

Republique Algérienne Democratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaia



N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : BOUZID Amel

Thème

**Screening phytochimique et activités biologiques des
extraits d'écorces et de membranes de la grenade
(*Punica granatum L.*)**

**Soutenu publiquement, le 26 / 06 / 2019
Devant le jury :**

Mme. HAMID OUJANA A.	Maitre Conférence B	Univ. Ghardaia	Présidente
Melle. BELABBASSI O.	Maitre Assistante A	Univ. Ghardaia	Encadreur
Mr. KHEN M.A.	Maitre Assistante A	Univ. Ghardaia	Examineur

Année universitaire : 2018/2019



Remerciements

Tout d'abord, je remercie le Dieu, notre créateur de me avoir donné le courage, la patience et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science.

*Je souhaite adresser le grand remerciement à mon promotrice **M^{lle} BELABBASSI Ouarda** qui a proposé le thème de ce mémoire, pour la grande patience, les encouragements, orientations et conseils précieux,*

Mes vifs remerciements vont également à :

***M^{me} HAMID OUDJANA A.**, Maitre Conférence B à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université de GHARDAIA, d'avoir assuré la présidence du jury.*

***M. KHEN A. M.**, Maitre Assistante A au Département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie à l'Université de GHARDAIA, pour avoir accepté d'examiner mon travail.*

*J'adresse mes remerciements aussi à **M. BEN SAMEOUNE Youcef**, Chef du département de Biologie - Université de GHARDAIA pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaire pour réaliser ce mémoire.*

Mes vifs remerciements et gratitude s'adressent également à toute personne qui m'aider de près et de loin pour avoir compléter ce mémoire.

BOUZID Amel





Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, je dédie ce modeste travail à :

*Mes chers parents pour leurs sacrifices et encouragements,
que Dieu les préserve et leur accorder santé et quiétude de
l'esprit*

Ma chère grande mère et mes chers sœurs et frères

Mon époux et mes chères filles

Toute ma seconde famille BEN DEKKEN

Mes collègues Amina et Fatima

Tous mes amis et proches

Amel



Liste des abbreviations

ABTS	: 3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique
APG	: Angiosperm Phylogeny Group
DMSO	: Diméthyle sulfoxyde
DPPH	: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
EAA	: Equivalent d'Acide Ascorbique
EAG	: Equivalent d'Acide Gallique
EC	: Equivalent de la Catéchine
ÉCA	: Extrait aqueux des écorces de grenade
ÉCÉ	: Extrait hydro-éthanolique des écorces de grenade
ER	: Equivalent de la Rutine
FeCl₃	: Chlorure Ferrique
FRAP	: Ferric Reducing Antioxydant Power
GN	: Gélose nutritif
HCl	: Chlorure d'hydrogène
IC 50	: Concentration Inhibitrice à 50%
K₂ SO₃	: Sulfate de potassium
MRA	: Extrait aqueux des membranes internes de grenade
MRÉ	: Extrait hydro-éthanolique des membranes internes de grenade
MS	: Matière sèche
Na₂CO₃	: Carbonate de Sodium
NaOH	: Hydroxyde de Sodium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
RE	: Rendement d'extraction
TPTZ	: 2,4,6-Tris (2-pyridyl) -1,3,5-triazine
UFC	: Unités Formant Colonies
UV	: Ultra Violet

Liste des figures

Figure n° 01: Arbre du grenadier <i>Punica granatum L.</i>	5
Figure n° 02: Fleurs et fruits du Grenadier (<i>Punica granatum L.</i>).....	7
Figure n° 03: Structure de l'isoprène.....	30
Figure n° 04: Structure squelettique de base des flavonoïdes et de leurs classes.....	34
Figure n° 05: Photo des échantillons de grenade utilisés dans notre travail après séchage (A : écorces ; B : membranes internes).....	38
Figure n° 06: Photos des extraits filtrés après macération.....	39
Figure n° 07: Différentes étapes du protocole de l'extraction.....	40
Figure n° 08: Réaction de réduction du DPPH.....	46
Figure n° 09: Modification de l'ABTS lors du transfert électronique.....	48
Figure n° 10: Teneur en phénols totaux des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	54
Figure n° 11: Teneur en flavonoïdes des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	55
Figure n° 12: Teneur en tanins condensés des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	56
Figure n° 13: Teneur en composés phénolique des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	57
Figure n° 14: Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>)	58
Figure n° 15: Les valeurs d'IC50 des extraits des écorces et des membranes de grenade en comparaison avec du standard pour le test du DPPH.....	59
Figure n° 16: Corrélation entre les résultats du test de DPPH et du dosage des composés phénoliques des quatre extraits de la grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	60
Figure n° 17: pourcentages d'inhibition du cation ABTS ⁺ en fonction des concentrations des extraits des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	61
Figure n° 18: Les valeurs d'IC50 des extraits des écorces et des membranes de grenade en comparaison avec du standard pour le test d'ABTS.....	62
Figure n° 19: Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	63

Figure n° 20: Corrélation entre les résultats du dosage polyphénols et les tests de l'activité antioxydante.....	65
Figure n° 21: Test d'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vis à vis les extraits des écorces (gauche) et des membranes (droite) de la grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	66
Figure n° 22: Test d'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vis-à-vis les antibiotiques de référence (la gentamicine (gauche) et l'ampicilline (droite)).....	66
Figure n° 23: Test d'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis à vis les extraits des écorces de la grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	67
Figure n° 24: Test d'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis à vis les extraits des membranes de la grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	67
Figure n° 25: Test d'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis à vis les antibiotiques de référence (la gentamicine (gauche) et l'ampicilline (droite)).....	68

Liste des Tableaux

Tableau 01: Classification des terpénoïdes.....	30
Tableau 02: Les principales classes des composés phénoliques	32
Tableau 03 : Classification des flavonoïdes.....	34
Tableau 04: Aspect, couleur et rendement des extraits bruts de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	52
Tableau 05: Les résultats des tests de screening phytochimique.....	53
Tableau 06: Le pouvoir réducteur du fer des écorces et des membranes de grenade (<i>Punica granatum L.</i>).....	64
Tableau 07: Les diamètres des zones d'inhibition des extraits des écorces et des membranes de la grenade contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	68

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Liste des abréviations	
Sommaire	
Résumé	
Introduction	1
Partie I: Synthèse bibliographique	
Chapitre I: Généralités sur <i>Punica granatum</i>	
I.1. Etymologie et Taxonomie.....	3
I.2. Historique.....	4
I.3. Origine et distribution géographique.....	4
I.4. Description botanique.....	5
I.4.1. Les feuilles.....	6
I.4.2. Les fleurs.....	6
I.4.3. Les fruits.....	6
I.5. Composition chimique du fruit de la grenade.....	8
I.5.1. L'écorce.....	8
I.5. 2. Les arilles.....	9
I.5. 3. Les pépins.....	9
I.6. Domaines d'utilisation du grenadier.....	10
I.6.1. Usage médicale.....	10
I.6.1.1. Empirique et traditionnel.....	10
I.6.1.2. Pharmacologique et clinique.....	12
I.6.1.2.1. Activité antioxydante.....	12
I.6.1.2.2. Activité anti-inflammatoire.....	12
I.6.1.2.3. Activité antimicrobienne.....	13
I.6.1.2.4. Activité anticancéreux.....	14
I.6.1.2.5. Activité anti-diabète.....	14
I.6.1.2.6. Autres utilisations.....	15
I.6.2. Usage nutritionnel.....	16
I.6.3. Autres usages.....	16
Chapitre II: Phytothérapie et Plantes Médicinales	
II.1. Phytothérapie.....	18
II.1.1. Définition.....	18
II.1.2. Historique et évolution.....	18
II.1.3. Niveaux d'utilisation.....	19
II.1.3.1. Traditionnel.....	19
II.1.3.2. Pharmacologique.....	19
II.1.3.3. Clinique.....	20
II.1.4. Les avantages de la phytothérapie.....	20

II.1.5. La place de la phytothérapie.....	21
II.2. Les plantes médicinales.....	21
II.2. 1. Action des plantes médicinales.....	22
II.2. 2. Les principes actifs des plantes médicinales.....	23
II.2. 3. Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie.....	23
II.2. 4. Des précautions d'utilisation.....	25

