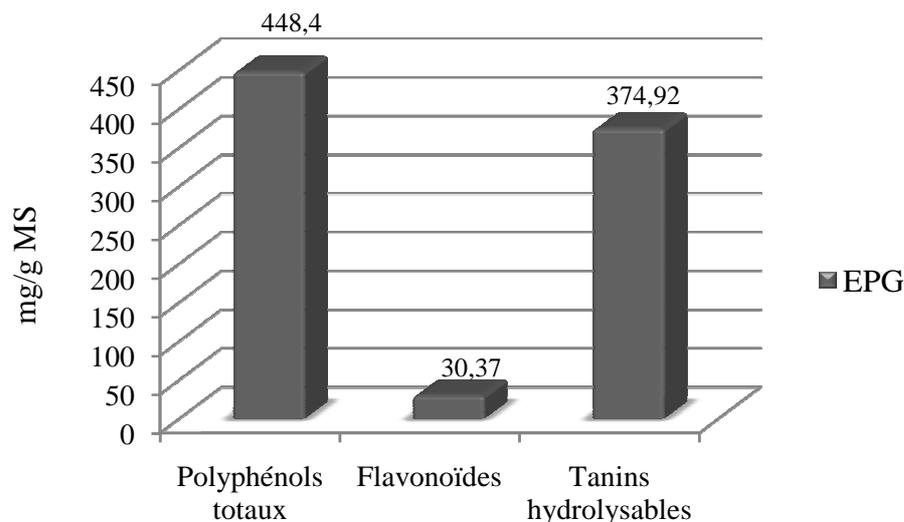


Figure 20 :Composition de l'extrait de peau de grenade en composés phénoliques

Ces résultats nous indiquent que l'extrait de peaux de grenade étudié est majoritairement constitué de polyphénols totaux (448,4 mg/g EAG) et de tanins hydrolysables (374,92 mg/g EAT). Sa composition en flavonoïdes est relativement faible (30,37 mg/g EQ).

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Tehranifar et al. (2011)** qui ont trouvé 423.5 mg/g EAG de polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique de la peau de grenade.

Li et al. (2006) ont rapporté que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présents dans l'extrait d'écorces de grenade. Il a été rapporté que l'extrait de grenade est riche en ellagitannins qui sont des tanins hydrolysables (**Seeram et al., 2005**).

Sudheesh et Vijayalakshmi (1999) ont observé que les flavonoïdes des fruits de *Punica granatum L.* sont efficaces dans la réduction des lipides de sérum et des tissus. Ces mêmes auteurs ont remarqué que les fractions riches en flavonoïdes obtenues à partir de l'extrait des fruits de *Punica granatum*, administrées oralement aux rats à la dose de 10 mg/kg/jours, ont montré un effet antiperoxydatif potentiel. Les concentrations du malondialdéhyde, des hydroperoxydes et des diènes conjugués ont été sensiblement diminuées dans le foie tandis que les activités enzymatiques de la catalase, de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase ont montré une augmentation significative. Les concentrations du glutathion dans les tissus ont augmenté également (**Sudheesh et Vijayalakshmi., 2005**).

Le contenu phénolique et flavonoïde dépend du cultivar, milieu de culture, climat, maturité, pratiques culturales et les conditions de stockage (**Poyrazoglu et al., 2002**). Ces composés sont

connus pour leurs propriétés de piégeage des radicaux libres et pour inhiber l'oxydation des lipides *in vitro* (Noda et al., 2002).

Le groupe de tanins hydrolysables est trouvé dans la peau (la cosse, l'écorce ou le péricarpe), les membranes et les moelles du fruit (Kulkarni et al., 2004). Ce groupe contient les isomères de punicalagine, en plus de l'acide ellagique, l'acide gallagique, et la punicaline, qui est responsable de 92% de l'activité antioxydante du fruit entier (Gil et al., 2000).

Les tanins sont connus pour empêcher la peroxydation des lipides et les lipoxygénases *in vitro*, et l'information a été accumulée au cours de ces dernières années démontrant leur capacité de piéger les radicaux tels que l'hydroxyle, le superoxyde, et le peroxy, qui sont connus pour être importants dans les états pro-oxydants cellulaires (Gyamfi et Aniya, 2002).

Les tanins ne fonctionnent pas seulement en tant qu'antioxydants primaires (c.-à-d., ils donnent un atome d'hydrogène ou des électrons), ils fonctionnent également comme antioxydants secondaires. Les tanins ont la capacité de chélater des ions métalliques tels que Fe(II) et d'interférer une des étapes réactionnelles dans la réaction de Fenton et de retarder de ce fait l'oxydation. L'inhibition de la peroxydation des lipides par des constituants de tanins peut agir par l'intermédiaire de l'inhibition du cyclooxygénase (Amarowicz, 2007).

Les polyphénols polymériques sont des antioxydants plus efficaces que les composés phénoliques monomériques simples : Hagerman et al. (1998) ont démontré que les capacités antioxydantes des tanins condensés et hydrolysables à supprimer les radicaux peroxy sont plus élevées que les celles des phénols simples.

1.3. Activité antioxydante :

Les antioxydants naturels sont considérés comme multifonctionnels et d'intérêt élevé comme solutions alternatives aux antioxydants synthétiques pour prévenir l'oxydation dans les systèmes alimentaires complexes (Wang et al., 2009).

Par définition, l'activité antioxydante est la capacité d'un composé à inhiber la dégradation oxydante, par exemple la peroxydation des lipides (Roginsky et Lissi, 2005).

Leur activité dépend de divers paramètres tels que la multiplicité et l'hétérogénéité de la matrice, les conditions expérimentales et principalement du mécanisme de réaction. Il est connu maintenant que les propriétés antioxydantes des extraits de plantes ne peuvent pas être évaluées par une seule méthode due à la nature complexe des composés phytochimiques. Une analyse

antioxydante complète des extraits de plantes devrait impliquer plusieurs études d'activité (**Gioti et al., 2009**).

1.3.1. Pouvoir de piégeage du radical DPPH :

L'utilisation d'un test *in vitro*, comme le test DPPH, pour évaluer préliminairement les propriétés qui devraient se produire à l'intérieur des systèmes biologiques, est soutenue par les résultats obtenus à partir des études antérieures (**Baratto et al., 2003; Heimler et al., 2006**). Selon ces études, la capacité de piégeage des composés testés contre le radical DPPH suit une tendance qui reflète celle de l'activité antioxydante contre le radical superoxyde (O_2°), le radical hydroxyle (OH°), la capacité inhibitrice contre l'oxydation des lipoprotéines basse densité (LDL) induite chimiquement, ce test peut être utilisé comme système modèle biologiquement approprié (**Romani et al., 2012**).

La comparaison entre les valeurs EC_{50} et l'activité antioxydante exprimées comme la capacité antioxydante équivalente trolox (TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity), le pouvoir réducteur ferrique du plasma (FRAP : ferric reducing ability of plasma) et la capacité d'absorbance du radical oxygène (ORAC : oxygen radical absorbance capacity), prouve que la méthode de DPPH reflète les résultats obtenus avec les différentes approches expérimentales (**Romani et al., 2012**).

Le test de DPPH, qui mesure la capacité des composés à transférer les atomes H labiles aux radicaux, est la méthode la plus commune pour l'évaluation de l'activité antioxydante (**Brand-Williams et al., 1995**).

Le DPPH est un radical libre organique très stable de couleur violette foncée qui donne des maximums d'absorption autour de 515-528 nm. Lors de l'acceptation d'un proton de n'importe quel donneur d'hydrogène, principalement les composés phénoliques, il perd son chromophore et devient jaune.

Comme la concentration en composés phénoliques ou leur degré d'hydroxylation augmente, leur activité de piégeage du radical DPPH augmente également, et ceci peut être définie comme l'activité antioxydante (**Sanchez-Moreno et al., 1999**).

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les différents composés antioxydants

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	EPG	BHT	α -tocophérol	Ac. ascorbique
2	27,16 \pm 0,24	9,37 \pm 0,00	14,73 \pm 0,36	34,87 \pm 0,18
5	44,25 \pm 1,13	18,34 \pm 1,5	35,21 \pm 1,96	85,16 \pm 0,55
10	82,21 \pm 1,36	29,50 \pm 1,57	70,05 \pm 1,28	95,22 \pm 0,06
20	89,01 \pm 0,48	48,69 \pm 0,70	92,79 \pm 0,08	95,27 \pm 0,01
50	90,82 \pm 0,17	74,39 \pm 2,26	93,21 \pm 0,19	95,32 \pm 0,07
100	92,14 \pm 0,08	89,35 \pm 0,62	93,98 \pm 0,25	95,34 \pm 0,02

La figure 21 décrit le pouvoir de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration.

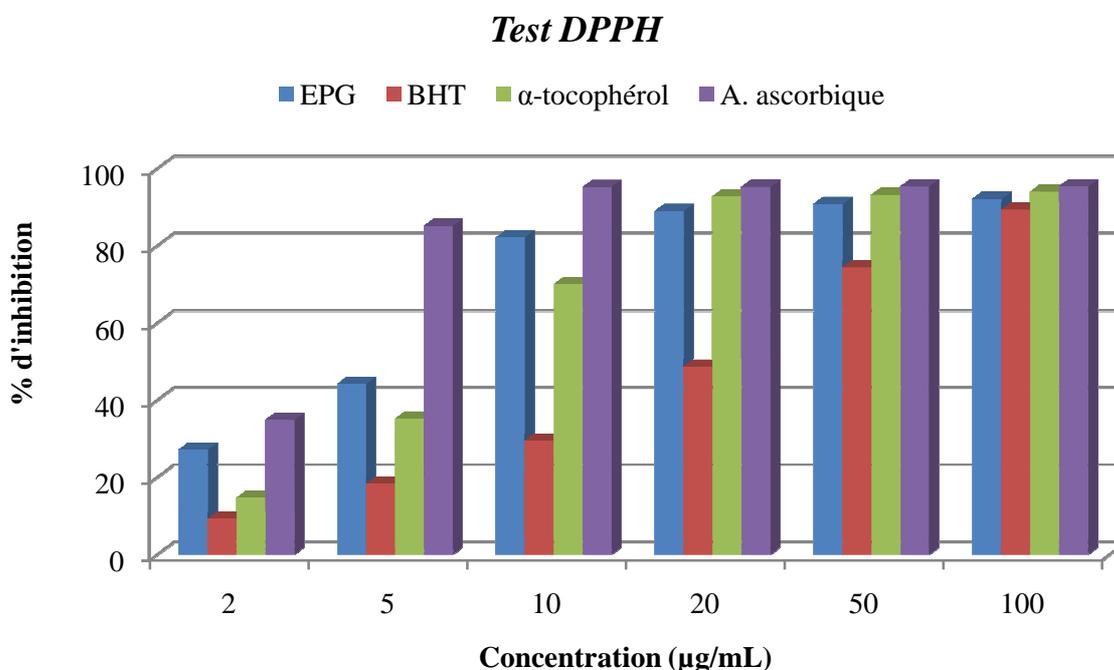


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration

Il ressort de ces résultats que le pouvoir de piégeage du radical DPPH est très significativement dépendant de la concentration ($p < 0,0001$).

L'extrait de peau de grenade montre une augmentation hautement significative du pouvoir de piégeage jusqu'à la concentration 20 $\mu\text{g/mL}$ (89,01%, $P < 0,0001$) puis au-delà une augmentation peu significative (50 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$) ou non significative (100 $\mu\text{g/mL}$, $P > 0,05$) est remarquée.

Negi et Jayaprakasha (2003) ont rapporté une forte augmentation de l'activité de piégeage des radicaux (DPPH) avec l'augmentation de la concentration des extraits de peau de grenade

jusqu'à 25 ppm après cela une légère augmentation de l'activité de piégeage des radicaux a été observée.

L'acide ascorbique montre le pouvoir de piégeage le plus élevé parmi les autres antioxydants, qui même à faible concentration (10 µg/mL), il inhibe complètement le radical stable DPPH (95%).

Contrairement au BHT qui montre le pouvoir de piégeage le plus faible 89,35 % d'inhibition même à 100 µg/mL. Celui-ci suit une tendance logarithmique.

Quant à l'autre antioxydant naturel l' α -tocophérol, celui-ci se caractérise également par un pouvoir de piégeage élevé. Il montre des pourcentages d'inhibition du radical DPPH inférieurs à ceux de l'extrait aux concentrations inférieures à 20 µg/mL. Cependant, il exerce une meilleure activité antioxydante que celle de l'extrait pour les concentrations 20, 50 et 100 ppm, où il montre une augmentation plus importante que celle de l'extrait de la concentration 10 à 20 µg/mL (70 à 93,21% contre 82,21 à 89% pour l'EPG).

Les pourcentages supérieurs à 90 % peuvent être considérés comme une inhibition de l'absorption complète du DPPH, parce qu'après avoir terminé la réaction, la solution finale possède toujours une couleur jaunâtre et, par conséquent, l'inhibition de l'absorption à l'incolore ne peut atteindre à 100 % par rapport à la solution de méthanol. L'absorption résiduelle permanente a comme conséquence jusqu'à 7% d'inhibition d'absorption totale (**Miliauskas et al., 2004**).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Singh, Murthy et Jayaprakasha (2002)** qui ont trouvé qu'à 50 ppm, les polyphénols extraits de la peau de grenade par l'acétate d'éthyle, le méthanol, et l'eau montraient une activité de piégeage de radical libre DPPH de 46, de 81, et de 43%, respectivement.

Dans une autre étude, **Zahin et al. (2010)** ont trouvé qu'à 80 µg/mL, l'extraction séquentielle des polyphénols de peau de grenade a donné des capacités d'inhibition l'absorption de radical DPPH : 90.53%, 86.4% et 83.2% pour les fractions de méthanol, d'acétone et d'éthanol respectivement.

La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans l'extrait de peau de grenade peut expliquer sa forte activité antioxydante. Dans les investigations sur les activités antioxydantes de certains extraits de peau de fruit y compris la grenade et la banane, la peau de grenade a montré l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée (**Okonogi et al., 2007**).

Wang et al. (2011) ont étudié les corrélations entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques, en proanthocyanidines et en flavonoïdes de la peau de grenade et les résultats obtenus indiquent une forte corrélation entre le DPPH et les composés phénoliques totaux ($R^2 = 0.98$), mais aucune corrélation n'a existé avec les proanthocyanidines ($R^2 = 0.01$) et les flavonoïdes ($R^2 = 0.05$).

L'activité antioxydante des extraits de peau de grenade pourrait être attribuée à la présence des polyphénols, comme les tanins ellagiques, l'acide ellagique et l'acide gallique (**Gil et al., 2000**).

Il a été signalé que les composés antioxydants trouvés dans l'extrait de peau de fruit de grenade sont les composés phénoliques : l'acide ellagique et le flavonol aussi bien que la quercétine et le kœmpférol (**Lansky et Newman, 2007**).

Abdel Motaal et Shaker (2011) ont montré une corrélation directe entre la teneur en acide ellagique des extraits de grenade (écorce, pulpe et fruit entier) et ses capacités de piéger les radicaux libres mesurées avec le test DPPH.

Ainsi, ces résultats suggèrent que les antioxydants naturels inhibent mieux le radical DPPH que l'antioxydant synthétique BHT. Ceci est soutenu par les valeurs de l'IC₅₀.

Une valeur plus faible d'IC₅₀ (définie comme la concentration du composé capable d'inhiber 50% de tous les radicaux de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée (**Zhang et al., 2010**).

Les concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents antioxydants sont représentées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : La concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/mL) du radical DPPH

	<i>EPG</i>	<i>BHT</i>	<i>α-Tocophérol</i>	<i>A. ascorbique</i>
<i>IC</i> ₅₀ (µg/mL)	5,49 ± 0,039	28,15 ± 0,767	7,113 ± 0,166	2,903 ± 0,002

L'extrait montre une IC₅₀ (5,49 µg/mL) plus faible que le BHT (28,15 µg/mL) et l'α-Tocophérol (7,113 µg/mL) ce qui signifie un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus élevé. Cependant, son pouvoir de piégeage est inférieur à celui de l'acide ascorbique dû à son IC₅₀ (2,903 µg/mL).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Kanatt et al. (2010)** qui ont trouvé que l'IC₅₀ (de radical DPPH) du BHT était 4 fois plus élevée que celle de l'extrait de la peau de grenade.

Des résultats similaires rapportés par **Okongi et al. (2007)** qui ont trouvé que parmi les huit (8) peaux de fruit étudiées, la peau de grenade a montré le pouvoir de piégeage le plus élevé (IC₅₀ le plus faible).

Kulkarni et al. (2004) rapportent une IC₅₀ de 8,33 µg/ml pour des extraits méthanoliques des écorces de grenade. Cette forte activité antioxydante est liée à la forte concentration en composés phénoliques.

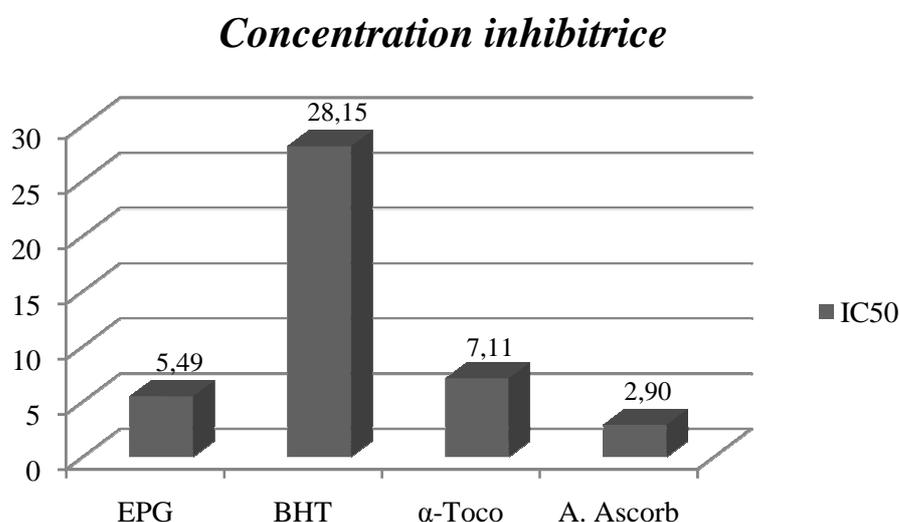


Figure 22 : Concentration inhibitrice IC₅₀ du radical DPPH des différents composés antioxydants

Tous les antioxydants montrent une différence significative ($P \leq 0,05$). L'activité de piégeage du radical DPPH de l'extrait phénolique et des standards suit l'ordre suivant :

Acide ascorbique > EPG > α-Tocophérol >> BHT

Les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH° suggèrent que les composants qui se trouvent dans l'extrait sont capables de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire de mécanismes de donation d'électrons ou d'hydrogène et pourrait donc être en mesure d'empêcher l'initiation des réactions en chaîne des radicaux libres délétères induites dans les matrices sensibles comme les membranes biologiques. Ceci montre également la capacité des extraits à piéger les différents radicaux libres dans les différents systèmes, ce qui indique qu'ils peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux (**Abdelazim et al., 2011**).

Ceci peut être bénéfique dans la conservation des produits alimentaires, des formulations médicamenteuses et des produits cosmétiques, où les réactions en chaîne de radicaux libres ont comme conséquence l'oxydation des lipides et la détérioration ultérieure des produits (**Dastmalchi et al., 2008**).

1.3.2. Le pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Deepa et al., 2009 ; Kanatt et al., 2010 ; Zheng et al., 2011**).

Le pouvoir réducteur Fe^{3+} - Fe^{2+} d'un composé est utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à donner l'électron et il est l'une des caractéristiques principales des composés phénoliques (**Dorman et al., 2003**).

Les résultats du pouvoir réducteur exprimés en absorbances sont indiqués dans le tableau 11 :

Tableau 11 : Pouvoir réducteur des différents antioxydants testés

<i>Concentration</i>	<i>Extrait</i>	<i>BHT</i>	<i>α-tocophérol</i>	<i>Ac. ascorbique</i>
2	0,022 ± 0,003	0,043 ± 0,003	0,01 ± 0,00	0,075 ± 0,004
5	0,084 ± 0,003	0,140 ± 0,005	0,035 ± 0,001	0,213 ± 0,005
10	0,195 ± 0,005	0,252 ± 0,004	0,090 ± 0,002	0,434 ± 0,009
20	0,405 ± 0,005	0,408 ± 0,001	0,199 ± 0,005	0,934 ± 0,012
50	0,98 ± 0,0100	0,877 ± 0,006	0,517 ± 0,002	2,353 ± 0,021
100	1,92 ± 0,001	1,339 ± 0,009	0,997 ± 0,015	3,333 ± 0,006

La figure 23 montre l'évolution du pouvoir réducteur des différents antioxydants en fonction de la concentration. Il est observé que la concentration a un effet hautement significatif sur le pouvoir réducteur ($P < 0,0001$).

Pouvoir réducteur

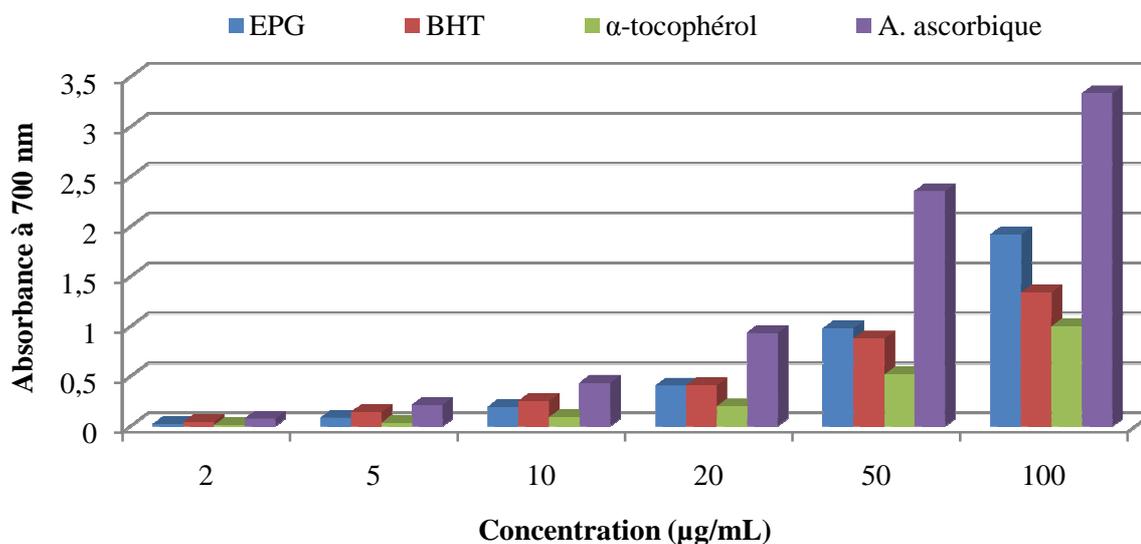


Figure 23 :Evolution de pouvoir réducteur des antioxydants en fonction de la concentration

Tous les composés montrent un certain degré de pouvoir réducteur. Cependant, comme prévu, leur pouvoir réducteur est inférieur à celui de l'acide ascorbique, qui est connu pour être un fort agent réducteur (Zou *et al.*, 2004).

Comme l'activité antioxydante (DPPH), le pouvoir réducteur de l'extrait augmente avec l'augmentation de la quantité de l'extrait ; l'équation de pouvoir réducteur (y) et la quantité de l'extrait (x) est $y = 0.019x$ ($R^2 = 0.999$), indiquant que la capacité réductrice est très corrélée avec la quantité de l'extrait. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Zheng *et al.* (2011) qui ont signalé que le pouvoir réducteur de l'extrait d'écorce de grenade augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration et le coefficient de corrélation (R^2) était 0.9992.

Aux concentrations faibles (2, 5 et 10 µg/mL), le BHT a un pouvoir réducteur plus grand que celui de l'extrait puis à la concentration 20 µg/mL les deux ont le même pouvoir réducteur (0,408 et 0,405 respectivement), mais au-delà de la concentration 50 µg/mL, l'EPG montre un pouvoir réducteur plus important (1,92 contre 1,339 pour le BHT).

Negi et Jayaprakasha (2003) ont rapporté une augmentation significative de pouvoir réducteur de l'extrait de la peau de grenade avec l'augmentation de la concentration de 50 à 400 ppm.

Concernant l' α -Tocophérol, bien que celui-ci présente un pouvoir de piégeage très élevé cependant il a un pouvoir réducteur très faible traduit par des absorbances faibles par rapport aux autres antioxydants.

Les résultats de l' EC_{50} (tableau 12) révèlent qu'un pouvoir réducteur élevé se traduit par un EC_{50} faible.

Tableau 12 : La concentration effective EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) des différents antioxydants

	<i>EPG</i>	<i>BHT</i>	<i>α-Tocophérol</i>	<i>A. ascorbique</i>
<i>EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</i>	25,78 \pm 0,10	26,74 \pm 0,17	49,95 \pm 0,01	11,05 \pm 0,01

L'extrait de peau de grenade et le BHT montrent des EC_{50} faibles (25,78 et 26,74 $\mu\text{g/mL}$ respectivement) par rapport à l' α -tocophérol (49,95 $\mu\text{g/mL}$), mais l' EC_{50} la plus faible est enregistrée pour l'acide ascorbique (11,05 $\mu\text{g/mL}$).

Tous les antioxydants montrent une différence significative ($P \leq 0,05$). Cependant, il n'y a aucune différence distincte entre l'EPG et le BHT. Le pouvoir réducteur de l'extrait et les autres antioxydants suit l'ordre suivant : acide ascorbique > Extrait \approx BHT > α -Tocophérol.

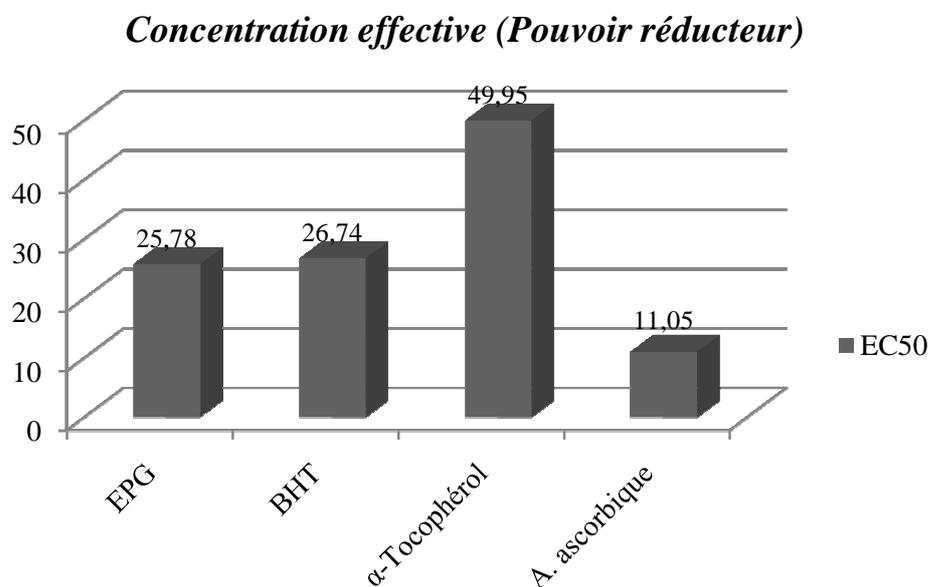


Figure 24 : Concentration effective (EC_{50}) de pouvoir réducteur des différents antioxydants

Duh (1998) a rapporté que les propriétés de réduction sont généralement associées à la présence des réductones.

Les différentes études ont indiqué que l'effet antioxydant est lié au développement des réductones (**Dorman et al., 2003; Shon et al., 2003**). Il a été rapporté que les réductones sont des terminateurs des réactions en chaîne de radicaux libres (**Xiao-Juan Duan et al., 2006**).

Gordon (1990) et **Shimida et al. (1992)** ont rapporté que l'action antioxydante des réductones est basée sur la rupture des chaînes de radicaux libres par donation d'atome d'hydrogène. Il a été rapporté également que les réductones réagissent avec certains précurseurs de peroxydes. Ainsi, ils empêchent la formation de peroxyde.

Les données obtenues par **Jayaprakasha et al. (2003)** indiquent que l'activité antioxydante marquée des extraits de grenade semble être due à la présence des polyphénols qui peuvent agir d'une manière similaire que les réductones par donation des électrons et réaction avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et terminer la chaîne de réaction des radicaux libres.

Les données indiquent que l'activité antioxydante marquée de l'extrait de poudre de l'écorce de grenade semble être le résultat de l'effet conjugué de leur activité de piégeage des radicaux et du pouvoir réducteur (**Naveena et al., 2008 ; Zahin et al., 2010**).

Les composés à pouvoir réducteur indiquent qu'ils sont des donneurs d'électrons et peuvent réduire les intermédiaires oxydés des processus de peroxydation des lipides, de sorte qu'ils puissent agir en tant qu'antioxydants primaires et secondaires (**Chanda et Dave, 2009**).

1.3.3. Peroxydation de l'acide linoléique :

La capacité antioxydante totale est largement utilisée comme un paramètre pour les composants bioactifs des aliments et des médicaments. Cette analyse est définie comme la capacité d'un composé à inhiber la dégradation oxydative comme la peroxydation des lipides (**Roginsky et Lissi, 2005**).

L'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique a été également utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de peau de grenade. Les résultats de l'absorbance de la peroxydation de l'acide linoléique après incubation pendant 96 heures sont représentés dans le tableau 13:

Tableau 13 : Absorbance des produits de la peroxydation de l'acide linoléique

Temps (heures)	Témoin	Extrait	BHT	α -Tocophérol
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
24	0,341 ± 0,010	0,043 ± 0,008	0,018 ± 0,001	0,276 ± 0,023
48	1,31 ± 0,020	0,054 ± 0,009	0,039 ± 0,014	0,491 ± 0,036
72	1,582 ± 0,033	0,055 ± 0,013	0,042 ± 0,012	0,719 ± 0,010
96	1,283 ± 0,020	0,099 ± 0,006	0,050 ± 0,002	0,975 ± 0,006

La figure 25 décrit l'évolution de la peroxydation de l'acide linoléique en fonction du temps.

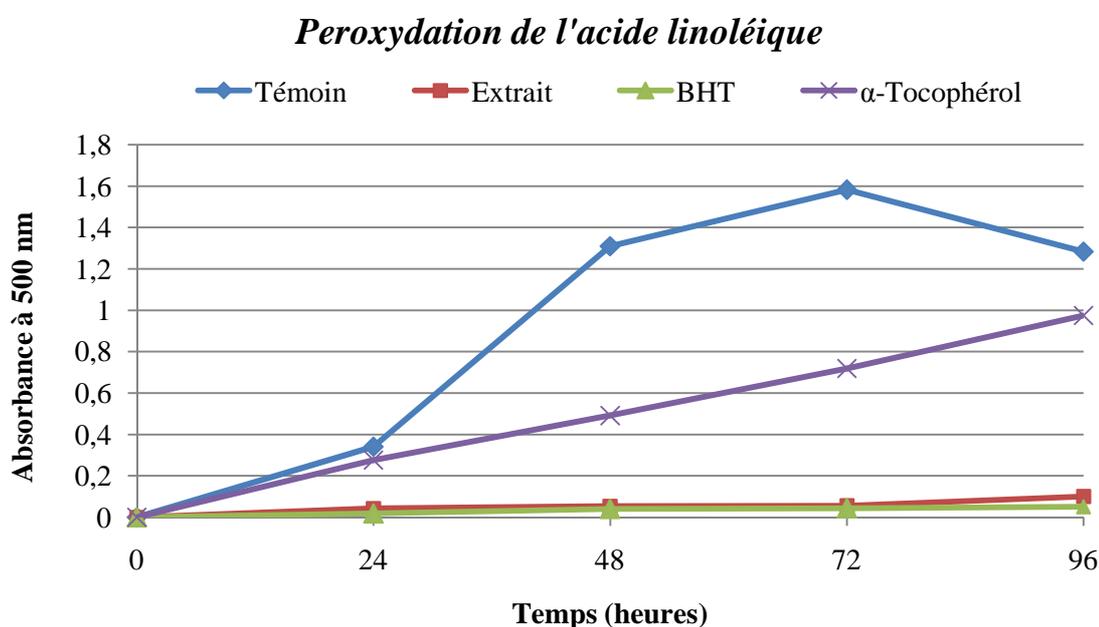


Figure 25 : Evolution de la peroxydation de l'acide linoléique en fonction du temps

L'auto-oxydation de l'acide linoléique dans le témoin est significativement différente ($P \leq 0,05$) et plus importante dès les premières 24 heures de réaction comparativement aux antioxydants. Elle passe par 4 étapes : l'absorbance augmente de 0 à 0,341 puis une augmentation rapide et accentuée est constatée après 48 heures où elle atteint une valeur de 1,31 ; ensuite le taux d'oxydation ralentit pour atteindre une valeur maximale d'absorbance de 1,582 après 72 heures puis elle commence à diminuer jusqu'à 1,283.

La raison de cette diminution est probablement due au fait que les hydroperoxydes de l'acide linoléique, générés par la peroxydation de l'acide linoléique, sont décomposés en nombreux

produits secondaires d'oxydation, ou les produits intermédiaires peuvent être convertis en produits finaux stables et le substrat est épuisé (Chen *et al.*, 1996; Hua-Ming *et al.*, 1996).

L'extrait et le BHT montrent une augmentation insignifiante de l'absorbance du début jusqu'à la fin de l'incubation (0,099 et 0,05 respectivement).

Pour l' α -Tocophérol, l'absorbance augmente linéairement durant toute la période d'incubation pour atteindre une valeur maximale 0,975 d'absorbance après 96 heures.

Tableau 14 :Activité d'inhibition de l'autooxydation de l'acide linoléique

	Absorbance	% d'inhibition
Témoin	1,582 ± 0,033	□
EPG	0,055 ± 0,013	96,52 ± 0,38
BHT	0,042 ± 0,012	97,34 ± 0,11
α-Tocophérol	0,719 ± 0,010	54,55 ± 1,33

L'analyse des résultats du tableau 14 fait apparaitre qu'à une concentration de 500 μ g/mL, l'extrait de peau de grenade et l'antioxydant synthétique BHT montrent une très grande capacité d'inhibition de la formation des peroxydes traduite par un pourcentage d'inhibition très élevé 96,52 et 97,35% respectivement. Tandis que l'antioxydant naturel l' α -tocophérol montre une capacité d'inhibition moyenne (54,55%).

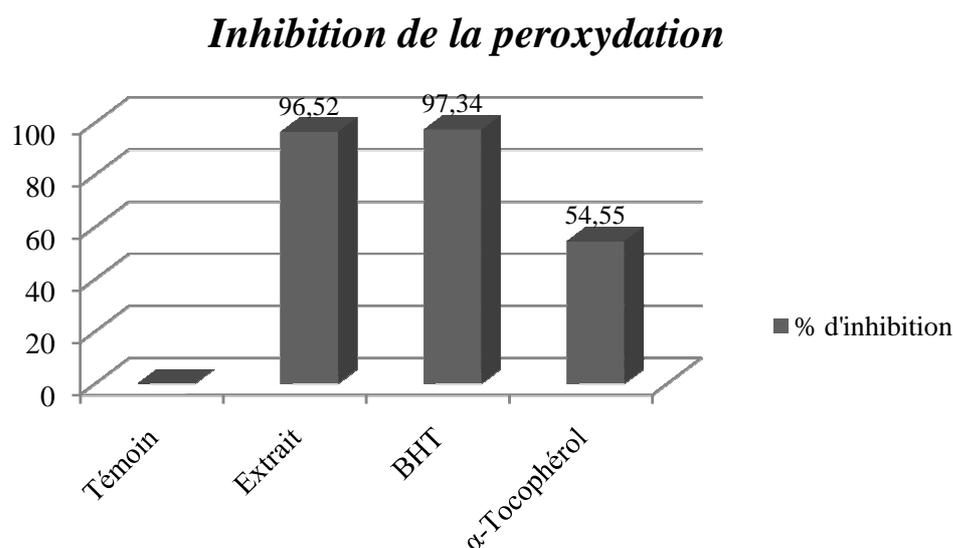


Figure 26 :Activité d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

Sultana et al. (2008) ont rapporté que le pourcentage d'inhibition de peroxydation de l'acide linoléique le plus élevé a été enregistré pour l'extrait de peau de grenade (96.4%), suivi des extraits de pomme (88.2%), de citron (86.9%), et de banane (82.7%).