Chapitre III : Les Métabolites Secondaires

III.1. Généralités.....	27
III.2. Occurrence des métabolites secondaires.....	28
III.3. Classification et biosynthèse.....	28
III.3.1. Les terpénoïdes.....	29
III.3.2. Les composés phénoliques.....	31
III.2.3.1. Définition.....	31
III.2.3.2. Structure et classification.....	32
III.2.3.2.1. Les acides phénoliques.....	33
III.2.3.2.2. Les flavonoïdes.....	33
III.2.3.2.3. Les tannins.....	35
III.2.3. Les alcaloïdes.....	36

Partie II: Matériel et Méthodes

Chapitre I : Etude phytochimique

I.1. Matériel végétal.....	38
I.1.1. Récolte et séchage.....	38
I.1.2. Broyage.....	38
I.2. Méthodes d'analyse.....	39
I.2.1. Préparation des extraits.....	39
I.2.2. Détermination du rendement d'extraction.....	41
I.2.3. Analyses des extraits de grenade (<i>Punica granatum</i>).....	41
I.2.3.1. Analyses qualitatives : Screening phytochimique.....	41
I.2.3.2. Analyses quantitatives : Dosage biochimique.....	43
I.2.3.2.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie.....	43
I.2.3.2.2. Dosage des flavonoïdes par trichlorure d'aluminium.....	44
I. 2.3.2.3. Dosage des tannins condensés.....	44

Chapitre II : Etude des Activités Biologiques

II.1. L'activité antioxydante.....	45
II.1.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle (DPPH).....	46
II.1.2. Test de l'acide 2, 2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique) (ABTS).....	47
II.1.3. Test du pouvoir réducteur (Ferric Reducing Antioxydant Power, FRAP).....	49
II.2. L'activité antibactérienne.....	50
II.2.1. Test antibactérien par Méthode de diffusion sur gélose.....	50
II.2.1.1. Repiquage.....	50
II.2.2.2. Préparation de l'inoculum.....	50
II.2.2.3. Ensemencement.....	51
II.2.2.4. L'application des disques.....	51

II.2.2.5. La lecture des résultats.....	51
Partie III: Résultats et Discussion	
Chapitre I : Etude phytochimique	
I.1. Détermination du rendement d'extraction.....	52
I.2. Analyses qualitatives : Screening phytochimique.....	52
I.3. Analyses quantitatives.....	54
I.3.1. Teneurs en phénols totaux.....	54
I.3.2. Teneur en flavonoïdes.....	55
I.3.3. Teneur en tannins condensés.....	56
I.3.4. Comparaison globale des teneurs en composés phénoliques.....	56
Chapitre II : Etude des Activités Biologiques	
II.1. Activité antioxydante.....	58
II.1.1. Test du pouvoir antiradicalaire du DPPH.....	58
II.1.2. Test d'ABTS.....	61
II.1.3. Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	63
II.1.4. Corrélation entre les résultats du dosage des polyphénols et les tests de l'activité antioxydante.....	64
II.2. Activité antibactérienne.....	65
Discussion générale	
	69
Conclusion	77
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé

La grenade *Punica granatum L.* est le «fruit du paradis», elle occupe une place importante dans la médecine traditionnelle, et reçoit un regain d'intérêt sans précédent des chercheurs et des consommateurs. Les écorces de ce fruit ont également un potentiel thérapeutique en raison de ses richesses en composés bioactifs. L'objectif de cette étude est d'évaluer les activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) des extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces et des membranes internes de la grenade *Punica granatum L.*

Les résultats obtenus montrent que les rendements d'extraction des extraits aqueux et éthanoliques (70%) des écorces et des membranes de la grenade, varient entre 25,2 et 57 %. Les analyses phytochimiques qualitatives de ces extraits indiquent la présence de divers métabolites principalement des composés phénoliques. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes ainsi en tannins condensée sont enregistrées pour l'extrait aqueux des écorces de la grenade qui sont respectivement de $514,28 \pm 0,05$ mg EAG/g de MS, $530 \pm 0,01$ mg ER/ g de MS, et $92,33 \pm 0,004$ mg EC/g de MS. Les quatre extraits testés montrent une activité antioxydante vis à vis le piégeage des radicaux libres DPPH[•], et les radicaux cations ABTS⁺, dont la valeur d'IC 50 la plus importante est 550 µg/ml enregistrée pour l'extrait ÉCA pour le test de DPPH, et 315 µg/ml de l'extrait ÉCÉ pour le test de l'ABTS. Les extraits étudiés présentent un pouvoir réducteur (estimé par le test de FRAP) très important et puissant que l'acide ascorbique. Les différentes concentrations (10 - 5 - 2,5 - 1,5 mg/ml) des quatre extraits étudiées ont montrés un effet antibactérien contre la *Staphylococcus aureus*, le diamètre d'inhibition le plus important 13,95mm a été obtenu avec la concentration de 10 mg/ml de l'extrait MRA. Tandis qu'*Escherichia coli* a présenté une résistance totale à toutes les concentrations des quatre extraits ainsi testés de *Punica granatum L.*

Mots clés : activité antioxydante, activité antibactérienne, composés phénoliques, écorces, membrane interne, *Punica granatum L.*

Introduction

Il existe de plus en plus de preuves épidémiologiques et pharmacologiques selon lesquelles les plantes contiennent des composants biologiquement actifs offrant des bienfaits pour la santé et une protection contre les maladies dégénératives (**Shiban et al., 2012**).

Les plantes médicinales jouent un rôle thérapeutique dans la gestion des maladies grâce à la modulation des activités biologiques, principalement dues à la présence de composés bioactifs secondaires (**Rahmani et al., 2017**). En effet, ces plantes et leurs extraits ont été étudiés ces dernières années en raison des préoccupations toxicologiques des drogues synthétiques (**Barathikannan et al., 2016**).

Punica granatum L. communément appelée grenade, est récemment décrite comme étant le fruit puissant de la nature (**Yehia et al., 2011**), elle possède également une vaste histoire ethno-médicale et un réservoir phytochimique de valeur médicinale heuristique (**Padmaja et Prasad, 2011**). Ce fruit majestueux, ne cesse de nous étonner, ce sont aujourd'hui les sciences et plus particulièrement la médecine qui s'intéressent à ce fruit aux multiples vertus (**Bidri et Choay, 2017**).

Fait intéressant, les fractions non comestibles de *Punica granatum L.* (écorces, graines, fleurs, bourgeons et feuilles), bien que considérées comme des déchets, contiennent même des quantités plus élevées de composants spécifiques sur le plan nutritionnel et biologiquement actifs par rapport au fruit comestible (**Akhtar et al., 2015 ; Rahmani et al., 2017**). L'écorce de la grenade a été largement utilisée en médecine traditionnelle (**Zaki et al. 2015**), comme anti-anthelminthiques, anti-trachéobronchite, pour guérir les plaies, les ulcères, les ecchymoses, les stries, la diarrhée, la vaginite et contre les saignements excessifs (**Al-Rawahi et al., 2014**).

Cependant, le potentiel antioxydant unique et les propriétés médicinales intenses de l'écorce de la grenade ont incité la communauté scientifique mondiale à lancer une recherche exigeante au cours de la dernière décennie afin d'explorer plus avant son rôle dans la santé humaine (**Bharani et al., 2016**).