Iqbal et al. (2008) ont trouvé que l'extrait méthanolique de la peau de grenade inhibe 92.69 % de la peroxydation de l'acide linoléique suivi de l'extrait acétonique 91.04 % et éthanolique 89.23 %. La stabilité thermique a été également étudiée par ces auteurs et ont montré que jusqu'à 30 min de chauffage à 185 °C, la perte en activité était insignifiante.

Après cela, il y avait une forte diminution de l'activité antioxydante de 30 à 50 min, suivi par une baisse relativement faible de taux de détérioration de l'activité antioxydante jusqu'à 80 minutes de chauffage. Après 80 min de chauffage, l'extrait a montré 66.23% d'activité antioxydante (c à d l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique).

Ces mêmes auteurs ont rapporté que ce pourcentage est meilleur que celui du BHA qui a perdu la moitié de son potentiel antioxydant après 45 minutes à 185 °C (**Hamama et Nawar, 1991**) et ont suggéré que les peaux de grenade peuvent être une source viable d'antioxydants naturels, qui est applicable dans les systèmes alimentaires même aux traitements à hautes températures.

Dans une étude visant à évaluer l'activité antioxydante totale de certains aliments par une méthode *in vitro* mettant en jeu la mesure de l'oxydation de l'acide linoléique par fluorométrie, la poudre de peau de grenade a montré l'activité antioxydante la plus forte : à une concentration de 60 ppm, cette poudre réduit la peroxydation lipidique de 65% (**Kelawala et Ananthanarayan, 2004**).

La réduction du niveau de peroxyde indique la capacité de la plante à minimiser les dommages oxydants à quelques tissus vitaux dans le corps (**Aiyegoro et Okoh, 2009**) parce que la peroxydation des lipides dans les systèmes biologiques a été longtemps considérée pour être un phénomène toxicologique qui peut conduire à de diverses conséquences pathologiques.

Les hydroperoxydes lipidiques résultants peuvent affecter la fluidité de membrane et la fonction des protéines des membranes. En outre, les hydroperoxydes lipidiques peuvent subir une réduction d'un-électron et une oxygénation par l'intermédiaire de fer pour former les radicaux peroxydes époxyallyliques qui déclenchent la peroxydation lipidique par l'intermédiaire d'une réaction en chaîne de radicaux libres. Les produits finaux de la peroxydation lipidique sont les aldéhydes réactifs, tels que le 4-hydroxy-nonéanal et le malondialdéhyde, dont beaucoup sont fortement toxiques pour les cellules (**Yu et Yang, 1996**).

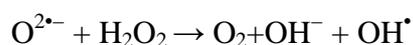
En outre, les aldéhydes réactifs produits par la peroxydation des lipides peuvent attaquer d'autres cibles cellulaires, tels que les protéines et l'ADN ; de ce fait les dommages initiés dans les membranes cellulaires se propagent à d'autres macromolécules, parce que les hydroperoxydes lipidiques formés dans les membranes sont des composants importants de la génération des ERO *in vivo*. Leur détoxification semble être critique pour la survie d'un organisme dans un stress oxydant (**Dargel, 1992**). Par conséquent, les antioxydants jouent un rôle essentiel dans l'inhibition de la peroxydation lipidique ou dans la protection contre les dommages cellulaires par les radicaux libres (**Gülçin, 2010**).

Les principaux polyphénols dans la peau de grenade sont la punicalagine et ses dérivés tels que la punicaline, l'acide gallagique, l'acide ellagique et les glucosides de l'acide ellagique. Les isomères de punicalagine qui sont extraits dans le jus de grenade pendant le traitement ont été signalés comme étant les principaux responsables de la capacité antioxydante élevée du jus de grenade (**Cerda et al., 2003**).

Kulkarni et al. (2007) ont rapporté que la punicalagine est un antioxydant polyphénolique de haut poids moléculaire soluble dans l'eau. Sa remarquable activité antioxydante et les autres activités pharmacologiques ont été attribuées à la présence de 16 groupes hydroxyles (-OH) dissociables.

1.3.4. Chélation du fer :

La production des espèces réactives d'oxygènes (ERO) fortement réactives tels que les radicaux de l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et les radicaux hydroxyles est également catalysée par le fer libre par la réaction de Haber-Weiss :



La propriété de chélation des métaux est particulièrement importante en raison de la capacité des ions de métaux de transition comme Fe^{2+} de catalyser un certain nombre de réactions produisant des radicaux librestelle que la réaction de Fenton. Les radicaux hydroxyles produits comme résultat de cette réaction peuvent accélérer la peroxydation lipidique et les dommages des membranes cellulaires (**Miller, 1996**) en accélérant la dissociation des hydroperoxydes lipidiques en radicaux peroxydes et alcoxydes respectifs (**Gioti et al., 2009**).



Puisque, la quantité d'agents chélateurs dans les extraits est importante pour la réduction des métaux de transition libres qui donnent lieu à la peroxydation catalytique des lipides. Ainsi, la capacité des extraits de se lier avec Fe^{2+} en présence de la ferrozine a été comparée à celle de l'EDTA, qui est un fort agent chélateur (**Rainha et al., 2011**).

Les polyphénols sont des chélateurs des métaux et peuvent inhiber les réactions de Fenton et Haber-Weiss, qui génèrent les radicaux hydroxyles (**Kanatt et al., 2010**).

Les résultats de l'inhibition du fer en présence de la ferrozine sont indiqués dans le tableau 15

Tableau 15 :Pourcentages de chélation du fer Fe^{2+} en présence de la ferrozine

<i>Concentration ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>EPG</i>	<i>EDTA</i>
<i>100</i>	32,29 \pm 0,23	80,32 \pm 0,53
<i>200</i>	47,96 \pm 0,18	94,07 \pm 0,32
<i>500</i>	59,81 \pm 0,23	99,27 \pm 0,00
<i>1000</i>	64,67 \pm 0,18	99,36 \pm 0,00

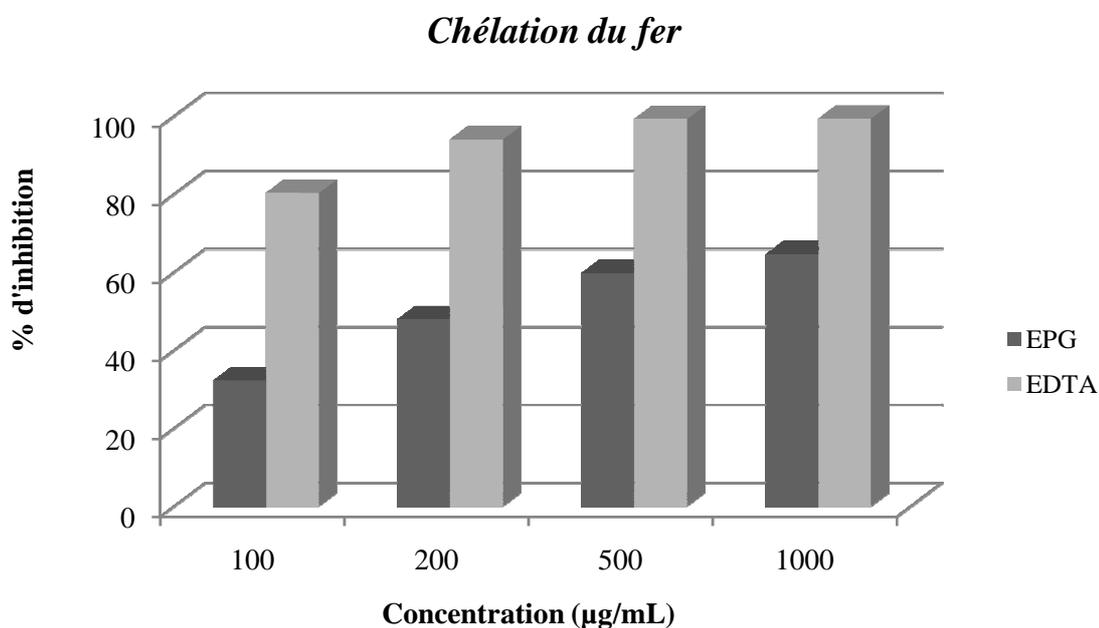


Figure 27 :Pourcentage d'inhibition du Fe^{2+} en présence de la ferrozine en fonction de la concentration

Comme représenté dans la figure 27, la capacité de chélation de fer de l'extrait exprimée en % d'inhibition est significativement dépendante de la concentration ($P \leq 0,05$). Elle est relativement faible par rapport à celle de l'EDTA, cette capacité varie entre 32,29% (100 $\mu\text{g/mL}$) et 64,67% (1000 $\mu\text{g/mL}$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Orak et al. (2012)** qui ont trouvé que la capacité de chélation de fer de la peau de grenade des génotypes étudiés variait entre 10,90 % et 68,55%.

Bien que l'activité de chélation de l'extrait a été montrée à être plus faible que celle de l'EDTA, les résultats obtenus ne sont pas négligeables pour un produit naturel, puisque des travaux de différents auteurs ont signalé des plantes avec des propriétés de chélation à des concentrations beaucoup plus élevées.

Kanatt et al. (2010) ont trouvé que la capacité de chélation de fer de l'extrait aqueux de peau de grenade était 45.5% à une concentration de 1000 $\mu\text{g/mL}$ et l'ont considéré comme relativement élevé.

Sun et al. (2009) ont constaté que les extraits de polyphénols des tissus de peau et de pulpe de fruit ont montré une capacité de chélation des métaux et ils l'ont attribuée au groupe catéchol dans le noyau B de ces molécules de polyphénols.

La chélation des métaux de transition est de grand intérêt potentiel pour l'industrie alimentaire (**Viuda-Martos, Fernández-López, et al., 2010; Viuda-Martos, Ruiz Navajas, et al., 2011**).

Il a été rapporté que les agents de chélation sont efficaces en tant qu'antioxydants secondaires parce qu'ils réduisent le potentiel redox stabilisant de ce fait la forme oxydée de l'ion métallique (**Gülçin, 2006**).

D'une compilation des données biochimiques, animales et humaines, des relations entre les niveaux élevés du fer dans le corps et un risque augmenté d'une variété des maladies telles que les maladies vasculaires, le cancer et certaines conditions neurologiques ont été proposées. La formation des ERO catalysée par le fer menant aux dommages d'ADN et des lipides semble être le résultat d'une exagération de la fonction normale du fer, qui doit transporter l'oxygène aux tissus. Les dommages des radicaux libres à l'ADN induits par le fer semblent être importants pour le développement du cancer et des cellules cancéreuses sont connues pour se développer rapidement en réponse au fer (**Gülçin et al., 2010**).

Plusieurs études (**Singh et al. (2002)** ; **Negi et al. (2003)** ; **Skerget et al. (2005)**) ont signalé que l'activité antioxydante de la peau de grenade est corrélée avec les composés phénoliques totaux.

Par conséquent, le rendement total en composés phénoliques devrait être l'un des indicateurs les plus importants d'un procédé d'extraction efficace pour produire un produit de haute qualité (**Wang et al.,2011**).

II. Etude de la stabilité oxydative des huiles végétales

Après une évaluation préliminaire de l'efficacité antioxydante de l'extrait de peau de grenade, son efficacité dans la stabilisation de deux huiles végétales à savoir l'huile de tournesol et l'huile de soja a été également examinée.

L'importance de l'altération oxydative des huiles de tournesol et de soja stabilisées a été suivie par la mesure des diènes conjugués, l'indice de peroxyde (produits primaires d'oxydation) et l'indice de *p*-Anisidine (produits secondaires).

2.1. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est le nombre de micromoles d'oxygène actif contenues dans un gramme de corps gras susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Ce critère permet d'apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative (Karleskind, 1992).

Les valeurs de l'indice de peroxyde des huiles de tournesol et de soja sont indiquées dans les tableaux 16 et 17.

▪ Huile de tournesol

Tableau 16 : Indices de peroxydes (méqO₂/kg) de l'huile de Tournesol au cours de stockage à 63°C pendant 20 jours

Echantillons	Indice de peroxyde (méqO ₂ /kg)					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	1,9 ± 0,00	41,5 ± 0,00	77,0 ± 1,41	100,0 ± 0,71	276,24 ± 1,77	251,99 ± 0,71
HT-BHT	1,9 ± 0,00	37,0 ± 0,71	75,5 ± 0,00	81,5 ± 0,00	164,25 ± 1,06	207,49 ± 1,41
HT-250	1,9 ± 0,00	33,5 ± 0,00	75,0 ± 1,41	81,5 ± 1,41	166,0 ± 0,71	216,99 ± 0,71
HT-500	1,9 ± 0,00	29,75 ± 1,06	61,0 ± 1,41	64,75 ± 0,35	130,5 ± 0,00	172,50 ± 1,41
HT-1000	1,9 ± 0,00	23,5 ± 0,00	45,5 ± 0,71	51,0 ± 0,71	118,0 ± 0,71	148,75 ± 1,77

L'examen des résultats relatifs à l'évolution de l'indice de peroxyde au cours du stockage a permis de montrer une augmentation continue et significative ($p < 0,05$) de l'IP avec l'augmentation de la période de stockage pour tous les échantillons d'huile de tournesol (figure 28). Cette

augmentation de l'IP est attribuée à la formation des hydroperoxydes, produits primaires d'oxydation.

Des valeurs faibles de l'indice de peroxyde obtenues pour les huiles additionnées d'extraits antioxydants comparées aux témoins indiquent leur efficacité dans la prévention de l'oxydation des huiles (Sultana *et al.*, 2008).

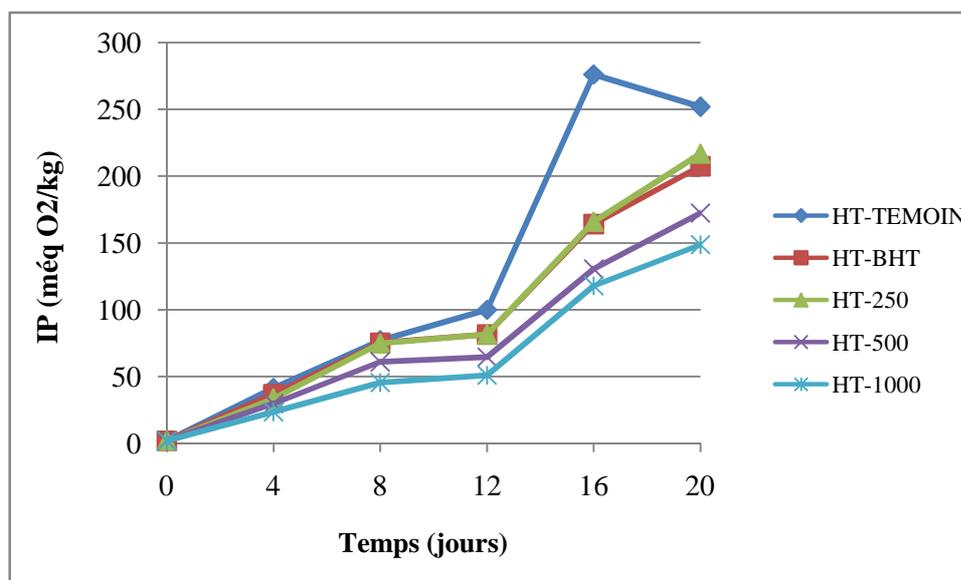


Figure 28: Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

L'indice de peroxyde du témoin augmente linéairement où il passe d'une valeur initiale de 1,9 à 100 mégO₂/kg durant les 12 premiers jours d'étuvage puis son augmentation s'accélère rapidement pour atteindre une valeur maximale de 276,24 mégO₂/kg au 16^{ème} jour. Cependant, la vitesse de formation des peroxydes commence à diminuer durant les 4 derniers jours jusqu'à 251,99 mégO₂/kg.

Ceci est expliqué par le fait que le taux de formation d'hydroperoxydes est supérieur à leur taux de décomposition pendant l'étape initiale de l'oxydation, et ceci devient réversible aux étapes postérieures (Ruiz *et al.*, 2001). L'IP atteindra un maximum durant la phase de propagation, puis diminuera lors de la phase de terminaison pour laquelle la cinétique de décomposition des hydroperoxydes est plus importante que celle de leur formation (Laguerre *et al.*, 2007a).

L'addition de l'extrait à 250 ppm et le BHT à 200 ppm a donné presque le même effet antioxydant montrant une réduction de l'IP de 40,54 et 39,91 % par rapport au témoin.

Il ressort également de ces résultats que l'ajout de l'extrait à 500 et 1000 ppm donnent les valeurs de l'indice de peroxyde les plus faibles comparés au témoin et à l'antioxydant synthétique à 200 ppm tout au long de la durée de stockage. L'ajout de l'EP à ces concentrations a réduit la formation des hydroperoxydes de 52,76 et 57,28 % respectivement.

L'indice de peroxyde des échantillons avec 250, 500, 1000 ppm de l'extrait et 200 ppm de BHT à la fin de stockage est : 216,99 ;172,5 ;148,75 et 207,49 méqO₂/kg respectivement.

Une différence significative (P < 0.05) dans l'IP entre le témoin (sans antioxydant) et les échantillons d'huile de tournesol contenant les extraits et le BHT (antioxydants) est observée.

Cependant, il n'y a aucune différence significative entre l'antioxydant synthétique le BHT à 200 ppm et l'extrait de la peau de grenade à 250 ppm dans l'inhibition de la peroxydation d'huile de tournesol (P > 0,05).

Le pouvoir antioxydant des différents additifs ajoutés à l'huile de tournesol varie selon l'ordre significatif suivant : 1000 ppm EP > 500 ppm EP > 200 ppm BHT ≈ 250 ppm EP

▪ **Huile de soja**

Tableau 17 :Indices de peroxydes (méqO₂/kg) de l'huile de Soja au cours de stockage à 63°C pendant 20 jours

Echantillons	<i>Indice de peroxyde (méqO₂/kg)</i>					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	1,3 ± 0,00	62,5 ± 1,41	98,0 ± 0,71	163,5 ± 1,41	203,49 ± 1,41	290,99 ± 2,12
HT-BHT	1,3 ± 0,00	22,0 ± 0,71	47,0 ± 0,71	57,5 ± 0,00	83,25 ± 1,06	94,75 ± 1,77
HT-250	1,3 ± 0,00	51,0 ± 0,71	72,5 ± 0,00	106,75 ± 1,06	148,0 ± 0,71	173,25 ± 0,35
HT-500	1,3 ± 0,00	38,25 ± 1,06	57,5 ± 1,41	77,75 ± 1,77	124,25 ± 1,06	143,0 ± 0,71
HT-1000	1,3 ± 0,00	21,0 ± 0,71	45,0 ± 0,71	60,5 ± 0,00	84,5 ± 0,00	110,75 ± 1,06

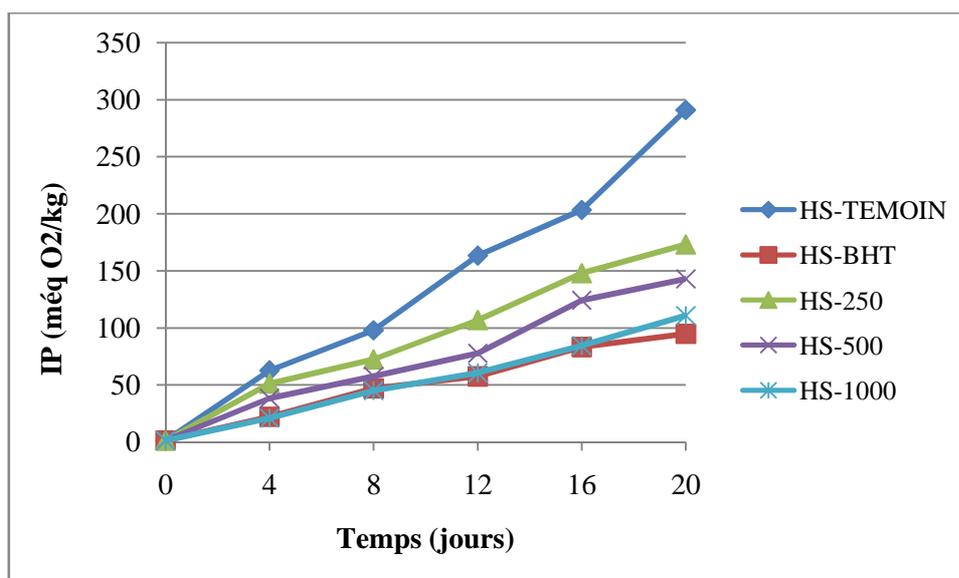


Figure 29 : Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

La figure 29 montre une augmentation continue et significative ($P < 0.05$) de l'IP de l'huile de soja en fonction du temps pour tous les échantillons, ceci explique l'influence significative de la durée de stockage sur les résultats.

L'huile de soja témoin présente l'indice de peroxyde le plus élevé. Son IP initial est de 1.3 méqO₂/kg, il augmente jusqu'à 203,49 méqO₂/kg durant les 16 jours, puis une augmentation rapide et accentuée est constatée à la fin d'étuvage où il atteint 291 méqO₂/kg.

L'indice de peroxyde de HS à 250 ppm est plus élevé que celui des autres échantillons stabilisés, bien qu'il soit sensiblement inférieur au témoin pendant toutes les étapes de la période de stockage. Son IP final 173,25 méqO₂/kg correspond à une réduction de 40,46% par rapport au témoin.

L'HS à 500 ppm suit presque le même rythme mais avec des valeurs moins élevées pour atteindre une valeur finale de l'IP de 143 méqO₂/kg soit une réduction de l'IP de 50,86% par rapport au témoin.

Les huiles additionnées de l'extrait à 1000 ppm et du BHT à 200 ppm montrent les IP les plus faibles qui se superposent durant 16 jours. Cependant, à la fin de stockage l'indice de peroxyde de HS-1000 ppm devient relativement plus élevé que celui de BHT. Leurs IP finaux sont de 110,75 et 94,75 méq O₂/kg respectivement, correspondant à un taux de réduction de formation des hydroperoxydes de 61,94 et 67,7%.

Une différence significative ($P < 0.05$) est observée dans l'indice de peroxyde entre le témoin et l'huile de soja contenant l'extrait et le BHT. Cependant, il n'y a aucune différence significative entre l'antioxydant synthétique le BHT à 200 ppm et l'extrait de la peau de grenade à 1000 ppm ($P > 0,05$).

Le pouvoir antioxydant des différents additifs ajoutés à l'huile de soja varie selon l'ordre significatif suivant: BHT 200 ppm \approx EP 1000 ppm >EP 500 ppm >EP 250 ppm.

Min et Boff (2002) ont cité que **Smagula et Chang (1978)** signalaient que le développement de la saveur de retour, décrit comme «de haricots» et «herbeux» est un défaut unique à l'huile de soja et peut être formé dans l'huile de soja avec des valeurs basses de l'indice de peroxyde.

Les antioxydants sont principalement utilisés dans les lipides afin de retarder l'accumulation des produits primaires d'oxydation et d'améliorer ainsi la stabilité oxydative. Les produits de base de la peroxydation lipidique sont des hydroperoxydes, qui sont désignés généralement sous le nom des peroxydes. Par conséquent les résultats de l'évaluation de l'IP donnent une indication claire de l'auto-oxydation de lipides. Pour davantage de confirmation de ces résultats, d'autres paramètres d'oxydation, tels que les diènes conjugués et l'indice de *p*-anisidine sont également mesurés (**Mohdaly et al., 2010**).

2.2. Indice de *p*-Anisidine :

L'indice de *p*-anisidine (*p*-An) est intensivement utilisé pour mesurer les produits secondaires d'oxydation, principalement carbonyliques non-volatiles, formés pendant la dégradation oxydative des lipides (**Anwar et al., 2004**).

Il est défini comme 100 fois la densité optique mesurée à 350 nm dans une cellule (de 1,0 cm d'épaisseur) d'une solution contenant 1,0 g d'huile dans 100 mL d'un mélange de solvants et de réactifs (conformément à une méthode spécifique) (**UICPA, 1987 ; Pharmeuropée européenne, 2005**). Il permet d'apprécier l'état de rancissement des corps gras.

Les indices de *p*-anisidine des échantillons d'huiles de tournesol et de soja au cours de stockage sous conditions accélérées sont indiqués dans les tableaux 18 et 19.

Tableau 18 : Indices de *p*-Anisidine de l'huile de tournesol au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours

Echantillons	Indice de <i>p</i> -Anisidine					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	3,0 ± 0,05	4,05 ± 0,01	5,82 ± 0,13	9,71 ± 0,14	19,65 ± 0,15	34,44 ± 0,01
HT-BHT	3,0 ± 0,05	3,84 ± 0,04	5,09 ± 0,10	8,84 ± 0,01	14,00 ± 0,31	23,67 ± 0,10
HT-250	3,0 ± 0,05	3,37 ± 0,09	5,04 ± 0,07	8,86 ± 0,15	14,41 ± 0,10	24,08 ± 0,08
HT-500	3,0 ± 0,05	3,23 ± 0,01	4,3 ± 0,14	7,29 ± 0,12	11,0 ± 0,11	18,75 ± 0,40
HT-1000	3,0 ± 0,05	3,03 ± 0,00	3,69 ± 0,43	6,19 ± 0,15	9,04 ± 0,18	15,71 ± 0,09

La figure 30 décrit l'évolution de l'indice de para-anisidine pour les échantillons d'huile de tournesol stabilisés avec l'extrait, le BHT et le témoin.

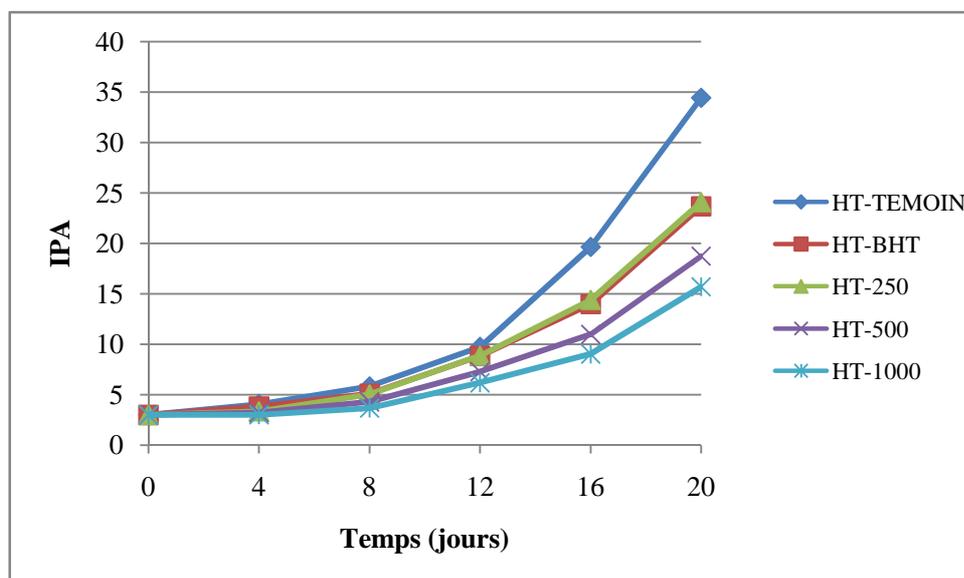


Figure 30: Evolution de l'indice de *p*-Anisidine de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

L'analyse périodique des échantillons d'huile de tournesol avec et sans extraits antioxydants en fonction du temps d'incubation indique que dans l'échantillon témoin, la formation des carbonyles est significativement ($P \leq 0.05$) plus élevée par rapport aux échantillons avec extraits ajoutés.

L'indice de *p*-anisidine augmente significativement tout au long de la durée d'incubation ($P < 0.05$), qui augmente dans l'accélération après 16 jours de stockage. La teneur en *p*-anisidine du témoin atteint un maximum de 34,44 après 20 jours de stockage. Une augmentation assez importante soit 10 fois plus environ son IPA initial est atteinte à la fin d'étuvage à 63°C.

Les indices de *p*-anisidine des échantillons 250 ppm d'extrait phénolique et 200 ppm de BHT se superposent presque tout au long de stockage, et ayant des IPA quasiment similaires. L'addition de ces antioxydants a permis de réduire le taux de formation des carbonyles de 31% par rapport au témoin.

Les huiles additionnées de 500 et 1000 ppm de l'extrait phénolique montrent des indices très proches aux étapes initiales d'oxydation mais au fur et à mesure que l'oxydation s'accélère vers le rancissement, l'IPA de HT-500 devient plus important, il atteint 18,75 soit une réduction de 45,56%.

L'échantillon additionné de 1000 ppm donne l'IPA le plus faible 15,71 à la fin de l'étuvage. Il réduit la formation des carbonyles jusqu'à 54,38%. Cette concentration donne la meilleure stabilité pour l'huile de tournesol aussi bien contre l'oxydation que contre le rancissement.

Tous les échantillons présentent une différence significative ($p < 0,05$), à l'exception de l'huile de tournesol avec 200 ppm de BHT et celle avec 250 ppm de l'extrait ($p > 0,05$), ce qui signifie qu'ils ont le même effet antioxydant. La capacité d'inhibition de l'oxydation secondaire suit l'ordre significatif suivant : 1000 ppm EP > 500 ppm EP > 200 ppm BHT \approx 250 ppm EP.

Cette différence dans l'activité antioxydante peut être expliquée sur la base des structures chimiques. La stabilité des radicaux phénoxyls réduit le taux de propagation et d'autres réactions et augmente ainsi la stabilité oxydante des lipides (**Gordon, 1990 ; Ying et al., 2010**).

Comme tendance générale, la stabilisation améliorée du radical phénoxy est souhaitable, mais la nature lipophile des molécules et l'affinité de l'antioxydant pour les lipides pourraient être déterminants (**Von Gadow et al., 1997**).

▪ Huile de Soja

Tableau 19 :Indice de *p*-Anisidine de l'huile de soja au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours

Echantillons	Indice de <i>p</i> -Anisidine					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	4,88 ± 0,11	9,93 ± 0,07	21,43 ± 0,06	34,4 ± 0,17	38,88 ± 1,47	45,01 ± 0,14
HT-BHT	4,88 ± 0,11	5,14 ± 0,04	8,43 ± 0,17	13,57 ± 0,67	15,76 ± 0,14	22,92 ± 0,09
HT-250	4,88 ± 0,11	8,70 ± 0,11	15,56 ± 0,16	26,95 ± 0,68	32,71 ± 0,41	37,83 ± 0,13
HT-500	4,88 ± 0,11	6,83 ± 0,09	10,52 ± 0,06	17,35 ± 0,26	25,23 ± 0,42	33,07 ± 0,17
HT-1000	4,88 ± 0,11	5,18 ± 0,03	8,59 ± 0,06	13,81 ± 0,33	17,56 ± 0,19	24,60 ± 0,14

L'effet de l'extrait de la peau de grenade sur l'oxydation d'huile de soja mesurée par l'indice de *p*-anisidine est montré dans la figure 31.

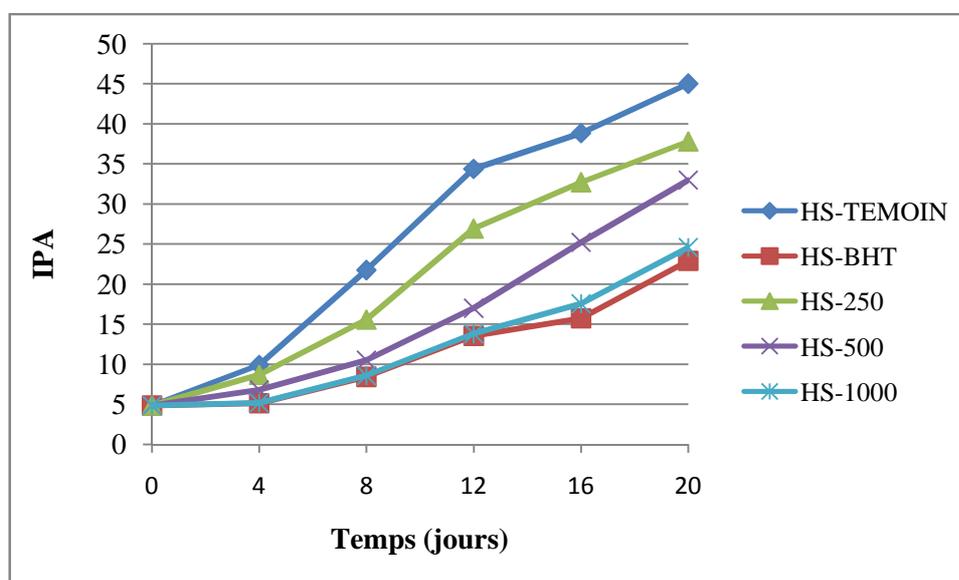


Figure 31:Evolution de l'indice de *p*-Anisidine de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

Le témoin donne des IPA les plus élevées, qui évoluent lentement durant les 4 premiers jours (4,91 à 9,93) puis il augmente rapidement jusqu'à 34,4 après 12 jours d'étuvage, ensuite le taux de formation des produits secondaires ralentit jusqu'à atteindre une valeur de 45,01 après 20 jours.

L'huile de soja contenant 250 ppm montre un IPA proche de celui de témoin (8,7 et 9,93 respectivement) après 4 jours d'étuvage, ensuite elle suit la même tendance de témoin après 8 jours mais avec des valeurs moins élevées pour atteindre une valeur finale de 37,83, soit une réduction de 23,57%.

Concernant le HS-500, son IPA augmente lentement durant les 8 premiers jours mais au-delà, une augmentation rapide et accentuée est constatée à la fin d'étuvage avec un IPA de 33.

Pour HS-1000 et HS-BHT, l'IPA montre une stabilité pendant les 4 premiers jours de stockage où il passe de 4,88 à 5,18 et 5,14 respectivement suivi d'une augmentation jusqu'à la fin de la période de stockage mais cette augmentation après les 12 jours est plus importante pour l'extrait à 1000 ppm. Les IPA finaux de HS-1000 et HS-BHT sont 24,6 et 22,9, ils induisent des réductions de 45,35% et 49,08% respectivement.

Tous les échantillons montrent une différence significative ($P \leq 0,05$). La capacité d'inhibition de la formation des composés carbonyles suit l'ordre suivant : BHT 200 > ppm EP 1000 ppm > EP 500 ppm > EP 250 ppm.

2.3. Les diènes conjugués :

En chimie organique, le terme diène conjugué (DC) se réfère à deux doubles liaisons séparées par une liaison simple. Cette structure est inhabituelle d'AGPI, comme ils ont une structure divinylméthane (c'est-à-dire, elles sont non-conjuguées). Par conséquent, Il est généralement admis que la présence du DC (c.-à-d., migration de la double liaison menant à la conjugaison) dans les lipides indique que l'auto-oxydation des portions des acides gras a eu lieu (**Corongiu et Banni, 1994**).

La structure divinylméthane des AGPI les rend vulnérables à l'abstraction de l'hydrogène par l'attaque des radicaux libres. Les acides gras polyinsaturés deviennent un intermédiaire de radicaux libres, qui réorganise alors la double liaison pour former un DC ou un polyène (**Pegg, 2005**).

L'attaque par l'oxygène moléculaire a comme conséquence un radical peroxy qui peut soustraire un atome d'hydrogène d'une molécule lipidique adjacente pour former un hydroperoxyde lipidique ou endoperoxyde (figure 32) (**Pegg, 2005**).

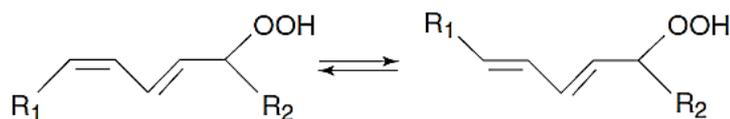


Figure 32 : Un hydroperoxyde d'acide gras polyinsaturé avec un diène conjugué ; R1 et R2 indiquent les parties alkyls restantes de l'AGPI

Les résultats de la formation des diènes conjugués des huiles de tournesol et de soja sont mentionnés dans les tableaux 20 et 21.

Tableau 20 : Coefficients d'extinction (E_{232}) de l'huile de tournesol au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours

Temps (jrs)	E_{232}					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	5,64 ± 0,09	15,66 ± 0,09	17,45 ± 0,07	27,24 ± 0,09	35,61 ± 0,41	45,41 ± 0,65
HT-BHT	5,64 ± 0,09	11,63 ± 0,14	13,49 ± 0,05	19,90 ± 0,21	26,88 ± 0,18	33,00 ± 0,21
HT-250	5,64 ± 0,09	10,13 ± 0,04	13,95 ± 0,18	20,63 ± 0,07	28,19 ± 0,16	35,06 ± 0,48
HT-500	5,64 ± 0,09	6,93 ± 0,18	11,19 ± 0,12	14,93 ± 0,21	21,23 ± 0,14	26,54 ± 0,34
HT-1000	5,64 ± 0,09	6,18 ± 0,14	9,60 ± 0,04	10,64 ± 0,16	16,75 ± 0,11	22,04 ± 0,02

Les teneurs en diènes conjugués (CD) des échantillons d'huile de tournesol et soja stabilisés avec l'extrait méthanolique de peau de grenade, du BHT et du témoin sont montrées sur les figures 33 et 34.