De ce fait, plusieurs études ont confirmé que cette partie de la grenade est une source riche en composés phytochimiques, tels que les polyphénols (**Mphahlele et al., 2016**), d'où elles ont été proposées pour jouer un rôle essentiel dans diverses activités pharmacologiques (**Fawole et al., 2012 ; Barathikannan et al., 2016**). Les métabolites bioactifs présents dans les écorces de la grenade ont fait l'objet d'une attention beaucoup plus grande que ceux trouvés dans d'autres tissus. Les bioactivités des composés

phytochimiques qui s'accumulent dans des tissus autres que les fruits devraient être étudiées plus rigoureusement à l'avenir (**Wu et Tian, 2017**). Cependant, on rencontre un manque des recherches ou bien des preuves scientifiques qui misent en évidence les activités biologiques des extraits de l'endocarpe du fruit de *Punica granatum L.*

C'est dans ce contexte là qu'intervient l'objectif de notre travail qui vise à étudier les activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) des extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces et des membranes internes (l'endocarpe) de la grenade (*Punica granatum L.*). A cet effet, nous nous sommes intéressés à :

- Réaliser une extraction au niveau des écorces et des membranes internes (l'endocarpe) de *Punica granatum L.* tout en utilisant deux types de solvants différents à savoir l'eau distillée et eau-éthanol d'un rapport de 30 :70 (v : v) ;
- Faire un test préliminaire pour savoir les principales catégories des métabolites existants dans les quatre types d'extraits obtenus de la plante et ceci par le biais d'un screening phytochimique;
- Effectuer une analyse quantitative par dosage des trois types de composés phénoliques majoritaires à savoir les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tannins condensés;
- Evaluer l'activité antioxydante des quatre types d'extraits de la plante par le test du DPPH, le test de l'ABTS et le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP) ;
- Evaluer l'activité antibactérienne de nos extraits vis-à-vis de deux souches bactériennes (*E. coli* et *Staphylococcus aureus*) tout en mesurant le diamètre des zones d'inhibition.

Partie I:

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur *Punica granatum*

I.1. Etymologie et Taxonomie

Le nom du genre *Punica* fait référence aux Phéniciens, qui étaient actifs dans l'expansion de leur agriculture, pour des raisons religieuses partielles (Mehta *et al.*, 2012).

En effet, *Punica* viendrait de «punique» car le grenadier aurait été introduit à Rome au temps des Guerres Puniques. Cependant, pour d'autres étymologistes, *Punica* dériverait du latin *puniceus* qui signifie, rouge écarlate, en référence à la couleur de la fleur (Faurasté, 2002).

Le nom scientifique actuel *Punica granatum* est dérivé du nom *Pomum granatus* qui veut dire la pomme granuleuse. Les Romains ont d'abord appelé cette espèce "*Malum punicum*" (pomme punique ou pomme de Carthage) qui a évolué pour devenir "*Punicum granatum*". Plus tard, C. Von Linné a finalement donné le nom de *Punica granatum L.* à cette espèce (Ashton *et al.*, 2006 ; Stover et Mercure, 2007 ; Jurenka, 2008).

Le nom arabe de grenade (rumman) et le nom hébreu (rimmon) sont d'origine du "fruit du paradis". Tandis que, le nom du fruit en français, grenade, a été inspiré de l'arme en raison des similitudes d'apparence (Stover et Mercure, 2007). Dans l'Egypte ancienne, la grenade recevait le nom "Arhumani" (Chandra *et al.*, 2010).

Botaniquement, le grenadier (*Punicagranatum L.*) appartient à l'ordre des Myrtales et à la famille des Punicaceae, qui ne comprend que le genre *Punica*. Les deux espèces les plus connues de ce genre sont: *Punica granatum L.* qu'est l'arbre de grenadier, cultivé pour ses fruits et *Punica nana L.* qu'est le nain de grenade, à usage ornemental, dont les fruits ne sont pas comestibles (Melgarejo et Valero, 2012).

Il existe une autre espèce du genre *Punica*; *Punica protopunica*, qui ne se rencontre que sur l'île de Socotra, et est considérée comme une espèce ancestrale ou un sentier évolutif indépendant (Chandra *et al.*, 2010 ; Melgarejo et Valero, 2012).

D'après Wald (2009), le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Puis 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, c'est en 2003 après une révision, la position du grenadier est :

- Embranchement :	Angiospermes
- Sous-embranchement :	Dicotylédones vraies
- Classe :	Rosidées
- Ordre :	Myrtales
- Famille :	Lythraceae
- Genre :	<i>Punica</i>
- Espèce :	<i>Punica granatum L.</i>

I.2. Historique

La grenade (*Punica granatum L.*) est considérée comme l'un des plus anciens fruits comestibles, associés à plusieurs cultures humaines dans le monde. Elle est mentionnée dans le Coran, la Bible, la Torah juive et le Talmud babylonien en tant que «nourriture de dieux» (Stover et Mercure, 2007 ; Chandra *et al.*, 2010 ; Aboulgasem *et al.*, 2014).

Ce fruit mystique et très distinctif occupe également une place importante dans les cérémonies, les arts et la mythologie égyptienne et grecs, ainsi que dans les arts bouddhistes et chinois. Elle fut l'emblème personnel de l'empereur du Saint-Empire romain, Maximilien (Jurenka, 2008 ; Chandra *et al.*, 2010).

Dans ces diverses civilisations, la grenade est le symbole de vie, de la plénitude, de la fertilité, de la prospérité, la santé et de la longévité (Chandra *et al.*, 2010). Elle est aussi le symbole et le dispositif héraldique de la ville antique Grenade en Espagne, d'où la ville tire son nom (Jurenka, 2008).

Dans l'islam, la grenade est l'un des fruits exceptionnels mentionnés dans le Coran. « Manger la Grenade », disait le prophète Mohammed « car elle purge de l'envie et de la haine ». Mais bien avant l'époque de Mohammed, ce fruit était très estimé en Orient (Evreinoff, 1957). Elle est appelée «fruit du paradis» dont les anciens commerçants arabes l'appelaient ainsi, et dans le folklore et la poésie arabes, la grenade était le symbole pour le «Fluide de la vie» (Ashton *et al.*, 2006).

I. 3. Origine et distribution géographique

La patrie phylogénétique du Grenadier se trouve, selon les derniers travaux des botanistes et pomologues, dans toute une vaste région englobant l'Iran, l'Afghanistan et la Transcaucasie orientale. On observe dans ces pays une multitude de formes spontanées et de variétés cultivées d'un grand intérêt (Evreinoff, 1957 ; Ashton *et al.*, 2006).

En Asie Mineure dans la région méditerranéenne, ainsi qu'en Afrique du Nord, l'espèce se serait naturalisée à la suite d'une très ancienne culture, et de sa dispersion par les oiseaux (**Evreinoff, 1957**). Il est cultivé depuis au moins 5000 ans en Asie occidentale et en Afrique du Nord (**Idlimamet al., 2007**).

L'arbre est également cultivé pour ses fruits dans les régions plus sèches de la Californie et de l'Arizona (**Jurenka, 2008**).

En Algérie, le grenadier connu depuis des millénaires, et considéré comme une espèce fruitière secondaire, prend de plus en plus d'envergure ces dernières années (**Meziane, 2015**), où des fruits d'excellente qualité peuvent être obtenus. Cette espèce tempérée, nécessitant des températures élevées pour mûrir correctement, était autrefois cultivée dans la région septentrionale de l'Algérie (**Meziane et al., 2016**).

I.4. Description botanique

Selon **Evreinoff (1957)**, le grenadier (*Punica granatum L.*) est une précieuse espèce fruitière méridionale et subtropicale. Il supporte parfaitement un climat très chaud, très sec et prospère même dans les climats tropicaux pourvus d'une saison sèche.

Il se caractérise par une longue durée de la floraison qui s'étend parfois du mois de mai à la fin juillet. Pour obtenir des fruits de qualité, la pluviométrie doit être environ de 500 mm, avec des pluies printanières, des étés chauds et de longs automnes secs.



Figure n°1 : Arbre du grenadier *Punica granatum L.* (**Hmid, 2013**).

Le grenadier est un grand arbuste, mesurant moins de 15 pieds en culture, bien qu'il puisse atteindre 30 pieds dans la nature (**Ashton et al., 2006**). Il possède de nombreuses branches épineuses et peut vivre extrêmement longtemps, comme le prouvent les arbres de Versailles, en France, qu'ils sont connus plus de 200 ans (**Jurenka, 2008**).

Les troncs sont plus ou moins ronds, dressés, avec des branches alternes ouvertes un peu piquantes à la fin. L'écorce vieillissante présente des fissures, une couleur grisâtre et peut paraître nouée et tordue (**Ashton et al., 2006**). L'arbuste lui-même varie d'aspect tombant à dressé en fonction de la variété et des conditions de croissance, bien que la majorité d'entre elles soient dressées. Les bourgeons sur la croissance secondaire sont latéraux et à l'aisselle des feuilles. Les bourgeons terminaux à la pointe produisent parfois une épine; d'autres fois, ils deviennent une fleur ou une grappe de fleurs, ou tombent tout simplement. Comme la plante ne possède pas de véritables bourgeons terminaux, la croissance doit provenir des bourgeons latéraux (**Ashton et al., 2006**).