L'absorption à 232 nm due à la formation des composés primaires (figure 33), a montré un modèle qui est en bon accord avec celui de l'indice de peroxyde et de l'indice de *p*-anisidine.

Les DC de tous les échantillons stabilisés sont inférieurs à l'échantillon témoin; indiquant que les extraits ont eu une bonne activité antioxydante (Liu et White, 1992).

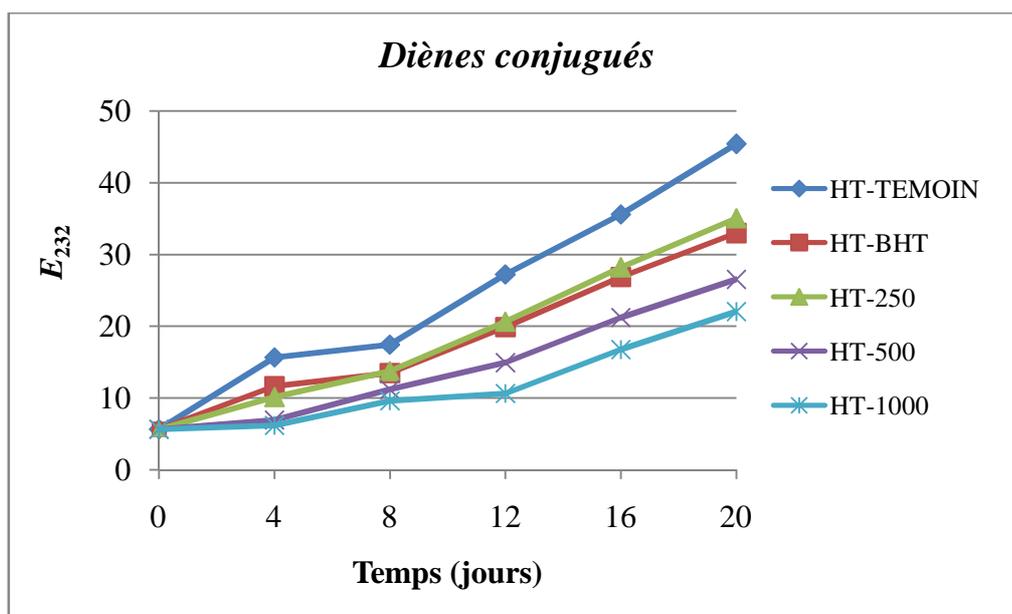


Figure 33 : Evolution de la teneur en diènes conjugués de l'huile de tournesol au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

Pour le témoin, la teneur en DC passe de 5,64 à 15,66 durant les 4 premiers jours d'étuvage puis elle se stabilise légèrement à 17,45 ensuite elle augmente intensivement jusqu'à la fin de la période d'incubation pour atteindre une valeur de 45,41; L'huile de tournesol subit donc une augmentation de 8 fois son E_{232} initial.

Les teneurs en DC de HT-250 sont plus élevées que celles des autres échantillons stabilisés, elles sont légèrement supérieures à celles du BHT-200 mais malgré cela, ces 2 échantillons ne montrent aucune différence significative, elles montrent une réduction de 22,11 et 27,33% respectivement.

L'huile stabilisée avec 1000 ppm montre plus ou moins une stabilité durant les 12 premiers jours où la teneur en DC varie entre 5,64 et 10,64 puis une augmentation plus ou moins importante durant les 8 derniers jours. Cette huile a montré une très bonne stabilité car la teneur en DC est réduite de 50,78% à la fin de stockage par rapport au témoin. L'HT-500 montre une stabilité pendant les 4 premiers après il augmente linéairement, sa teneur en DC atteint 26,54 ; soit une réduction de 41,55%.

▪ Huile de soja

Tableau 21 :Coefficients d'extinction (E_{232}) de l'huile de soja au cours de stockage accéléré à 63°C pendant 20 jours

Echantillons	E_{232}					
	0	4	8	12	16	20
HT-TEMOIN	4,83 ± 0,04	20,44 ± 0,12	23,88 ± 0,25	32,18 ± 0,25	39,81 ± 0,19	49,98 ± 0,32
HT-BHT	4,83 ± 0,04	6,95 ± 0,07	11,90 ± 0,04	14,38 ± 0,28	18,42 ± 0,11	24,40 ± 0,14
HT-250	4,83 ± 0,04	16,91 ± 0,30	21,19 ± 0,02	27,91 ± 0,12	31,98 ± 0,19	39,36 ± 0,09
HT-500	4,83 ± 0,04	10,98 ± 0,04	15,54 ± 0,12	18,14 ± 0,16	27,46 ± 0,12	33,19 ± 0,16
HT-1000	4,83 ± 0,04	6,30 ± 0,18	9,39 ± 0,30	15,29 ± 0,16	19,28 ± 0,04	25,69 ± 0,12

Quant à l'huile de soja, la figure 28 montre une augmentation progressive de son coefficient d'extinction E_{232} au cours du stockage, ce qui montre l'effet significatif du temps sur les résultats obtenus.

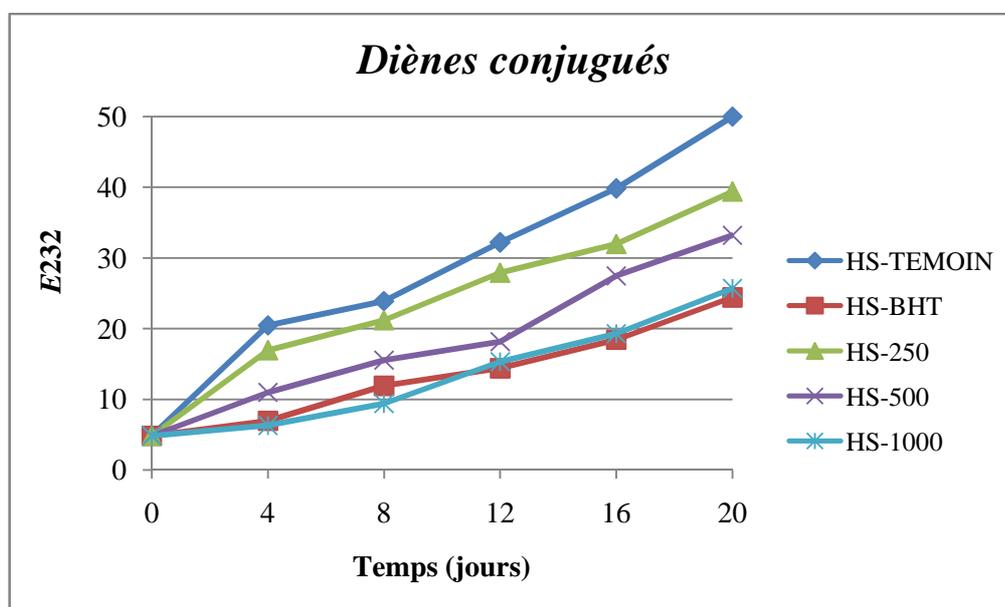


Figure 34 :Evolution de la teneur en diènes conjugués des échantillons de l'huile de soja au cours de l'oxydation accélérée à 63°C

L'huile de soja sans additifs (témoin) présente les DC les plus élevées par rapport aux autres traitements. Sa teneur augmente rapidement pendant les 4 premiers jours où elle passe de 4,83 à 20,44 puis elle ralentit durant les 4 jours qui suivent (23,88), ensuite elle augmente rapidement jusqu'à la fin de l'étuvage pour atteindre une valeur de 49,98. Donc, il s'agit d'une augmentation importante (10 fois) de sa teneur initiale.

L'huile stabilisée avec 250 ppm (HS-250) suit presque la même allure que le témoin mais avec des coefficients d'extinction moins élevés jusqu'au 12^{ème} jour, ensuite elle devient moins accentuée que celle du témoin. Son coefficient d'extinction final est de 39,36 (21,25%).

Contrairement à l'huile stabilisée avec 500 ppm d'EP, après une augmentation plus ou moins importante (par rapport au témoin) de 4,83 à 18,14 ; la vitesse de formation des diènes conjugués s'accélère après les 12 jours de stockage pour atteindre un coefficient d'extinction de 33,19 (33,59%).

Les teneurs les plus faibles en DC sont notées pour des échantillons d'huile de soja stabilisés avec l'extrait de peau de grenade à 1000 ppm pendant les 10 jours d'étuvage mais après elle devient réversible. Les coefficients d'extinction enregistrés pour HS-1000 et HS-BHT à la fin de stockage sont 25,69 et 24,4. Il s'agit d'une réduction de 48,6 et 51,18%.

Les valeurs relativement importantes des diènes conjugués de l'huile de soja par rapport à l'huile de tournesol sont probablement dues à la richesse de l'huile de soja en acide α -linoléique qui possède 3 doubles liaisons.

Il a été suggéré que la formation de teneurs élevées en DC peut être liée à la présence de teneurs élevées en acides gras polyinsaturés dans l'huile de soja (**Liu et White, 1992**).

Farmer et Sutton (2002) ont indiqué que l'augmentation d'absorption due à la formation des diènes et des triènes conjugués est proportionnelle à la prise de l'oxygène et à la formation des peroxydes pendant les premières étapes de l'oxydation.

Marmesat et al. (2009) ont signalé que seulement les hydroperoxydes de l'acide linoléique contribuent à l'augmentation de la teneur en diènes conjugués. Ainsi, l'augmentation en hydroperoxydes d'acide oléique augmenterait l'indice de peroxyde mais pas l'absorption UV à 232 nm.

2.4.Profil en acides gras des huiles étudiées :

La stabilité oxydative des huiles dépendra en particulier de leur teneur et de leur composition en acides gras insaturés (AGI). Ainsi, les huiles les plus insaturées seront les moins stables à l'oxydation, et ce d'autant plus que le nombre de doubles liaisons sur les acides gras est élevé (Cuvelier et Maillard, 2012).

La composition en acides gras de l'huile de tournesol (tableau 22) est très proche de celle de l'huile de tournesol couramment utilisée, qui est caractérisée par une concentration élevée d'acide linoléique, suivie de l'acide oléique. Les acides gras saturés (principalement acide palmitique et acide stéarique) ne s'élèvent pas à plus de 15% du contenu d'acide gras (Grompone, 2005).

Tableau 22 :Composition en acides gras (%) de l'huile de tournesol avant et après oxydation

	HT-FRAICHE	HT-TEMOIN	HT-BHT	HT-250	HT-500	HT-1000
C16 : 0	6,55	7,85	7,1	7,09	6,93	6,84
C18 : 0	3,98	4,16	4,18	4,22	4,04	4,05
C18 : 1	24,44	25,92	26,01	26,15	25,84	25,42
C18 : 2	65,04	62,07	62,57	62,55	63,19	63,61

L'analyse des résultats du tableau 22 fait apparaître une diminution de la teneur en acide linoléique, une augmentation de la teneur en acides oléique et palmitique et plus ou moins une stabilité de l'acide stéarique.

L'acide linoléique (C18:2 ω6) un acide gras polyinsaturé, qui est le composant majeur montre une diminution de 4,57% de sa teneur après 20 jours de stockage pour le témoin. La meilleure stabilité de la teneur en acide gras est enregistrée pour la concentration 1000 ppm avec une diminution de 2,2% suivi de la concentration 500 ppm avec 2,48%, 3,83 et 3,8% pour les échantillons additionnés de l'extrait à 250 ppm et le BHT à 200 ppm.

L'augmentation du pourcentage de l'acide oléique (C18:1 ω9) est la conséquence de la stabilité de pourcentage des acides gras saturés en particulier l'acide stéarique (C18:0), et la réduction de l'acide linoléique (C18:2 ω6).

Tableau 23 :Composition en acides gras (%) de l'huile soja avant et après oxydation

	HT-FRAICHE	HT-TEMOIN	HT-BHT	HT-250	HT-500	HT-1000
C16 : 0	10,79	11,83	11,02	11,29	11,3	11,17
C18 : 0	2,91	3,22	3	3,12	3,04	2,99
C18 : 1	26,05	28,1	26,6	27,37	27,07	26,54
C18 : 2	54,02	51,84	53,54	52,93	53,13	53,44
C18 : 3	5,59	4,8	5,41	5,09	5,26	5,57

Les acides gras majoritaires présents dans l'huile de soja sont l'acide linoléique (C18:2 ω6) 54,02 %, l'acide oléique (C18:1 ω9) 26,05%, l'acide palmitique (C16:0) 10,79 % et l'acide α-linolénique (C18:3 ω3) 5,59%.

Une diminution des AGPI est notée pour le témoin de 59,61 à 56, 64%, Elle est moins prononcée pour tous les échantillons additionnés d'antioxydants naturel et synthétique.

Les échantillons additionnés de l'extrait à 1000 ppm et le BHT à 200 ppm donnent une meilleure stabilité de la teneur en AGPI 59,01% et 58,95%.

La diminution la plus prononcée est enregistrée pour l'huile témoin en acide α-linolénique (C18:3 ω3) qui est de l'ordre de 14,13 % et pour l'acide linoléique 4,04% à la fin de stockage.

L'acide α-linolénique (C18:3 ω3) garde les mêmes valeurs avec l'addition de 1000 ppm d'EP (effet très positif), et note une légère diminution par l'addition de 250 et 500 ppm d'EP et du BHT, soit une réduction de 8,94 ; 5,9 et 3,22% respectivement. Ceci suggère que l'ajout de 1000 ppm d'extrait de peau de grenade protège efficacement l'acide α-linolénique contre la dégradation oxydative.

Une étude de la cinétique de l'auto-oxydation des lipides a indiqué que les taux relatifs d'oxydation d'AGI sont comme suit : C18:3 >C18:2 >>C18:1 (Cosgrove et al., 1987). En général, plus le degré d'insaturation est élevé, particulièrement la polyinsaturation, plus le taux d'oxydation de la somme totale de C18:3 et C18:2 est élevé (de Guzman et al., 2009).

Le taux élevé de l'oxydation de l'acide α -linoléique par rapport à l'acide linoléique est dû à sa vitesse relative de l'oxydation très élevée (tableau 24), qui a une double liaison en plus par rapport à l'acide linoléique, avec une période d'induction très courte (1,34 h).

Tableau 24 : Vitesse relative d'oxydation avec oxygène moléculaire des acides gras de la famille C:18 (Gaillard, 1990)

	Nombre d'atomes de carbone allylique	Période d'induction (h)	Vitesse relative d'oxydation
C18 : 0	0	□	1
C18 : 1	2	82	100
C18 : 2	3	19	1200
C18 : 3	4	1,34	2500

La richesse de l'huile de tournesol seulement en acide linoléique, donne une meilleure stabilité à cette huile par rapport à l'huile de soja qui, en plus de cet acide gras polyinsaturé avec deux doubles liaisons, est très riche en acide α -linoléique acide gras polyinsaturé avec trois doubles liaisons.

En outre, le rapport acide linoléique/acide palmitique (C18.2/C16:0) a été suggéré comme indicateur valide du niveau de la détérioration des AGPI (Normand et al., 2001).

Tableau 25 : Rapport acide linoléique/acide palmitique (C18.2/C16:0) des deux huiles étudiées

	<i>C18:2/C16:0</i>					
	H-FRA	H-TEM	H-BHT	H-250	H-500	H-1000
HT	9,93	7,90	8,82	8,83	9,12	9,29
HS	5,01	4,38	4,86	4,69	4,7	4,78

En examinant le rapport C18:2/C16:0, on constate que plus ce rapport est élevé plus l'huile est stable. Ceci est plus élevé pour huile de tournesol ce qui lui donne une meilleure stabilité.

Pour l'huile de tournesol, l'huile témoin (sans antioxydant) présente le rapport le plus faible 7,90 par rapport à l'huile fraîche 9,93 ce qui correspond à une diminution de 20,44 %.

L'échantillon avec le BHT à 200 ppm et l'extrait à 250 ppm présentent des valeurs identiques (8,82 et 8,83) avec une diminution de 11,18 %. Les échantillons à 500 et 1000 ppm donnent une meilleure stabilité de ce rapport 8,16 et 6,45 % respectivement.

En ce qui concerne l'huile de soja, l'huile témoin donne également le rapport le plus faible 4,38 comparé à l'huile fraîche 5,01 correspondant à une diminution de 12,57 %. Les échantillons additionnés de BHT à 200 ppm et l'extrait à 1000 ppm donnent la meilleure stabilité avec des rapports 4,86 et 4,78 respectivement soit une diminution de 3 et 4,59 %.

2.5. Différence entre l'activité antioxydante des antioxydants liposolubles synthétiques et naturels :

D'après **Pokorny (2007)**, tous les deux agissent par des mécanismes similaires de sorte que leur activité antioxydante ne dépende que de leur structure chimique et de leur polarité.

Les antioxydants synthétiques ont été développés pour la stabilisation des graisses et des huiles en vrac ou des aliments riches en lipides. Dans ces substrats, ils sont nettement plus efficaces que l' α -tocophérol et autres antioxydants naturels, qui sont habituellement moins liposolubles. La concentration la plus élevée autorisée par la loi (0.02 % dans le corps gras) est suffisante dans la plupart des cas des antioxydants synthétiques pour la stabilisation des aliments, sauf peut-être pour le stockage extrêmement long ou friture.

Les antioxydants naturels, sont pour la plupart du temps beaucoup plus polaires que les antioxydants synthétiques, à l'exception des caroténoïdes, des tocophérols et leurs esters. Par conséquent, les antioxydants phénoliques naturels ne sont généralement pas suffisamment solubles dans la phase lipidique, ce qui limite leur efficacité dans les lipides (**Pokorny, 2007**). Il est nécessaire d'ajouter les antioxydants naturels à des concentrations élevées, tels que 0.1-0.5 % et même plus. Ce sont des substrats spécifiques, et leur activité antioxydante dépend beaucoup des synergistes présents tant dans les préparations antioxydantes que dans les aliments stabilisés.

III. Activité antimicrobienne

L'utilisation des agents chimiques ou synthétiques à activité antimicrobienne (comme inhibiteurs, réducteurs de croissance, ou même inactivateurs) est l'une des techniques les plus anciennes pour contrôler la croissance des micro-organismes. L'application des conservateurs aux aliments est fondamentale si leur sûreté doit être maintenue.

Les antimicrobiens naturels, que ce soient d'origine microbienne, animale, ou végétale, qui montrent une activité *bactériostatique/fongistatique* ou *bactéricide/fongicide* prolongent la durée de vie des aliments et empêchent, entre autres, les problèmes relatifs à la santé, les mauvaises odeurs, les goûts désagréables, problèmes de texture, ou les changements de couleur, qui sont fondamentalement provoqués par les systèmes enzymatiques ou métaboliques des principaux micro-organismes, ce qui mène à l'altération des aliments (Parseh et al., 2012).

3.1. Définition d'un antimicrobien :

Un antimicrobien est une substance qui tue ou inhibe la croissance des micro-organismes comme les bactéries, les champignons, les protozoaires, etc. Sur la base du mode d'action, les antimicrobiens sont classés en deux grandes catégories : *Microbicides* qui tuent les microbes sans laisser aucune option pour leur survie et *microbistatiques* qui stoppent toutes les activités métaboliques des microbes qui sont importants pour leur survie, ils s'appellent comme inhibiteurs de croissance des microbes (Khan et Hanee, 2011).

Les activités antimicrobiennes des composés phénoliques peuvent impliquer des modes d'action "multiples". Le type du micro-organisme et la structure de sa paroi cellulaire jouent un rôle important. Les composés phénoliques peuvent dénaturer les enzymes mais ils peuvent également se lier aux substrats tels que les minéraux, les vitamines et les hydrates de carbone, les rendant indisponibles pour les micro-organismes. En outre, les phénols peuvent être absorbés à la paroi cellulaire, ce qui conduit à une rupture de la structure et de la fonction de membrane (Hayrapetyan et al., 2012).

3.2. Analyse qualitative (détermination des zones d'inhibition des souches microbiennes) :

Cette analyse est réalisée dans le but de faire un screening préliminaire des souches sensibles et des résistantes à l'extrait de peau de grenade par la mesure des diamètres des zones d'inhibition des souches testées.

Les résultats de l'analyse qualitative exprimés comme diamètres des zones d'inhibition des différentes souches microbiennes sont mentionnés dans le tableau 26.

Tableau 26 :Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différentes souches microbiennes testées

Souche	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	Concentration (mg/ml)		
	25	50	100
<i>Staphylococcus a.</i>	17,25	25	26
<i>Bacillus s.</i>	10	13,5	13,75
<i>Pseudomonas a.</i>	18,5	22,5	22,5
<i>Klebsiella p.</i>	20	20	20
<i>Escherichia c.</i>	–	–	–
<i>Candida a.</i>	–	–	–
<i>Saccharomyces c.</i>	–	–	–

– : Pas d'inhibition

L'analyse qualitative de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque révèle des diamètres de zones d'inhibition des différentes souches à différentes concentrations de l'extrait variant entre 0 mm (pas d'inhibition) et 26 mm.

Il est remarquable que la concentration 25 mg/ml montre l'effet inhibiteur le plus faible par rapport aux concentrations 50 et 100 mg/ml qui montrent le même effet inhibiteur sur les souches *Staphylococcus a.*, *Bacillus s.* et *Pseudomonas a.* Cependant pour les autres souches, le même effet inhibiteur a été observé pour toutes les concentrations (25, 50 et 100 mg/ml).

La souche *Staphylococcus aureus* montre une zone d'inhibition dont le diamètre (17,25 mm) est inférieur à celui des deux bactéries gram négatif *Pseudomonas* et *Klebsiella* à la concentration 25 mg/ml mais avec l'augmentation de la concentration, la sensibilité de cette souche augmente de façon importante traduite par des zones d'inhibition de 25 et 26 mm pour les concentrations 50 et 100 mg/ml respectivement.

Opara et al. (2009) ont trouvé que tous les extraits des fractions de fruit de grenade montrent une activité antimicrobienne plus élevée sur *S. aureus* que *P. aeruginosa*, avec une différence de 40.06% dans leurs moyennes de zones d'inhibition.

La souche *Bacillus subtilis* montre une sensibilité faible à l'extrait reflétée par une petite zone d'inhibition dont le diamètre varie entre 10 et 13,75 mm.

L'extrait de peau de grenade n'a aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ni antifongique (anti-levurienne) contre les souches de levures testées à savoir *Candida albicans* et *Saccharomyces cerviciae*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Singh et al. (2002)** et **Abdollahzadehet al. (2011)** qui ont rapporté que l'extrait de la peau de *Punica granatum* n'a pas d'effet sur *C. albicans* pour toutes les concentrations.

D'après le tableau 26 et selon l'échelle citée par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al. (1996)**, les résultats obtenus peuvent être interprétés comme suit :

- Une activité modérément inhibitrice sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ;
- Une activité légèrement inhibitrice sur *Bacillus subtilis* ;
- Une activité non inhibitrice contre *Escherichia coli* et les deux souches de levure *Candida albicans* et *Saccharomyces cerviciae*.

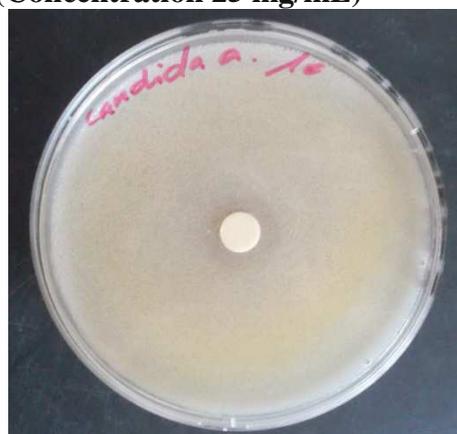


Staphylococcus aureus

(Concentration 50 mg/mL)



Klebsiella pneumoniae



Candida albicans (Concentration 100 mg/mL)

4.1.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Les CMI de l'extrait de la peau de grenade contre les souches bactériennes testées sont indiquées dans le tableau 27 :

Tableau 27 :Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches bactériennes

Souche	Concentration minimale inhibitrice (CMI)		
	Concentration (mg/ml)		
	25	50	100
<i>Staphylococcus a.</i>	0,25	0,125	0,125
<i>Bacillus s.</i>	0,5	0,25	0,25
<i>Pseudomonas a.</i>	1	0,5	0,25
<i>Klebsiella p.</i>	2	1	0,5
<i>Escherichia c.</i>	> 2	> 2	> 2

L'analyse des résultats des CMI déterminées en utilisant la méthode de dilution dans un milieu gélosé confirme les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque.

Selon les résultats du tableau 27, il apparaît que toutes les concentrations de l'extrait de la peau de grenade exercent une activité inhibitrice à différentes dilutions.

L'EPG a montré une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées sauf *Escherichia coli*, et ces valeurs s'étendent de 62.5 à 500 µg/mL (ces valeurs ont été calculées comme suit : la dilution obtenue de CMI x la concentration).

La souche *Staphylococcus aureus* montre la CMI la plus faible avec une concentration de 62,5 µg/ml (0,25% à 25 mg/ml) ce qui se traduit par une sensibilité plus élevée vis-à-vis des composés bioactifs de la peau de grenade.

La souche *Bacillus subtilis* bien qu'elle montre une certaine résistance dans la méthode de diffusion sur disque, la sensibilité de la souche est mise en évidence par son faible CMI qui est de l'ordre de 125 µg/mL. Ceci peut être expliqué par une mauvaise diffusion de l'extrait dans la gélose.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes,

tels que la température, le pH, et les extraits naturels, due à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

Braga et al. (2005) ont observé que les extraits méthanoliques de grenade pouvaient inhiber non seulement la croissance de *S. aureus* mais également la production de l'entérotoxine.

Les 2 bactéries Gram négatif *Pseudomonas a.* et *Klebsiella p.* montrent des CMI plus grandes que celles des bactéries Gram positif (250 et 500 µg/ml respectivement correspondant à 1 et 2 % à 25 mg/ml), ce qui signifie une moindre sensibilité. En ce qui concerne *Escherichia coli*, cette bactérie Gram négatif a montré une grande résistance à l'extrait de la peau de grenade à toutes les concentrations.

Les résultats obtenus à partir de notre étude sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui ont signalé que les extraits alcooliques des fruits (écorces) de grenade ont montré une activité antibactérienne contre *S. aureus* mais aucune activité contre *E. coli* (**Ahmad et Beg, 2001 ; Mathabe et al., 2006 ; Panichayupakaranant et al., 2010**).

De façon générale, nos résultats corroborent les rapports de **Negi et Jayaprakasha (2003)** et **Opara et al. (2009)** sur les activités antibactériennes de la poudre de peau sèche de grenade. Leurs résultats ont montré un effet d'inhibition élevé sur les différentes bactéries Gram positif et Gram négatif telles que *S. aureus*, *P. aeruginosa.*, et *B. cereus*, alors que *E. coli*, la bactérie Gram négatif était résistante.

Sur la base des résultats de la CMI, la sensibilité des souches envers l'extrait de la peau de grenade peut être classée par ordre décroissant comme suit :

Staphylococcus a. □ *Bacillus s.* □ *Pseudomonas a.* □ *Klebsiella p.* □ *Escherichia c.*

Al-Zoreky (2009) a rapporté qu'il été confirmé par de nombreux auteurs que les bactéries Gram négatif sont plus résistantes aux divers antimicrobiens que les bactéries Gram positif dus à leurs membranes externes lipopolysaccharidiques (LPS).

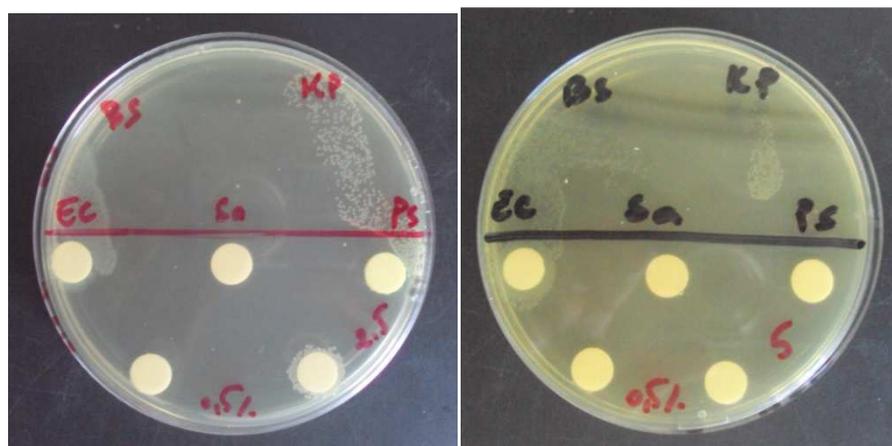
Panichayupakaranant et al. (2010) suggèrent également que l'effet anti-diarrhéique de l'écorce de grenade pourrait être dû à son effet inhibiteur sur les bactéries Gram positif, aussi bien que l'effet astringent des tanins.

L'activité antibactérienne des peaux de grenade peut être indicative de la présence de quelques toxines métaboliques ou composés antibiotiques de large spectre (**Voravuthikunchai et al., 2004**).

Le mécanisme responsable de la toxicité phénolique aux micro-organismes a été lié à la réaction aux groupes sulfhydriques des protéines et à l'indisponibilité des substrats aux micro-organismes (Machado et al., 2003; Naz et al., 2007). Les extraits de grenade interfèrent avec les sécrétions protéiques bactériennes (Al-Zoreky, 2009).

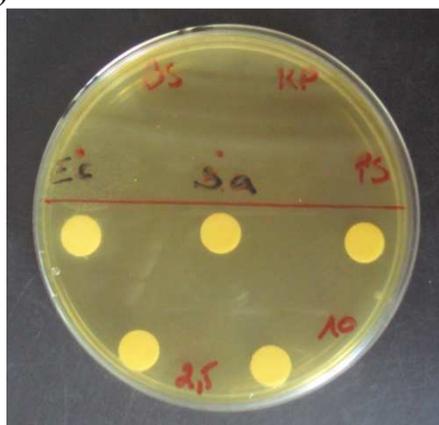
Cowan (1999) a suggéré que les propriétés antimicrobiennes des tanins pourraient être liées à leur capacité d'inactiver les adhérences microbiennes, les enzymes, et les protéines de transport d'enveloppe de cellules, leur complexité avec les polysaccharides, et leur capacité de modifier la morphologie des micro-organismes.

Étant donné que les fractions de grenade contiennent une gamme diverse de tanins (Gil et al., 2000), les effets antimicrobiens des fractions de fruit de grenade rapportées ci-dessus sont en accord avec ceux d'Akiyama et al. (2001) qui ont constaté que les tanins inhibent la coagulation de plasma, tandis que le nombre de colonies de bactéries de *S. aureus* dans les structures membranaires dans le milieu acide tannique (100 mg/l) étaient dix fois inférieur à ceux dans le milieu contenant l'oxacilline (40 mg/l).



Bacillus subtilis CMI=0,5%
(Concentration 25 mg/ml)

Pseudomonas aeruginosa CMI=0,5%
(Concentration 50 mg/ml)



Escherichia coli CMI > 2% (concentration 100 mg/ml)

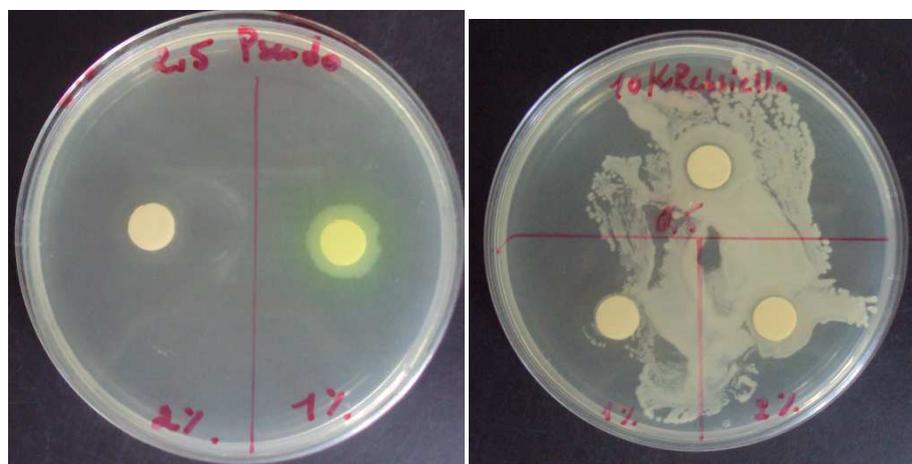
4.2.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

Les CMB de l'extrait de la peau de grenade contre les souches bactériennes testées sont indiquées dans le tableau 28.

Tableau 28 :Concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les souches bactériennes testées

Souche	Concentration minimale bactéricide (CMB)		
	Concentration (mg/ml)		
	25	50	100
<i>Staphylococcus a.</i>	> 2	> 2	1
<i>Bacillus s.</i>	> 2	0,25	0,25
<i>Pseudomonas a.</i>	2	2	1
<i>Klebsiella p.</i>	> 2	> 2	> 2

L'analyse des résultats des CMB (tableau 28) fait apparaître que l'extrait de la peau de grenade n'a aucun effet bactéricide sur la souche bactérienne *Klebsiella pneumoniae* pour toutes concentrations testées CMB >2000 µg/mL (CMB>2% pour toutes les concentrations).



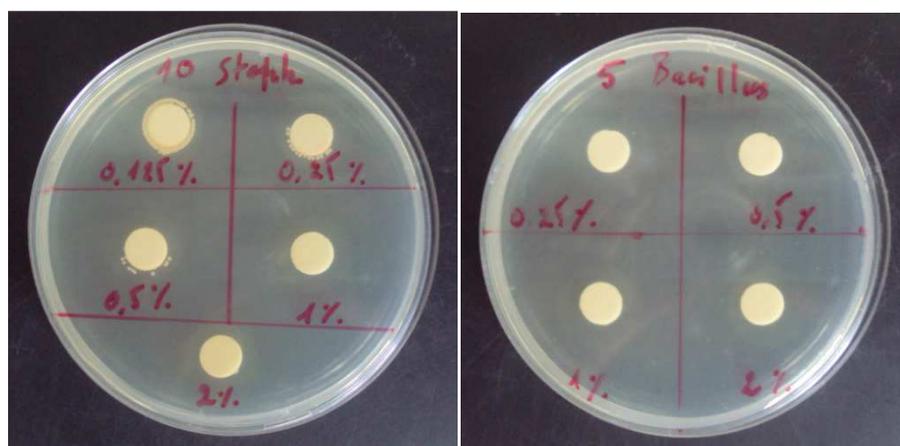
***Pseudomonas aeruginosa* CMB=2%**
(concentration 25 mg/ml)

***Klebsiella pneumoniae* CMB> 2%**
(concentration 100 mg/ml)

Contrairement à la souche *Pseudomonas aeruginosa*, toutes les concentrations de l'extrait de peau de grenade sont bactéricides sur cette souche Gram négatif avec une CMB de 2% pour la concentration 25 mg/mL correspondant à 500 µg/mL.

La souche *Bacillus subtilis* montre une CMB (> 2 %) plus élevée que la CMI (0,5%) à la concentration 25 mg/mL (effet bactériostatique), cependant aux concentrations de 50 et 100 mg/mL, la CMB (0,25%) est égale à la CMI (0,25%) (effet bactéricide).

Quant à la souche *Staphylococcus aureus* dont la CMI (62,5 µg/mL) est la plus faible parmi les autres souches, les concentrations 25 et 50 mg/mL ne sont pas bactéricides. la concentration 100 mg/mL est bactéricide à 1% mais la valeur de CMB (1000 µg/mL) contre cette bactérie est beaucoup plus élevée que la valeur du CMI (62,5 µg/mL). Ceci implique que l'EPG possède seulement une activité bactériostatique sur cette souche. **Panichayupakaranant et al. (2010)** ont rapporté le même effet bactériostatique sur cette bactérie pour l'extrait de la peau de grenade standardisé avec 13% (P/P) d'acide ellagique.



Staphylococcus aureus CMI=0,5%
(Concentration 25 mg/ml)

Bacillus subtilis CMB=0,25%
(Concentration 50 mg/ml)

CONCLUSION GENERALE

Certains sous-produits agro-industriels telles que les écorces de grenade sont des sources importantes de composés phénoliques qui ont de bonnes activités antioxydante et antimicrobienne.