I.4.1. Les feuilles

Les feuilles du grenadier sont caduques, allongées et disposées en alternance. Elles sont lancéolées, brillant d'en haut, de 5,7 cm de long et 1,7 cm de large, ayant un pétiole fin de 4 cm de long. Souvent regroupées sur des rameaux limités (**Mehta et al., 2012**).

Les jeunes feuilles rougeâtres deviennent vert vif à maturité, le haut de la feuille est vert plus foncé que le bas (**Ashton et al., 2006**).

I.4.2. Les fleurs

Les fleurs, d'une forme d'un entonnoir, sont rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupes de deux ou de trois au sommet des branches (**Bidri et Choay, 2017**). Bien que des fleurs "doubles" et panachées se retrouvent dans certaines sélections ornementales, qui ne sont pas cultivées pour le fruit (**Stover et Mercure, 2007**).

Elles apparaissent seules ou en petites grappes, généralement de 2 à 6 fleurs à l'extrémité de la branche mais parfois sur les bourgeons auxiliaires. Sur 25-30 boutons, généralement 3-5 fleurs se développent (**Ashton et al., 2006**).

I.4.3. Les fruits

Le fruit, dénommé la grenade, est une grosse baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'un pamplemousse à écorce dure et coriace (**Bidri et Choay, 2017**). Avec des loges de 4-15, séparées par des cloisons membraneuses, ou comme certains diraient, chiffon. L'intérieur est rempli de nombreuses graines charnues de forme prismatique de couleur rose à rouge (**Ashton et al., 2006**). La grenade mûre peut atteindre une largeur de 5 cm et est couronné par le calice pointu (**Jurenka, 2008**).

Seules ses graines sont comestibles et représentent environ la moitié du fruit. Dans chaque graine, une partie ligneuse, le pépin, est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente appelée arille, sucrée dans les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre et acide (**Bidri et Choay, 2017**).

La fructification du Grenadier commence dès la troisième année après la plantation. Le plein rendement commence dans les 6-7^{ème} années et se poursuit pendant 30-40 ans (**Evreinoff, 1957**).

La maturité des fruits a lieu fin septembre-octobre, certaines variétés mûrissent en Novembre. Les fruits se conservent de deux à trois mois, sans perdre leurs qualités. Dans la glace leur conservation peut être prolongée de six mois. La grenade, en raison du péricarpe épais et dur, supporte très bien le transport (**Evreinoff, 1957**).

L'écorce de la grenade est dure et coriace également appelée malicorium, de couleur rouge ou jaune-beige (**Bidri et Choay, 2017**), mais généralement jaune verdâtre ou brune, avec des zones rougeâtres pouvant occuper toute la surface du fruit, et peut être aussi rose, violet foncé et de nombreuses nuances entre les deux (**Ashton et al., 2006**).

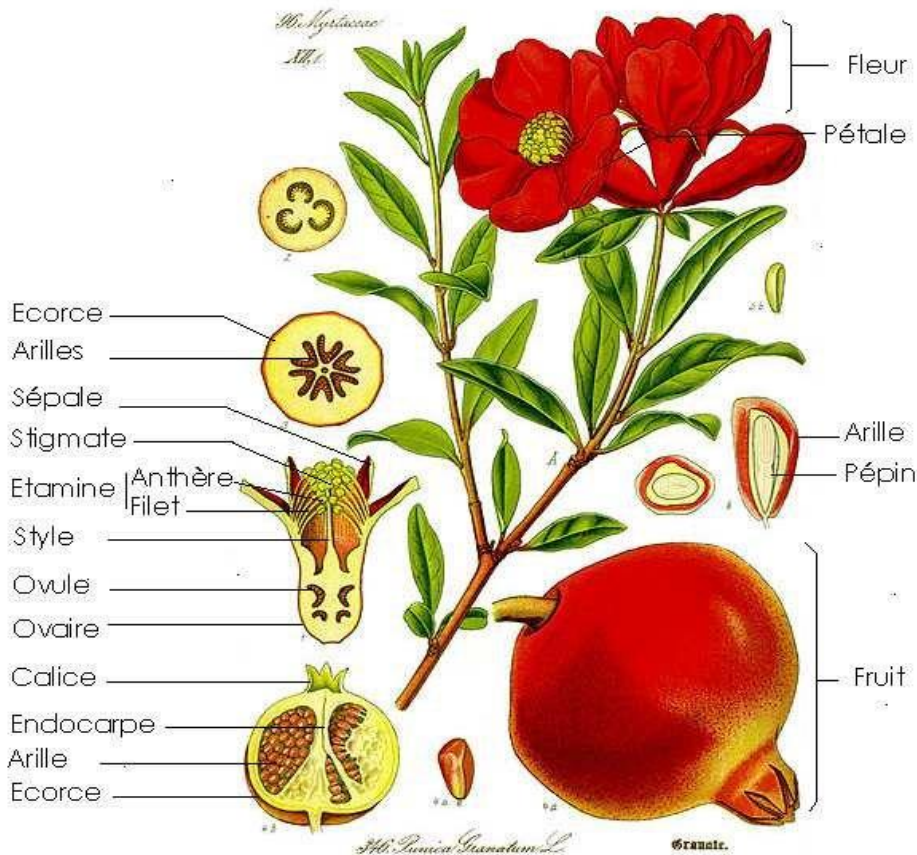


Figure n°2 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punicagranatum L.*)(Flora von Deutschland et Schweiz, 1885).

I.5. Composition chimique du fruit de la grenade

Bien que la grenade produise et accumule une grande variété des composés phytochimiques ayant diverses structures dans différents tissus, des efforts d'investigation ont jusqu'à présent été consacrés principalement à la bioactivité des polyphénols de ce fruit (Wu et Li, 2017). Où il faut noter que la principale catégorie de composés phytochimiques du grenadier est constituée par les polyphénols qui prédominent dans le fruit (Dahham et al., 2010; Al-Rawahiet al., 2014). Cependant, la composition chimique des fruits diffère selon le cultivar, la région de culture, le climat, la maturité, les pratiques de culture et les conditions de stockage (Viuda-Martos et al., 2010 ; Abdel Mageid et al., 2016).

La grenade contient des composés précieux dans différentes parties du fruit. Ceux-ci peuvent être divisés en plusieurs origines anatomiques: peau (écorce), graines (pépins) et arilles (Viuda-Martos et al., 2010). Les fruits et les fractions non comestibles (écorces et pépins) de la grenade sont biochimiquement composés de plus de 124 composés phytochimiques différents comprenant les polyphénols, les flavonoïdes, les anthocyanines et d'une vaste gamme de minéraux et de vitamines essentiels (Akhtar et al. 2015).

I.5.1. L'écorce

Les écorces de grenade se distinguent par un réseau interne de membranes couvrant près de 26 à 30% du poids total du fruit et se caractérisent par des quantités considérables de composés phénoliques (Bharani et al., 2016). Par rapport à la pulpe, l'écorce de grenade non comestible contient jusqu'à trois fois la quantité totale des polyphénols, tannins condensés, catéchines, gallo-catéchines et prodelpinidines (Malviya et al., 2014 ; Alshammari et al., 2017). Elles comprennent aussi des acides organiques et phénoliques, des stérols, des triterpénoïdes et des alcaloïdes (Al-Rawahiet al., 2014). De plus, elles contiennent des flavonoïdes tels que les anthocyanes, les catéchines et autres complexes flavonoïdes et les tannins hydrolysables (éllagitannins et gallo-tannins) (Bharani et al., 2016).

Ces tannins hydrolysables sont intenses dans les écorces et les jus de grenade, et dans les membranes blanches, sont les polyphénols prédominants dans la grenade et représentant 92% de l'activité antioxydante totale alliée au fruit (Dahham et al., 2010; Mehta et al., 2012; Al-Rawahiet al., 2014). Ces tannins sont très sensibles à l'hydrolyse enzymatique et non enzymatique. Les produits d'hydrolyse comprennent le glucose et l'acide éllagique ou l'acide gallique (Al-Rawahiet al., 2014).

La couleur rouge brillant de l'écorce est attribuée aux anthocynidines (telles que la cyanidine, la pélargonidine et la delphinidine) et aux flavan-3-ols. Les flavones et les flavonols constituent les principaux flavonoïdes de l'écorce (**Patel et al., 2017**).

De plus, il constitue une source importante de minéraux, en particulier de potassium, de calcium, de phosphore, de magnésium, de sodium et des polysaccharides complexes. Récemment, il a été révélé que la poudre de la peau de grenade contient beaucoup plus de lysine, de leucine, d'acides gras aromatiques (phénylalanine et tyrosine), de thréonine et de valine (**Jalal et al., 2018**).

I.5. 2. Les arilles

La partie comestible de la grenade (50%) comprend 40% d'arilles et 10% de graines (pépins). Les arilles contiennent 85% d'eau, 10% de sucres totaux, principalement du fructose et du glucose, et 1,5% de pectine, des acides organiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'acide malique (**Viuda-Martos et al., 2010; Jalal et al., 2018**), de l'acide chlorogénique, l'acide caféique (**Ali Redha et al., 2018**), de l'acide oxalique, l'acide quinique, l'acide succinique et l'acide tartrique (**Wu et Li, 2017**).

Le jus de grenade se caractérise par sa richesse en composés bioactifs tels que les phénols et les flavonoïdes, principalement des anthocyanes, l'acide éllagique, l'acide gallique, la catéchine, l'épigallocatechine, la quercétine, la rutine, et d'autre part il contient du fer et des acides aminés (**Prasad et Kunnaiah, 2014**). Il contient également les tannins hydrolysables ou éllagitannins dont ils se forment lorsque l'acide éllagique et / ou l'acide gallique se lient à un glucide et sont appelés punicalagins (**Alshammari et al., 2017; Wu et Li, 2017**).

I.5. 3. Les pépins

Les pépins (graines) sont une source riche en lipides totaux; l'huile de pépins de grenade représente 12% à 20% du poids total de la graine (**Viuda-Martos et al., 2010**). Elle est caractérisée par une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (n-3) tels que linoléique, linolénique et autres lipides tels que l'acide punicique, l'acide oléique, l'acide stéarique et l'acide palmitique (**Viuda-Martos et al., 2010**).

L'acide punicique (acide triénoïque) est un acide gras conjugué exceptionnel représente environ 65% à 80% de l'huile de pépins de grenade (**Jalal et al., 2018**). Il est également appelé acide linoléique super conjugué, dont l'effet est encore plus puissant que celui d'un acide linoléique conjugué ordinaire (**Jalal et al., 2018**). Les autres

composants de l'huile comprennent les stérols, les stéroïdes et les cérébrosides (Syed *et al.*, 2013).

Les pépins contiennent également des protéines, des fibres brutes, des vitamines, des minéraux, de la pectine, des sucres, des polyphénols, des iso-flavones, des phytoestrogènes, du coumestrol et du stéroïde sexuel, l'estrone (Viuda-Martos *et al.*, 2010; Jalal *et al.*, 2018). En outre, la poudre de graine de grenade contient des acides aminés contenant du soufre (méthionine et cystéine), des acides gras aromatiques (phénylalanine et tyrosine), de la leucine et de l'isoleucine (Jalal *et al.*, 2018).

I.6. Domaines d'utilisation du grenadier

Le grenadier (*Punica granatum L.*) a été utilisé dans diverses régions et systèmes médicaux, populaires ou traditionnels, comme complément alimentaire ou médicament en raison de ses énormes composés aux activités multiples et sans toxicité (Wang *et al.*, 2010). En plus de l'utilisation alimentaire, presque toutes les parties de cette plante sont utilisées dans le monde pharmaceutique (Wang *et al.*, 2010).

I.6.1. Usage médicale

I.6.1.1. Empirique et traditionnel

Punica granatum L. a figuré pratiquement dans toutes les grandes religions et a été utilisée pendant des siècles en médecine traditionnelle (Syed *et al.*, 2013; Bhowmik *et al.*, 2013). Notamment, les fruits, les graines, les écorces et les feuilles contiennent divers types d'ingrédients précieux, et jouent un rôle thérapeutique dans la guérison d'une grande variété des maladies (Rahman *et al.*, 2017; Wu et Li, 2017).

- ❖ Aucune discussion sur les anciennes applications médicales des plantes n'est complète sans la mention de Dioscorides, qui indique: "Toutes sortes de grenades ont un goût agréable et sont bonnes pour l'estomac" et suggère en outre le jus pour le traitement des ulcères, et pour les douleurs des oreilles, et la congestion nasale (Stover et Mercure, 2007).
- ❖ Dans le système médical ayurvédique, la grenade est considérée comme «une pharmacie à part entière» (Jurenka, 2008), l'écorce du fruit et l'écorce de grenadier ont des propriétés anthelminthiques et vermifuges (Wangetal., 2010; Alshammari *et al.*, 2017). Ils sont utilisés dans le traitement de la diarrhée, de la dysenterie et des parasites intestinaux, pour les saignements de nez et de gencive, le

raffermissement de la peau et le traitement des hémorroïdes (Mehta *et al.*, 2012; Alshammari *et al.*, 2017).

- ❖ De même les Chinois ont utilisé l'écorce de fruit pour le traitement de la diarrhée, des métrorragies et des maux de ventre (Wang *et al.*, 2010).
- ❖ Hippocrate (400 avant notre ère) a utilisé des extractions de grenade pour traiter une grande variété de maladies, telles que le plâtre, afin de réduire l'inflammation de la peau et des yeux et d'aider à la digestion (Stover et Mercure, 2007).
- ❖ Les anciens Égyptiens utilisaient des extraits de racine de grenadier riches en tannins pour débarrasser leurs ténias. Des extraits de tannins (écorce, feuilles, fruits immatures) ont été utilisés pour mettre fin à la diarrhée et aux hémorragies, (Stover et Mercure, 2007).
- ❖ La grenade a également été utilisée comme un «tonique du sang» et dans le traitement des pathologies respiratoires et comme antipyrétique (Viuda-Martos *et al.*, 2010), et classée comme un composant amer-astringent dans le système ayurvédique Indien, et considérée comme un contrepois sain à un régime riche en composants sucrés-gras (Alshammari, *et al.*, 2017).
- ❖ Le jus de grenade est utilisé comme collyre pour ralentir le développement de la cataracte (Alshammari *et al.*, 2017; Bhowmik *et al.*, 2013). Il est également utilisé pour traiter les problèmes de dysenterie et de choléra (Bhowmik *et al.*, 2013). **De plus**, les caractéristiques astringentes du jus de fleurs, de la couenne et de l'écorce des arbres sont considérées comme utiles à diverses fins, telles que l'arrêt de saignement du nez et de gencive, le raffermissment de la peau, le raffermissment des seins affaissés et le traitement des hémorroïdes (Mehta *et al.*, 2012; Bhowmik *et al.*, 2013).
- ❖ Dans la médecine yunâni, la fleur est utilisée comme complément alimentaire pour traiter le diabète sucré (Wang *et al.*, 2010; Wu et Li, 2017).
- ❖ Les boutons de fleurs séchées et écrasées sont transformés en thé comme remède contre la bronchite (Stover et Mercure, 2007). De plus, boire du thé à base de feuilles de ce fruit aide à contrôler l'inflammation et traiter les troubles du système digestif (Bhowmik *et al.*, 2013; Wu et Li, 2017).
- ❖ Au Mexique, des extraits de fleurs sont utilisés comme gargarismes pour soulager les inflammations de la cavité buccale et de la gorge (Stover et Mercure, 2007; Bhowmik *et al.*, 2013).

- ❖ Parmi les autres utilisations traditionnelles des produits du grenadier, citons les traitements pour la contraception, les morsures de serpent, le diabète et la lèpre (Stover et Mercure, 2007)

I.6.1.2. Pharmacologique et clinique

L'importance traditionnelle de la grenade en tant que plante médicinale est maintenant renforcée par les données scientifiques émergentes, qui démontrent que ce fruit possède des activités thérapeutiques potentielles (Syed *et al.*, 2013), incluent le traitement et la prévention de divers maladies (Jurenka, 2008).

Bien que la grenade soit riche en molécules bioactives, l'action synergique des constituants de la grenade semble supérieure à celle des constituants isolés (Jurenka, 2008).