De cette étude nous pouvons ressortir les points suivants :

L'extraction des composés bioactifs par une combinaison de solvants a fourni un rendement élevé de 46% et par conséquent une teneur élevée en composés phénoliques avec 448,4 mg/g de polyphénols totaux, 374,92 mg/g de tanins hydrolysables et 30,37 mg de flavonoïdes.

L'extrait de la peau de grenade a une activité antioxydante très élevée qui dépasse même celle des antioxydants naturels et synthétiques comme la vitamine E et le BHT. Elle est hautement dépendante de la concentration en polyphénols et elle a été évaluée à l'aide de 4 tests *in vitro* :

- Un pouvoir de piégeage du radical DPPH élevé exprimé en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux ($IC_{50} = 5,49 \mu\text{g/ml}$) qui est supérieur à celui de la vitamine E et du BHT ($IC_{50} = 7,113$ et $28,15 \mu\text{g/ml}$ respectivement) cependant il est inférieur à celui de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 2,9 \mu\text{g/ml}$).
- Un pouvoir réducteur élevé exprimé en terme de concentration effective ($EC_{50} = 25,78 \mu\text{g/ml}$) équivalent à celui de BHT ($EC_{50} = 26,74 \mu\text{g/ml}$). Il est très supérieur à celui de l' α -Tocophérol ($EC_{50} = 49,95 \mu\text{g/ml}$). Cependant, il est inférieur à celui de l'acide ascorbique ($EC_{50} = 11,05 \mu\text{g/ml}$) qui est connu pour être un fort agent réducteur.

Par conséquent, l'activité antioxydante marquée de l'extrait de peau de grenade semble être le résultat conjugué de leur activité de piégeage des radicaux et de pouvoir réducteur.

- Une activité d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique comparable à celle du BHT (97,34% d'inhibition du taux des hydroperoxydes) avec un pourcentage d'inhibition très élevé (96% à $500 \mu\text{g/ml}$). Elle est très supérieure à celle de la vitamine E (54,55% d'inhibition).
- Une activité de chélation du fer, bien qu'elle soit faible en comparaison à celle de l'EDTA, mais elle peut être considérée comme élevée pour un produit naturel. Cette propriété est d'un grand intérêt potentiel pour l'industrie alimentaire.

L'ajout de l'extrait de la peau de grenade aux huiles telles que l'huile de tournesol et l'huile de soja augmente leur durée de stockage en renforçant leur stabilité oxydative :

- la stabilisation de l'huile de tournesol avec 250 ppm donne la même stabilité oxydative que le BHT à 200 ppm. L'ajout de l'extrait de peau de grenade à 1000 ppm donne la meilleure stabilité. Il provoque une réduction de 57,28% ; 54,38% et 50,78% de l'indice de peroxyde, l'indice de *p*-Anisidine et les diènes conjugués.
- la stabilisation de l'huile de soja avec 1000 ppm donne la même stabilité oxydative que le BHT à 200 ppm. Celle-ci donne la meilleure stabilité en provoquant une réduction de 61,94 ; 45,35% et 48,6% de l'indice de peroxyde, l'indice de *p*-Anisidine et les diènes conjugués respectivement.
- La stabilité oxydative des huiles étudiées est dépendante de leur composition en acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique qui sont très importants de point de vue nutritionnel. L'addition de l'extrait de peau de grenade à ces huiles assure la stabilité de ces acides gras et par conséquent la stabilité du rapport AGPI/AGS.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait a été réalisée par une étude qualitative et quantitative sur 7 souches microbiennes (2 Gram +, 3 Gram -, et 2 levures).

- L'extrait de la peau de grenade n'a aucune activité anti-levurienne contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.
- Aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli* qui est une souche très résistante.
- L'extrait montre une activité modérément inhibitrice contre les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.
- Les souches bactériennes Gram positif sont plus sensibles à l'extrait que les souches Gram négatif.
- Les valeurs des CMI enregistrées varient entre 62,5 et 500 µg/ml pour l'ensemble des souches testées.
- Parmi les bactéries testées, *Staphylococcus aureus* s'est montrée la plus sensible à l'action de l'extrait testé, contrairement à *Pseudomonas aeruginosa* qui était la moins sensible.
- L'EPG possède une activité bactériostatique contre les souches *Staphylococcus aureus*, et *Klebsiella pneumoniae* et une activité bactéricide contre *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Sur la base de la connaissance de ces propriétés, il serait possible d'utiliser l'extrait de la peau de grenade pour formuler de nouveaux produits à utiliser dans l'industrie alimentaire comme antioxydant naturel en les substituant aux antioxydants synthétiques, et également comme conservateurs naturels et dans les études pharmacologiques.

Etant donné que la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait de peau de grenade sans ajouter l'interférence des substances constituant l'aliment, elle ne peut pas nécessairement reproduire toute la variabilité qui pourrait exister dans le système complexe de l'aliment. Donc, Il serait très utile de :

- Confirmer le potentiel d'activité antioxydante de l'extrait par l'application d'autres tests supplémentaires tels que : le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH•), du radical superoxyde (O₂•) et du radical mono-oxyde d'azote (NO•).
- Evaluer l'activité antioxydante par des essais *in vivo* sur des animaux comme les rats.
- Evaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante directement dans un aliment fonctionnel.
- Etudier l'influence de facteurs tels que le pH sur le pouvoir antimicrobien serait également un point non négligeable à éclaircir afin de mieux cibler les applications alimentaires possibles.

Par conséquent, l'agro-matériau étudié peut être exploré comme source antioxydante potentielle d'origine naturelle; cependant, il est recommandé à ce que la cytotoxicité de l'extrait soit étudiée avant son application dans les huiles végétales, les aliments fonctionnels ou les nutraceutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdel Moneim A. E., 2012.Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(2), pp. 195-199.

Abdel Motaal A. and Shaker S., 2011. Anticancer and Antioxidant Activities of Standardized Whole Fruit, Pulp, and Peel Extracts of Egyptian Pomegranate. The Open Conference Proceedings Journal, 2011, 2, 41-45.

Abdollahzadeh Sh., Mashouf RY., Mortazavi H., Moghaddam MH., Roozbahani N., Vahedi M., 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Punica granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran ; Vol. 8, No.1, pp. 1-6.

Adams L. S., Seeram N. P., Aggarwal B. B., Takada Y., Sand D., and Heber D., 2006. Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in ColonCancer Cells. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 980-985.

Aguilar C. N., Aguilera-Carbo A., Robledo A., Ventura J., Belmares R., Martinez D., Rodríguez-Herrera R. and Contreras J., 2008. Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-StateCultures of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel andCreosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (2) 218–222.

Ahmad I. and Beg A.Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J. Ethnopharmacol. 74: 113-123.

Aiyegoro, O.A.and Okoh, A.I. 2009. Phytochemical Screening and Polyphenolic Antioxidant Activity of Aqueous Crude Leaf Extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International Journal Molecular Sciences* 10: 4990-500.

Ajaikumar KB., Asheef M., Babu BH., Padikkala J., 2005. Theinhibition of astric mucosal injury by PunicagranatumL. (pomegranate)methanolic extract. J Ethnopharmacol 96(1-2):171-6.

Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., & Iwatsuki K., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 487-491.

Al-Zoreky NS., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum*L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology* 134, 244-248.

Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., 2000.Determination of phenolicacids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal ofChromatography A*891, 183-188.

Amarowicz R., 2007. Tannins: the new natural antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology* volume 109, issue 6, no. 6, pages 549–551.

Anwar F., Manzoor M., & Bajwa J. R., 2004.Antioxidant activity of solvent extracts of strawberry (F. Ananassa) using various antioxidant assays. *Pakistan Journal of Analytical Chemistry*, 5 (2), 28-37.

Ardekani M. R. S., Hajimahmoodi M., OveisiM. R., Sadeghi N., Jannat B., RanjbarA. M., GholamN.and Moridi T., 2011.Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punicagranatum*L.)Cultivars.*Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2011), 10 (3): 519-524.

Artik N., 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing* 8, 492-499.

B

Balasundram N., Sundram K., Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99 (2006) 191–203.

Bauer W. J., Badoud R., Lölliger J., Eturnaud A., 2010.Science et technologie des aliments : Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Presses polytechniques et universitaires Rommandes, 732 pages.

Berset C., 2006. Pigments phénoliques : structures, stabilité, marché des colorants naturels et effets sur la santé. In: P. Sarni- Manchado, V. Cheynier (coord.), *Les polyphenols en agroalimentaire*. Paris : Lavoisier, 398 p.

Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Lognay G., Drira N.E. and Attia H. 2004. Quality characteristics andoxidative stability of date seed oil during storage. *Food Science Technology International* 10: 333-338.

Bohm, B. A., 1998. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Borneley S. and Peyrat-Maillard M., 2000. Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, p.p. 2785–2792.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol* 28:25–30.

Bravo L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.

Buettner G., 1999. Singlet oxygen toxicity is cell linedependant: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochem. Photobiol.*,70, 858-867.

Burhan A., Linu A. and Nuran E., 2008.Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N acetylcysteine (NAC), *Free Radical Research*, 42:4,372 – 377.

C

Çam M. and Hişil Y., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry* 123 (2010) 878–885.

Cerda B., Ceron J. J., Tomas-Barberan F. A., & Espin J. C., 2003. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3493–3501.

Chanda S. and Dave R., 2009.*In vitro* models for antioxidant activityevaluation and some medicinal plants possessing antioxidantproperties: An overview. *African Journal of MicrobiologyResearch*; 3(13):981-996.

Chen H. M., Muromoto K., Yamauchi F., Nokihara K., 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2619 -2623.

Cheyrier V., Fulcrand H., Sarni P., Moutounet M., 1997.Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de leur vinification. *In vino Analytica Scientia*.Analysis 25: 14-44.

Chidambara Murthy K. N. ,Jayaprakasha G. K. and Singh R. P., 2002. Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using *in Vivo* Models. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (17), pp 4791–4795.

Chira K., Suh J. H., Saucier C., Teissède P. L., 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 6: 75–82.

Cillard J. et Cillard P., 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides* 2006;13:24–9.

Corongiu F.P. and Banni S., 1994. Detection of conjugated dienes by second derivative ultravioletspectrophotometry. *Methods Enzymol.* 233:303-310.

Cosgrove J. P., Church D. F., Pryor W. A., 1987. The kinetics of the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22:299–304.

Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564-582.

Cui SM., Sasada Y., Sato H., Nii N., 2004. Cell structure and sugar and acid contents in the arils of developing pomegranate fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **73**, 241-243.

Cuvelier M.E., Maillard M.N., 2012. Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL ; 19(2) : 125-132.*

D

Dai J. and Mumper R. J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties :Review. *Molecules*, **15**, 7313-7352.

Dargel R., (1992). Lipid peroxidation-a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 44:169–181.

Davidson P.M., Branen, A.L., 2005. Food antimicrobials – an introduction. In: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen A.L. (Eds.), *Antimicrobials in food*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-10.

Deepa V. S., Kumar P. S., Latha S., Selvamani P. and Srinivasan S., 2009. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Commiphora* spp. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (8), pp. 1630-1636.

de Guzman R., Tang H. Salley S., Simon Ng K. Y., 2009. Synergistic Effects of Antioxidants on the Oxidative Stability of Soybean Oil- and Poultry Fat-Based Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc.* 86:459-467.

Devatkal Suresh K., Narsaiah K., Borah A., 2010. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Science*, vol. 85, no. 1, pp. 155-159.

Dinis TCP., Madeira VMC., Almeida LM., 1994. Action of phenolicderivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate)as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyradical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994;315:161-169.

Doleschall F, Kemény Z, Recseg K, Kövəri K., 2002. A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002;104:14–8.

Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J., 2003.Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83, 255–262.

Dramane S., Witabouna K. M., Kagoyire K., 2010.Evaluation des Activités Antimicrobiennes et Anti-Radicaux Libres de Quelques Taxons Bioactifs de Côte D’ivoire. *European Journal of Scientific Research* Vol.40 No.2 (2010), pp.307-317.

Du C.T., Wang P.L. and Francis F.J., 1975. Anthocyanins of pomegranate, *Punicagranatum*. *J. Food Sci.*40: 417-418.

Duan X-J., Zhang W-W., Li X-M., Wang B-G., 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractionsobtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry* 95 (2006) 37–43.

Duh P. D. and Yen G. C., 1997.Antioxidant Efficacy ofMethanolic Extracts of Peanut Hull in Soybean andPeanutOil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 745-748.

Duh P.D., 1998. Antioxidant activity of Burdock, its scavenging effect on free Radical and active oxygen.*J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75: 455-458.

E

Ela M. A., El-Shaer N. S. & Ghanem N.B., 1996. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, Vol. 51, p.p. 993-995.

Endo E.H., Cortéz D.A.G., Ueda-Nakamura T., Nakamura C.V., Filho B.P.D., 2010.Potent antifungal activity of extracts andpure compound isolated from pomegranate peels andsynergism with fluconazole against *Candida albicans*, *Res.Microbiol.*, 161: 534-540.

F

Farmer, E.H. and D.A. Sutton, 2002. Peroxidation in Relation to Oleifenic Structure. 2nd Edn. In: Food lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Akoh, C.C. and D.B. Min, (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 470.

Fennema O.R., 1976. Principles of Food Science, Part 1, Food Chemistry. Marcel Dekker Inc.

Ferreira I. C. F. R., Barros L., Soares M. E., Bastos M. L., Pereira J. A., 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103, 188–195.

Fraga C.G, 2007. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life*, 59, 308-315.

Frénot M. et Vierling E., 2001. Biochimie des aliments : Diététique du sujet bien portant. Doin éditeurs, CNDP réseau (Biosciences et techniques), Bordeaux, France.

G

Gaillard, 1990. Oxydative deterioration. In : Shelf-Life Problems, Technology and solutions, 31-?.

Gil M. I., García-Viguera C., Artés F. and Tomás-Berberán F. A., 1995. Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *J. Sci. Food. Agr.* 68: 77-81.

Gil M. I., Tomas-Barberan F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. and Kader A. A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4581–4589.

Gioti E., Fiamegos Y., Skalkos D., Stalikas C., 2009. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem.*, 117(3): 398-404.

Gordon M. H., 1990. In B. J. F. Hudson, ed., Food Antioxidants, Elsevier Applied Science, New York, 1990, pp. 13–18.

Grace S. C., 2005. Phenolics as antioxidants. In: Antioxydants and reactive oxygene species in plants, Edited by N. Smirnoff, Blackwell publishing Ltd, 302 p.

Grompone M. A., 2005. Sunflower Oil Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.

Gülçin I., 2006.Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217, 213–220.

Gulcin I., Bursal E., Sehitoglu M. H., Bilsel M., Gören A. C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of Propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2227–2238

Gülçin I., 2011.Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 1-50 pp.

Gyamfi M. A., Aniya Y., 2002. Antioxidant properties of theonin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguine*. *Biochem Pharmacol.* 63: 1725-37.

H

Hagerman A. E., Riedl K. M., Jones G. A., Sovik K. N., Ritchard N.T., Hartzfeld P. W., and Riechel T. L., 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46 (5), pp 1887–1892.

Halliwel B., 1995. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* ; 49: 1341-8.

Halliwel B. and Gutteridge J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edn., Oxford University Press, London, UK.

Harborne J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics* (pp. 1–28). London: Academic Press.

Harborne J.B., 1982. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London, UK.

Harborne J. B., Baxter H., & Moss G. P. (Eds.), 1999. Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). London: Taylor & Francis.

Haslam E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* 1996; 59:205–215.

Hayrapetyan H., H. W. C., Beumer R. R., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23 (2012) 66-72.

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

Hollman P. C. H., & Katan M. B.,1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*,37, 937–942..

Hua-Ming, Chen., Koji, Muramoto., Fumio, Yamauchi., & Kiyoshi, Nokihara.,1996.Antioxidant activity of Designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from Digests of a Soyabean Protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2619-2623.

I

INRAA, 2006.Deuxième rapport national sur l'état des ressourcesphytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture.

IUPAC,1987. Determination of the p-Anisidine Value, Method 2.504 standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives (7th ed., pp. 210–211).Oxford: Alden Press.

J

Jayaprakasha G. K., Selvi T., Sakariah K. K., 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.*, 36: 117-122.

Judde A., 2004. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un système cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?
OCL 11 (6) : 414-418.

Joannet H., 2009. De la grenade et du grenadier. Equinoxe (Nature carrés), Saint-Remy-de Provence, 158 p.

Jurenka J., 2008.Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punicagranatum*L.): A Review. *Alternative Medicine Review* Volume 13, Number 2, 128-144.

K

Kanatt S. R., Chander R. & Sharma A., 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Inter. J. of food and tech.*, 45, 216-222.

Karleskind A. coordonnateur (1992).*Manuel des corps gras*. Ed. Tec & Doc, Paris.

Kawaii S., Lansky EP., 2004. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punicagranatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocyticleukaemia cells. *J. Med. Food* Spring 7(1):13-8.

Kelawala NS. and Ananthanarayan L., 2004. Antioxidant activity of selected foodstuffs. *Int J. Food Sci. Nutr.*, 55(6):511-6.

Khalil E. A. M., 2004. Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* Vol., 16 : 92 – 99.

Khan J. A., Hanee S., 2011. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, volume: 2, Issue-3, pp. 23-27.

Khanbabaee K., van Ree T., 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.*,18,641-649.

Kim J-S.and Kim M-J., 2010. *In vitro* antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(8), pp. 674-679.

King A., & Young G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journ.of the American Dietetic Association*,99, 213–218.

Kriventsov V. I., Arendt N. K., 1981. Anthocyanins of pomegranate juice. *Tr Gos Nikitsk Bot Sad*, 83: 110.

Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert A.E., Griel A.E., Etherton T.D.,2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.* 113: 71–88.

Kulkarni AP., Aradhya SM., Divakar S., 2004. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and capillary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem.* 87: 551-557.

Kulkarni A. P., Mahal H. S., Kapoor S., and Aradhya S. M., 2007. *In Vitro* Studies on the Binding, Antioxidant, and Cytotoxic Actions of Punicalagin. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (4), pp 1491–1500.

L

Labib Ahmed Hossin F., 2009. Effect of Pomegranate (*Punica granatum*) Peels and Its Extract on Obese Hypercholesterolemic Rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (8): 1251-1257.

Laguerre M., Lecomte J., & Villeneuve P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–282.