I.6.1.2.1. Activité antioxydante

C'est la plus importante bioactivité de la grenade et constitue la base des autres activités. Les substances antioxydantes existent principalement dans les feuilles et les fruits notamment les graines, le jus et le péricarpe (Wang *et al.*, 2010). En effet, des études ont été faites pour explorer l'activité antioxydante des écorces, des graines ainsi des feuilles de grenade résultant de la confirmation que leurs extraits présentaient une importante activité antioxydante (Rahmani *et al.*, 2017). De plus, des corrélations linéaires significatives et positives ont été trouvées entre les capacités antioxydantes totales et les teneurs en composés phénoliques, ce qui indique que les composés phénoliques sont les constituants antioxydants dominants de la grenade (Wang *et al.*, 2010). Tandis que les tannins hydrolysables représentent 92% de l'activité antioxydante totale de la grenade (Mehta *et al.*, 2012).

La combinaison de divers types de polyphénols rend les antioxydants à la grenade uniques et différents des autres antioxydants, tels que la vitamine A ou C, en offrant un spectre d'action beaucoup plus large contre plusieurs et non pas un seul type de radicaux libres (Syed *et al.*, 2013).

I.6.1.2.2. Activité anti-inflammatoire

Bien qu'une inflammation physiologique ou aiguë soit une réponse bénéfique de l'hôte aux dommages tissulaires, elle peut entraîner des maladies associées au système immunitaire, car leur résolution rapide est retardée (Wang *et al.*, 2010).

Cependant, les traitements à base de produits naturels sont très efficaces dans le traitement de l'inflammation sans aucun effet indésirable grave sur le métabolisme de l'acide arachidonique et l'activité de l'enzyme cyclooxygénase. Plusieurs études ont montré que la grenade joue un rôle dans la réduction de l'inflammation par la modulation de diverses activités physiologiques (**Rahmani et al., 2017**). Cet effet pourrait être dû à son action immunorégulatrice sur les macrophages et les lymphocytes T et B (**Prasad et Kunnaiah, 2014**).

Les activités anti-inflammatoires et analgésiques de l'écorce, de la fleur et des feuilles des grenades ont été mesurées et il a été observé que le prétraitement avec les extraits secs produisait une inhibition significative et modulable de l'œdème (**Rahmani et al., 2017**). En outre, les tannins hydrolysables ont montré *in vitro* un effet inhibiteur significatif contre une réaction inflammatoire. Notamment, l'acide punique présent dans l'huile de pépins de grenade, avait un effet anti-inflammatoire *in vivo* en limitant l'activation des neutrophiles et les conséquences de la peroxydation des lipides (**Viuda-Martos et al., 2010**).

I.6.1.2.3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de certains cultivars de grenade courants a été largement étudiée; plusieurs essais *in vitro* démontrent son activité bactéricide contre plusieurs organismes hautement pathogènes et parfois résistants aux antibiotiques (**Viuda-Martos et al., 2010**).

En général, l'ampleur des effets inhibiteurs des extraits de grenade pourrait être attribuée à l'anthocyanine phénolique et à la teneur en tannin des fruits. Les tannins sont supposés être toxiques pour les microorganismes (**Viuda-Martos et al., 2010**). Ainsi, des études confirment que l'activité antibactérienne de ce fruit est aussi due à la présence de terpénoïdes et d'alcaloïdes (**Mehta et al., 2012**). D'autre part, les polyphénols, en particulier les tannins de grenade, jouent un rôle essentiel dans l'effet antiviral en raison de leur propriété particulière de précipitation des protéines, qui ont un effet défavorable sur les enzymes intervenant dans le cycle de vie du virus (**Wang et al., 2010**). De même, les tannins des écorces de grenade sont des constituants très efficace contre le virus de l'herpès génital (HSV-2) et qu'il tue efficacement le virus et bloque son absorption par les cellules. D'autres résultats ont révélé que l'acidité des solutions de jus et d'extrait liquide contribuait à la rapidité de l'activité anti-grippe (**Rahmani et al., 2017**).

Les activités antifongiques des extraits d'écorces de grenade, des graines, et du jus et du fruit entier sont évaluées (**Rahmani et al., 2017**). Par conséquent, *Punica granatum* est l'une des plantes qui a donné des résultats positifs avec une propriété antifongique à large spectre (**Mehta et al., 2012**).

6.1.2.4. Activité anticancéreuse

La cancérogenèse est une cascade très complexe et peut être affectée par plusieurs facteurs. La grenade peut interférer avec l'apparition et le développement de tumeurs dans de nombreuses procédures, notamment le développement de l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose, la prolifération et l'invasion (**Wang et al., 2010**). Ceci grâce à leurs dérivés dotés d'une très forte activité antioxydante en tant qu'agents antiprolifératifs, anti-invasifs et pro-apoptotiques dans diverses lignées de cellules cancéreuses et modèles animaux (**Viuda-Martos et al., 2010**).

En effet, des données d'importantes attribuées par des études *in vitro* et *in vivo*, indiquent l'efficacité des substances phytochimiques de la grenade et ces dérivés contre la croissance et la promotion de divers types de cancer, tel que le cancer de la prostate, cancer de la peau, cancer du colon, cancer du poumon, cancer du sein et la leucémie (**Syed et al., 2013**).

6.1.2.5. Activité anti-diabète

Le régime alimentaire est l'un des moyens de contrôler le diabète sucré et c'est ici que les fruits et les dérivés du grenadier peuvent jouer un rôle (**Viuda-Martos et al., 2010**).

Les fleurs ont été utilisées comme médicament antidiabétique dans la médecine Unani et comme complément dans la thérapie par le régime dans de nombreux pays. Elles peuvent réduire de manière significative le taux de glucose sanguin chez les animaux atteints de diabète de type 2 avec différents mécanismes possibles, notamment une augmentation de l'expression de l'ARNm, une amélioration de la sensibilité des récepteurs de l'insuline, une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose, ...etc (**Wang et al., 2010**). D'autre part, les extraits de graines et d'écorces présentaient une réduction significative de l'augmentation du taux de glucose sanguin (**Rahmani et al., 2017**).

Les principaux composés qui présentent des propriétés antidiabétiques sont les polyphénols, qui peuvent affecter la glycémie par différents mécanismes, notamment l'inhibition de l'absorption du glucose dans l'intestin ou de son absorption par les tissus périphériques (**Viuda-Martos et al., 2010**).

I.6.1.2.6. Autres utilisations

Parmi les autres propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L.* on recense :

- ✓ Le traitement des problèmes dentaires, du dysfonctionnement érectile et de la protection contre les rayons ultraviolets (UV). Ainsi, avec ses applications possibles figurent l'ischémie cérébrale infantile, la maladie d'Alzheimer, la stérilité masculine, l'arthrite et l'obésité (**Jurenka, 2008**).
- ✓ Selon **Wang et al. (2010)**, parmi ses bioactivités la protection vasculaire qui contribue à la prévention des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires, ceci implique le processus d'anti-oxydation, d'anti-hypertension et la régulation lipidique qui sont maintenues par l'intervention de la grenade.
- ✓ Il aide à contrôler les problèmes de vieillissement tels que les rides et facilite ainsi une peau jeune et éclatante. Autre que cela, il permet à une femme de surmonter son intervalle de dépression, en particulier de la ménopause (**Bhowmik et al., 2013**).
- ✓ Il a également été largement utilisé dans le traitement de l'asthme, de la bronchite, de la toux, des troubles de la coagulation, de la fièvre, du syndrome de déficit immunitaire acquis, de la dyspepsie, vaginite, et lésion cérébrale hypoxique-ischémique néonatale (**Prasad et Kunnaiah, 2014**).
- ✓ Une circulation sanguine saine peut être maintenue dans le corps en consommant ce fruit sous n'importe quelle forme. L'extrait de graine de grenade fournit du fer au sang et contribue ainsi à atténuer les symptômes anémiques, notamment la fatigue, la somnolence et la faiblesse, ainsi que la perte d'audition (**Bhowmik et al., 2013**).
- ✓ Un effet antipaludéen (Antimalaria) via une activité antiparasitaire et une inhibition de la réponse inflammatoire lors de l'apparition du paludisme cérébral (**Mehta et al., 2012**).
- ✓ La grenade réduit la probabilité d'avoir des prématurés et il est également bénéfique que les mères attendues évitent d'avoir des bébés de faible poids pendant la naissance (**Bhowmik et al., 2013**).
- ✓ Plus récemment, des recherches ont indiqué que les extraits de peaux de grenade inhibaient également l'activité de la tyrosinase, une enzyme qui induit la production de mélanine, ce qui entraîne une hyperpigmentation de la peau (**Mphahlele et al., 2016**).

I.6.2. Usage nutritionnel

En raison de ses bienfaits signalés pour la santé humaine, la grenade a suscité un grand intérêt de la part des consommateurs ces dernières années. De nos jours, la grenade est utilisée dans les ingrédients alimentaires fonctionnels et les suppléments diététiques sous différentes formes (**Wu et Li, 2017**):

- Fruits et jus frais.
- Capsules et comprimés en poudre contenant des extraits de différents tissus de grenade.
- Thé préparé à partir de feuilles de grenade.
- Confiture, gelée, jus et vin produits à partir de fruits de grenade.
- Des épices préparées à partir de graines séchées (**Wu et Li, 2017**).
- Pour la confection des arômes et de colorants dans les boissons (**Viuda-Martos et al., 2010**).

Le jus de la grenade apporte un caractère distinctif à des nombreux plats du Moyen-Orient et considéré en tant que contributeur pratique au régime alimentaire. Ses fruits étaient probablement d'une valeur inestimable pour les premiers voyageurs du désert, car ils constituaient une forme d'eau bien transportée et bien protégée (**Stover et Mercure, 2007**).

Les grenades sont des aliments d'hiver parfaits, riches en fibres et classés parmi les fruits les plus sains. Elles peuvent être utilisées dans les salades, les entrées, les soupes et les desserts. Ce fruit a été considéré comme le meilleur comparant au thé vert en raison de son potentiel antioxydant (**Qamar Abbas et al., 2018**). Il ne présente aucun effet toxique sur le foie et d'autres organes et peut être utilisé comme complément naturel (**Qamar Abbas et al., 2018**).

I.6.3. Autres usages

Il est clair que l'utilisation "non alimentaire" la plus répandue du grenadier est destinée à l'esthétique visuelle. Plusieurs formes de plantes ornementales ont déjà été évoquées et sont largement répandues dans l'industrie des pépinières où la grenade est adaptée (**Stover et Mercure, 2007**). Cette plante peut pousser comme arbre d'ornement dans les parcs et les jardins, et comme super avantage il est tolérant à la sécheresse et peut survivre dans les zones sèches (**Qamar Abbas et al., 2018**).

De plus, grâce à sa richesse en tanins, l'écorce de fruit et de la tige du grenadier sont également utilisées depuis toujours dans la tannerie pour la fabrication du cuir (**Wu et Li,**

2017). Des extraits de fleurs et de cosses de fruits ont été utilisés comme colorants pour les textiles (**Stover et Mercure, 2007**).

Chapitre II: Phytothérapie et Plantes Médicinales

II. 1. Phytothérapie

II. 1.1. Définition

Le mot phytothérapie vient du grec « *phytos* » qui signifie plante et « *therapeuo* » qui signifie soigner. La phytothérapie est définie comme l'application thérapeutique des plantes, en tout ou partie (fleur, feuille, tige, racine) ou sous forme d'extrait (décoction, distillat, huile essentielle) (**Laccourreye et al., 2017**).

La phytothérapie compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité. C'est ainsi que les êtres humains utilisent des plantes depuis des siècles voire des millénaires à des fins thérapeutiques sur l'ensemble de notre planète, ce qui a permis aux hommes de générer au cours des siècles un large savoir et une immense expérience dans leur utilisation (**Meier et al., 2013**).

L'ingestion humaine de produits végétaux peut être envisagée selon deux grands axes:

- * une vision holistique de l'effet des plantes sur l'individu dans son ensemble selon le point de vue de l'herboriste.

- * une vision plus scientifique centrée sur l'action des plantes sur les maladies, les symptômes et la recherche des molécules actives, qui est le point de vue du phytothérapeute (**Laccourreye et al., 2017**).

II.1.2. Historique et évolution

Il y a 60 000 ans, l'homme de Neandertal utilisant les plantes et les chamans ont joué un rôle important dans la collection, l'apprentissage à l'utilisation et la transmission de la connaissance des plantes. Les plantes étaient employées largement dans l'alimentation, la gestion de certaines maladies et aussi pour atteindre un monde plus spirituel (**Létard et al., 2015**).

Toutefois, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Mais, certainement c'est l'expérience qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre (**Iserin, 2001**).

Les Grecs avec Hippocrate, Aristote, Théophraste, Galien, Dioscoride et les Romains ont enseigné l'art de traiter par les plantes en colligeant les connaissances avec plus de 500 plantes médicinales répertoriées (**Létard et al., 2015**).

En 529, le pape Grégoire le Grand interdit l'enseignement en France de la médecine par les plantes et ce n'est qu'aux alentours du début du IXe siècle que le Moyen-Orient, l'Afrique du nord et l'Espagne avec l'université de Cordoue ont repris l'enseignement de ces connaissances, puis Avicenne (980-1037) distilla les premières huiles essentielles (**Létard et al., 2015**).

Historiquement parlant, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIXe siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire comme elles le sont actuellement dans l'arsenal de la médecine classique (**Meier et al., 2013**).

Actuellement, certaines civilisations (chinoise, ayurvédique, arabe, tibétaine, indienne...) sont encore fondées sur ces systèmes thérapeutiques ancestraux, moins onéreux (**Létard et al., 2015**).

II.1.3. Niveaux d'utilisation

II.1.3.1. Traditionnel

A ce niveau, les bases des pratiques thérapeutiques des plantes sont fondées uniquement sur l'empirisme et l'expérience pratique que l'on peut qualifier de «Phytothérapie traditionnelle» (**Meier et al., 2013**), qui dépend à une observation globale et holistique, ceci entraîne des limites de l'utilisation de la plante médicinale à un niveau traditionnel, en raison de l'insuffisance des connaissances aussi bien médicales (physiologiques, physiopathologiques, cliniques) que pharmacologiques (**Carillon, 2009**).

II.1.3.2. Pharmacologique

L'étude de la plante médicinale dans un cadre scientifique et pharmacologique est devenue nécessaire. Celui-ci a permis, grâce à des démonstrations expérimentales *in vitro* ou *in vivo*, de démontrer l'activité et les propriétés des extraits totaux de la plante ou de certains de ses constituants (principes actifs), et puis d'étudier les formes galéniques (formes d'extraction et d'administration) les mieux adaptées (**Carillon, 2009**).

A ce stade, se posent les problèmes liés à la multiplicité et à la complexité des constituants de la plante médicinale, à la difficulté de standardisation du produit qui

rendent son étude pharmacologique difficile, mais aussi ceux liés à l'obtention de résultats expérimentaux paradoxaux (**Carillon, 2009**).

II.1.3.3. Clinique

La phytothérapie Clinique prend en compte l'individu qui reçoit le traitement, avec sa réalité et sa réactivité fonctionnelle physiologique et biologique spécifique. Elle intègre de ce fait l'étude de la plante médicinale dans une physiologie du vivant, de l'individu, avec ses notions fondamentales de dynamique, d'interrelation, de relativité et de globalité (**Carillon, 2009**).

II.1.4. Les avantages de la phytothérapie

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages :

* En général le corps humain est bien mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapeutique exclusivement chimique. Il est habitué à consommer et à digérer différentes espèces de plantes qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives (**Iserin, 2001**).

* Les préparations à base de plantes, en raison de la complexité de leur composition, ont l'avantage de produire leur effet non seulement sur un mécanisme d'action isolé mais d'interagir avec de nombreuses structures biochimiques (**Iserin, 2001; Meieret al., 2013**). Par conséquent, comparé à une préparation synthétique, le spectre de l'efficacité de l'extrait phytothérapeutique est plus large et multiple et ses effets secondaires indésirables sont significativement plus rares et moins prononcés (**Meier et al., 2013**).

* Actuellement, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Iserin, 2001**). De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Iserin, 2001**).