Laguerre M., López-giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P., 2007. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL VOL. 14 N° 5*, pp 278-292.

Lambropoulos I. and Roussis I.G., 2007. Antioxidative activity of red wine phenolic extracts towards oxidation of corn oil, *Eur. J. Lipid Res.* Vol.109, 623-628.

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

Lehtinen P., Laakso S., 1998. Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in Oat fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, pp. 4842–4845.

Li ZX., Li YP. & Han Y., 1994. Study on the chemical constituents of seed oil of *Punica granatum*. *Chinese Wild Plant Resources* 3, 11-14.

Li HX., Wang Z., Liu YZ., 2002. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 33, 765-769.

Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J. and Cheng S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 96: 254-260.

Liu H., & White P. J., 1992. Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. *Journal of American Oil Chemists Society*, 69, 528–532.

M

Machado TB., Pinto AV., Pinto MCFR., Leal ICR., Silva MG., Amaral ACF., Kuster RM., Netto-dos Santos KR., 2003. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21, 279-284.

Macheix J-J., 1996. Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XX^e siècle ? *Acta Bot Gallica*, 143 : 473-479.

- Macheix J-J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne, 192p.
- Macheix J-J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P., 2006.** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: Les polyphénols en agroalimentaire, Sarni Manchado et cheynier (coord.), Lavoisier, Editions TEC & DOC, Paris, 398p.
- Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., 1996.** Food antioxidants: technological, Polyphenols: toxicological, and health perspectives. Central Food Technological Research Institute, India. 65-98.
- Marc F., Davin A. , Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. et Fritsch P., 2004.** « Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments » M/S : médecine sciences, vol. 20, n° 4, 2004, p. 458-463.
- Marmesat S., Morales A., Velasco J., Ruiz-Méndez M.V. and Dobarganes M.C., 2009.** Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y aceites*, 60 (2), 155-160.
- Mathabe M. C., Nikolova R. V., Lall N., & Nyazema N. Z., 2006.** Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 286–293.
- Meena M.R. et Sethi V., 1994.** Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *J. Food Sci. and Tech. Mysore*, Vol. 31, p.p. 68-70.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R., 2000.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577–599.
- Miliauskas G., Venskutonis P., Beek T., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, 85(2): 231–237.
- Miller DD., 1996.** Mineral. In: Fennema OR, editor. *Food chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1996. p 618-649.
- Min D.B., and Boff J.M. 2002.** Lipid oxidation of edible oil. In: Akoh, C.C., and Min, D.B., Eds., *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.

Moure A, Cruz J. M., Franco D, Domínguez J. M., Sineiro J, Domínguez H., Nùñez M. J., Parajò J. C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72 (2001) 145-171.

Murphy K. N., Reddy V. K., Veigas J. M. and Murthy U. D., (2004). Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *J Med Food Summer* 7(2):256-9.

N

Naidu A.S., 2000. Natural food antimicrobial systems. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-6.

Nasser Al-Muammar and M., Khan F., 2012. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*): review. *Nutrition* (Article in press), 1–10.

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

Naz S., Siddiqi R., Ahmad S., Rasool S., Sayeed S., 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Sciences* 72, 341–345.

Negi P. and Jayaprakasha, J., 2003. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Journal of Food Science*, Vol. 68, No. 4, pp. 1473-1477.

Negi PS., Jayaprakasha GK., Jena BS., 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 80, 393-397.

Neuhofer H., 1990. The existence of pelletierine derivatives in *Punica granatum granatum*. *World Phytomedicines* 5, 604.

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.

Normand L., Eskin N. A. M., Przybylski R., 2001. Effects of tocopherols on the frying stability of regular and modified canola oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 78:369–373.

O

Okonogi S, Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S., Chowwanapoonpohn S., 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* 103, 839-846.

Okuda T., Yoshida T. and Hatano T., 2000. Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution, *Phytochemistry*, 55, pp. 513–529.

Opara L. U., Al-Ani M. R. & Al-Shuaibi Y. S., 2009. Physico-chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum L.*). *Food Bioprocess Technol* (2009) 2:315–321.

Orak H. H., A. Demirci Ş., Gümüş T., 2011. Antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel. *Electronic journal of environmental, agriculture and food chemistry*, 10 (3), pp.1958-1969.

Orak H. H., Yagar H., and Isbilir S. S., 2012. Comparison of Antioxidant Activities of Juice, Peel, and Seed of Pomegranate (*Punica granatum L.*) and Inter-relationships with Total Phenolic, Tannin, Anthocyanin, and Flavonoid Contents. *Food Sci. Biotechnol.* 21(2): 373-387.

Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, Vol. 44, p.p. 307-315.

P

Pan M., Zhu J.C., Wang H.S., Zhang X.P., Zhang Y., He C.H., Ji X., Li H., 2007. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Cortex fraxini* and use in peanut oil *Food Chemistry*, 103 (2007), pp. 913–918.

Panichayupakaranant P., Tewtrakul S. & Yuenyongsawad S., 2010. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chemistry* 123, 400–403.

Parmar H.S., Kar A., (2008). Medicinal values of fruit peels from *Citrus sinensis*, *Punica granatum*, and *Musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J. Med. Food*, 11: 376-381.

Parseh H., Hassanpour S., Emam-djome Zahra, Lavasani A. S., 2012. Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*) as a Tannin rich Fruit: a review. *The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture 26-27 April 2012 in Isfahan, Iran*, pp 1-6.

Patumi M., Terenziani S., Ridolfi M., Fontanazza G., 2003. Effect of fruit stoning on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 249-255.

Pegg R. B., 2005. Lipid Oxidation Stability: Measurement of Primary Lipid Oxidation Products. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates, John Wiley & Sons, Inc.

Pelli K. et Lyly M., 2003. Les antioxydants dans l'alimentation. INRA Paris (France), 28 pages.

Pietta P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 1035–1042.

Porter, L. J. (1989). Tannins. In J. B. Harborne (Ed.), Methods in plant biochemistry: Vol. 1. plant phenolics (pp. 389–419). London: Academic Press.

Poyrazoglu E., Gökmen V., & Artık N., 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punicagranatum L.*) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 15, 567–575.

Q

Qu W., Pan Z. and Maa H., 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. Journal of Food Engineering 99, 16–23

R

Rainha N., Lima E., Baptista J. and Rodrigues C., 2011. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(10), pp. 1930-1940.

Robledo A., Aguilera-Carbó A., Rodriguez R., Martinez J. L., Garza Y., Aguilar C. N., 2008. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. J Ind Microbiol Biotechnol. 35:507–513.

Reddy M. K., Gupta S. K., Jacob M. R., Khan S. I., & Ferrira, D., 2007. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punicagranatum L.* Planta Medicine, 73(5), 461–467.

Reglero R. G. J., Tabera G. J. J., Ibáñez E. M. E., López-Sebastián, L. S., Ramos, M. E., Ballester, S. L. & Bueno, M. J. M., 1999. Proceso de extracción con fluidos supercríticos para la producción de antioxidantes naturales y antioxidante obtenido mediante dicho proceso. Patente española 2: 128 996.

Reinli K, Block G., 1996. Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values. Nutr Cancer Int. J;26:123–148.

Roginsky V. A., Lissi E. A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food *Food Chemistry*, 92 (2005) 235–254.

Romani A., Campo M., Pinelli P., 2012. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolysable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, 130 (2012) 214–221.

Rosenblat M., Hayek T., Aviram M., 2006. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*;187:363-371.

Ruiz A., Ayora-Cañada M. J., & Lendl B., 2001. A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *The Analyst*, 126, 242–246.

S

Sagdic O., Ozturk I., Cankurt H. & Tornuk F., 2011. Interaction Between Some Phenolic Compounds and Probiotic Bacterium in Functional Ice Cream Production. *Food Bioprocess Technol.* 1-8.

Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. et Özer H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.*, Vol.15, p.p. 549-557.

Salgado J. M., Ferreira T. R. B., de Oliveira Biazotto F., dos Santos Dias C. T., 2012. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67:39–43.

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 Research International*, 32, 407–412.

Sanchez-Mareno C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *FoodSci Technol Intern* 8:121–137.

Sangeetha J. and Vijayalakshmi K., 2011. Determination of Bioactive Components of Ethyl Acetate Fraction of Punicagranatum Rind Extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2011; 3(2): 116-122.

Scalbert A. and Williamson G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr (supplement)*; 130:2073S–2085S.

Shabtay A., Eitam H., Tadmor Y., Orlov A., Meir A., Weinberg P., et al., 2008. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10063-10070.

Shahidi F. and Wanasundara P.K., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 67-103.

Shahidi F. and Zhong Y. , 2005. Lipid Oxidation: Measurement Methods . Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.

Shimida K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.

Sivarajan VV., Balachandran I., 1994. Ayurvedic drugs and their plant sources. In: Mohan P, editor. Oxford : IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.

Shon M. Y., Kim T. H., & Sung N. J., 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593–597.

Singh R. P., Jayaprakasha G. K., & Sakariah K. K., 2001. A process for the extraction of antioxidants from pomegranate peels. Submitted for Indian patent No. 392/Del/01.29th March.

Singh R.P., Chidambara-Murthy K.N., Jayaprakasha G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extract using *in vitro* models. *J Agric Food Chem* 2002; 50(1):81-6.

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A. R., Simonic M., & Knez Z., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198.

Schubert SY., Lansky EP., & Neeman I., 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 11-17.

Sivarajan VV. and Balachandran I., 1994. Ayurvedic drugs and their plant sources. In: Mohan P, editor. Oxford :IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.

Spichiger R E., Savolainen V., et al., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. 2004. 413 pages.

Storey T., 2007. La grenade, le fruit médicament. NEXUS n ° 51, pp. 46-54.

Stover E. and Mercure E. W., 2007. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. Hort. Sci. 42:1088–1092.

Sudheesh S, Vijayalakshmi NR., 1999. South Asian J PrevCardiol;3:103.

Sudheesh S., Vijayalakshmi N.R., 2005. Flavonoids from Punica granatum- potential antiperoxidative agents. Fitoterapia 76 (2005) 181– 186.

Sultana B., Anwar F., Rafique Asi M. and Ali Shahid Chatha S., 2008. Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. Grasas y aceites, 59 (3).

Sun J, Yao J, Huang S, Long X, Wang J, García-García E., 2009. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith. Food Chem. 117:276-281.

Swamy MSL., Naveen S., Singsit D., Naika M., Khanum F., 2011. Anti-fatigue effects of polyphenols extracted from pomegranate peel. International journal of integrative biology, vol. 11, n° 2, 69-72.

T

Tayel A.A., El-Baz A.F., Salem M.F. & El-Hadary M.H., 2009. Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. Journal of Plant Diseases and Protection, 116(6), 252–256, 2009.

Tsao R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols (review). *Nutrients* 2010, 2, 1231-1246.

V

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A., 2010. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635–654.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Sendra E., Sayas-Barberá E. & Pérez-Álvarez José A., 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punicagranatum L.*) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International* 44 (2011) 1217–1223.

von Gadow A., Joubert, E., & Hansmann C. F., 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), a-tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 632-638.

Voravuthikunchai S., Lortheeranuwat A., Jeeju, W., Sririrak T., Phongpaichit S., Supawita T., 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 49–54.

W

Wanasundara P. K. J. P. D. and Shahidi F., 2005. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.

Wang M. L., Wang J. T., & Choong Y. M., 2004. A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 187–196.

Wang RF., Xiang L., Du LJ., Wang W., 2006. The constituents of *Punica granatum*. *Asia-Pacific Traditional Medicine* 3, 61-70.

Wang T., Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.*, 116(1): 240-248.

Wang R., Ding Y., Liu R., Xiang L., Du L., 2010. Pomegranate: Constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 4 (Special Issue 2), 77-87.

Wang Z., Pan Z., Ma H. and Atungulu G. G., 2011. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels; *The Open Food Science Journal*, 2011, 5, 17-25 17.

Y

Yu B.P., Yang R., 1996. Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 786, 1–11.

Z

Zahin M., Aqil F., Ahmad I., 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research* 703 (2010) 99–107.

Zhang Y., Yang L., Zu Y. , Chen X., Wang F., Liu F., 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry* 118 (2010) 656–662.

Zheng X., Liu B., Li L. and Zhu X., 2011. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(6), pp. 1004-1011.

Zou Y., Lu Y., Wei D., 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 52(16): 5032-5039.

ANNEXE I

Profil en acides gras des échantillons de l'huile de Tournesol :

HT-FRAICHE

ISA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=8 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/29 13:41:58

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.573	5546	1202			6.5479	C16:0
2	10.498	3368	427			3.9765	C18:0
3	11.187	20695	2556	V		24.4351	C18:1
4	12.54	55085	5246	V		65.0406	C18:2
TOTAL		84693	9431			100	

ISA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 2 SPEED= 5.0

HT-TEMOIN

ISA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=10 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/29 14:21:42

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.955	58	17				
2	7.583	5714	1096	V	1	7.8539	C16:0
3	10.512	3057	384		3	4.161	C18:0
4	11.192	19235	2358	V	4	25.9175	C18:1
5	12.525	46535	4631	V	5	62.0677	C18:2
TOTAL		74599	8486			100	

ISA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 2 SPEED= 5.0

HT-BHT

ISA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=2 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/30 08:06:00

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.961	77	14				
2	7.593	7978	39		1	7.097	C16:0
3	8.025	163	23	V	2	0.1452	C16:1
4	10.519	4746	569		3	4.1799	C18:0
5	11.228	29827	3531	V	4	26.0086	C18:1
6	12.587	72488	6254	V	5	62.5694	C18:2
TOTAL		115278				100	

HT-250

RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=11 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/29 14:47:4

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.949	66	21				
2	7.579	6191	1371		1	7.0855	C16:0
3	10.503	3722	479		3	4.2181	C18:0
4	11.197	23306	2851	V	4	26.1462	C18:1
5	12.544	56324	5294	V	5	62.5502	C18:2
TOTAL		89609	10016			100	

RSA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 2 SPEED= 5.0

HT-500

RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=12 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/29 15:05:0

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.573	4254	948		1	6.9272	C16:0
2	10.115	2507	344		3	4.0412	C18:0
3	11.169	16191	2086		4	25.8425	C18:1
5	12.186	39992	4255	V	5	63.1891	C18:2
TOTAL		62943	7634			100	

HT-1000

RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=9 DATA=1:@CHRM1.C00 12/05/29 14:03:

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.951	64	18			0.0701	
2	7.584	6198	1270			6.8437	C16:0
3	10.513	3671	443			4.0535	C18:0
4	11.207	23025	2699	V		25.4228	C18:1
5	12.559	57609	5393	V		63.6098	C18:2
TOTAL		90566	9823			100	

RSA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 2 SPEED= 5.0

Profil en acides gras des échantillons de l'huile de Soja :

HS-FRAICHE

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=8 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 12:51:02

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.889	105	31			0.0664	
	2	7.509	17029	3164	S		10.7923	
	3	7.927	94	24	T		0.0594	
	4	10.393	4593	515			2.9106	
	5	11.093	41109	4252	V		26.0534	
	6	12.425	85237	7706	V		54.0194	
	7	13.3	395	25	V		0.250	
	8	13.96	8817	1046	V		5.5876	
	9	15.532	411	43			0.2604	

HS-TEMOIN

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=7 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 09:48:41

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.927	90	28			0.0738	
	2	7.557	14455	2882			11.8301	
	3	7.981	159	27	V		0.1297	
	4	10.462	3940	473			3.2245	
	5	11.16	34338	3845	V		28.1028	
	6	12.476	63345	6333	V		51.8428	
	7	14.039	5860	715			4.7962	
TOTAL			122186	14303			100	

HS-BHT

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=3 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 08:30:2

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.969	89	25			0.0662	
	2	7.616	14839	2738			11.0168	
	3	8.043	161	28	V		0.1194	
	4	10.549	4034	455			2.995	
	5	11.263	35826	3694	V		26.5987	
	6	12.605	72108	6678			53.536	
	7	14.167	7293	865			5.4144	
	8	15.763	342	38			0.2535	
TOTAL			134691	14521			100	

HS-250

SA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=6 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 09:27:24

CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.925	76	23			0.0655	
2	7.556	13114	2830			11.2889	
3	7.984	169	27	V		0.1451	
4	10.468	3624	461			3.1198	
5	11.161	31794	3699	V		27.3685	
6	12.478	61483	6239	V		52.9268	
7	14.046	5907	764			5.085	
TOTAL		116167	14044			100	

SA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATT= 2 SPEED= 5.0

HS-500

-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=5 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 09:06:1

* CALCULATION REPORT **

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.949	91	25			0.0691	
2	7.583	14929	2766			11.2965	
3	8.003	180	29	V		0.1361	
4	10.492	4016	448			3.0385	
5	11.192	35776	3686	V		27.0717	
6	12.518	70212	6785	V		53.1292	
7	14.083	6950	809			5.2589	
TOTAL		132153	14548			100	

HS-1000

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=4 DATA=1:@CHRM1.C00 12/06/11 08:48:1

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.943	99	29			0.0784	
	2	7.582	14131	2821			11.1692	
	3	8.011	134	25	V		0.1055	
	4	10.51	3785	436			2.9921	
	5	11.209	33704	3643	V		26.6411	
	6	12.538	67613	6458	V		53.4437	
	7	14.107	7047	829	V		5.5699	
TOTAL			126513	14241			100	

ANNEXE II

Résultats des CMI des souches bactériennes testées :

	25 mg/ml						
	0,03*	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	+	□	□	□
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	+	+	□	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	+	+	□
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+

*: Dilution en pourcentage

+ : Croissance bactérienne

□ : Pas de croissance bactérienne

	50 mg/ml						
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	□	□	□	□	□
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	+	□	□	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	+	□	□
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+

	100 mg/ml						
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	□	□	□	□	□
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	□	□	□
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+

Résultats des CMBs des souches bactériennes testées :

	25 mg/ml						
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	+	+	+	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+

*: Dilution en pourcentage

+ : Croissance bactérienne

□ :Pas de croissance bactérienne

	50 mg/ml						
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	+	+	+	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+

	100 mg/ml						
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
<i>Staphylococcus a.</i>	+	+	+	+	+	□	□
<i>Bacillus s.</i>	+	+	+	□	□	□	□
<i>Pseudomonas a.</i>	+	+	+	+	+	□	□
<i>Klebsiella p.</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia c.</i>	+	+	+	+	+	+	+