* L'industrie des produits chimiques destinés à la production des médicaments cause des problèmes de pollutions à différents niveaux, tant que la phytothérapie est facile à maîtriser tout en protégeant notre environnement naturel (**Iserin, 2001**).

II.1.5. La place de la phytothérapie

De nos jours, le terme «médecine alternative» est devenu très courant dans la culture occidentale, il se concentre sur l'idée d'utiliser les plantes à des fins médicinales (**Rasool Hassan, 2012**). L'OMS encourage depuis 1976 l'utilisation de traitements de substitution faisant partie des connaissances techniques de la médecine occidentale. Selon l'OMS, environ 85% de la population mondiale utilise des médicaments phytothérapeutiques à des fins thérapeutiques (**Magalhães et al., 2014**).

Il existe actuellement une multitude d'études cliniques avec des préparations à base de plantes, et parmi elles une étude plus récente prouve la qualité de 89 études phytothérapeutiques (comparées en «matched-pair») était tendanciellement même plutôt meilleure que celles où des préparations synthétiques étaient utilisées dans une même indication. En outre il existe plusieurs monographies des plantes médicinales publiées et reconnues par différents organes officiels (**Meier et al., 2013**).

II.2. Les Plantes Médicinales

Il ya environ 500000 plantes sur terre ; 10000 d'entre elles environ, possèdent des propriétés médicinales en raison de leur richesse en principes actifs, qui agissent directement sur l'organisme (**Iserin, 2001**). La Phytothérapie utilise les plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques (**Meier et al., 2013**).

En effet, le terme de plantes médicinales inclut différents types de plantes utilisées en herboristerie et certaines de ces plantes ont une activité médicinale. Ces plantes médicinales sont considérées comme une richesse en ingrédients pouvant être utilisés dans le développement et la synthèse de médicaments (**Rasool Hassan, 2012**).

Les plantes, lorsqu'elles sont utilisées en traitement, présentent de nombreuses caractéristiques:

- * Médecine synergique : tous les ingrédients des plantes interagissent simultanément, de sorte que leurs utilisations peuvent compléter ou endommager les autres ou neutraliser leurs éventuels effets négatifs.
- * Prise en charge de la médecine officielle : dans le traitement de cas complexes tels que les cancers, les composants des plantes se sont révélés très efficaces.
- * Médecine préventive : il a été prouvé que le composant des plantes se caractérise également par sa capacité à prévenir l'apparition de certaines maladies. Cela contribuera à réduire l'utilisation des remèdes chimiques qui seront utilisés lorsque la maladie est déjà

présente, c'est-à-dire à réduire l'effet secondaire du traitement synthétique (**Rasool Hassan, 2012**).

Il est important de mentionner que les «plantes médicinales» ne sont ni des phytomédicaments, ni des phytothérapeutiques. Ce dernier, une fois classé comme médicament, est soumis aux normes éthiques définies par OMS. Même s'il existe encore des divergences entre les définitions de phytothérapeutique et de plantes médicinales, ces termes sont souvent utilisés comme synonymes. Par conséquent, on peut dire que les médicaments phytothérapeutiques sont composés de plantes médicinales (presque complètement), mais toutes les plantes médicinales ne peuvent pas être considérées comme phytothérapeutiques (**Magalhães et al., 2014**).

II.2.1. Action des plantes médicinales

Le champ d'action des plantes médicinales est vaste et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter divers cas (**Iserin, 2001**).

Outre, l'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, dans lesquelles leurs effets varient en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a la mise au point de médicaments essentiels (**Ameh et al., 2010**). Cependant, s'il est capital de maîtriser l'action des différents principes actifs après isolément, la phytothérapie, à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi «totum» plutôt que des extraits obtenus en laboratoire (**Iserin, 2001**). L'utilisation du totum de la plante, en tant que telle ou dans son mode d'extraction (forme galénique) avec les notions de synergie et de potentialisation, permet d'utiliser des doses moindres qu'avec un principe actif isolé pour un même niveau d'activité, évitant ainsi les effets secondaires spécifiques des fortes doses (notions de biodisponibilité) (**Carillon, 2009**).

Donc, c'est la complexité, la multiplicité et la complémentarité des différents constituants et principes actifs de la plante médicinale, qui ont conduit à l'insuffisance d'expliquer comment elle agit (**Iserin, 2001.; Meier et al., 2013**). Ainsi, des chercheurs ont démontré que les principes actifs de nombreux végétaux, agissent de manière complexe et combinée, lesquelles en synergie donnent l'effet thérapeutique voulu (**Iserin, 2001; Meier et al., 2013**). Par conséquent, comparé à une préparation synthétique, le spectre d'efficacité de l'extrait phytothérapeutique est plus large et multiple et ses effets secondaires indésirables sont significativement plus rares et moins prononcés (**Meier et al., 2013**).

II.2.2. Les principes actifs des plantes médicinales

Le terme "principe actif" désigne la substance chimique intrinsèque qui induit une activité pharmacologique (Capasso *et al.*, 2003). Un grand nombre de principes actifs, qui ont aujourd'hui de l'importance, proviennent de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base (Meier *et al.*, 2013).

Les principes actifs des plantes sont principalement formés pendant la période de croissance, lorsque la transformation métabolique est maximale. Le principe actif peut être représenté par des constituants cellulaires primaires (protéines, lipides, polysaccharides), par des métabolites intermédiaires (acides organiques) et par des constituants cellulaires secondaires (alcaloïdes, glycosides, flavonoïdes, saponines, tanins, essences, etc.). C'est ce dernier qui contient les principes actifs les plus intéressants d'un point de vue pharmacologique (Capasso *et al.*, 2003).

Selon Iserin (2001), les éléments actifs des plantes, qui sont l'origine des actions thérapeutiques sont : les phénols, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins, les anthocyanes, les coumarines, les saponines, les glucosides cardiaques, les glucosides cyanogéniques, les polysaccharides, les glucosinolates, les substances ambres, les alcaloïdes, les vitamines et les minéraux. En effet, ces métabolites secondaires des plantes sont mieux appelés phytochimiques, qui sont utiles en médecine et appartiennent à un nombre relativement restreint de grands groupes, mais remplissent plusieurs fonctions (Ameh *et al.*, 2010).

II.2.3. Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie

Les modes d'utilisation des plantes sont divers selon qu'elles sont prescrites : par voie interne (absorption orale, gargarisme, bains de bouche), ou externe (cataplasme, lotion, gargarisme, bain de bouche, bain, injection cavités naturelles, fumigation) (Létard *et al.*, 2015). Les principes d'extraction des éléments actifs les plus fréquemment employés sont :

- **L'infusion** qui utilise l'eau, laquelle solubilise les sels minéraux, pectines, mucilages et alcaloïdes à l'état de sels. L'eau chaude solubilise partiellement les huiles essentielles. Elle permet l'extraction des principes actifs par mise en contact de l'eau chaude avec des feuilles ou des fleurs sèches ou fraîches (Létard *et al.*, 2015) pour obtenir des remèdes ou des boissons fortifiantes ou calmantes (Iserin, 2001).

- **La décoction** qui permet d'extraire les principes actifs des racines, de l'écorce, des tiges et des baies. Elle consiste à faire bouillir les plantes dans l'eau et le temps d'ébullition est de 10 à 30 mn en général (**Iserin, 2001; Létard et al., 2015**).
- **La fumigation** est l'utilisation des vapeurs ou fumées de l'ébullition des plantes ou de leur combustion (**Létard et al., 2015**).
- **La teinture** est obtenue en laissant macérer 3 semaines les plantes dans de l'alcool à 95° (éthanol) avec décantation, pression et filtrage. On peut utiliser du vin (vin de gentiane) ou de l'huile (huile de serpolet) à la place de l'alcool dans certains cas (**Létard et al., 2015**). Les teintures sont plus efficaces que les infusions ou les décoctions. D'un emploi simple, elles se conservent pendant deux ans (**Iserin, 2001**).
- **Les extraits fluides** classiques ou glycéринés sont obtenus par extraction des principes actifs dans des mélanges successifs aux concentrations d'alcool croissantes, puis ils sont remis ou pas dans une solution neutre glycéринée (**Létard et al., 2015**).
- **Les huiles essentielles** sont obtenues par distillation d'une plante dans de l'eau ou par entraînement à la vapeur d'eau. Elles contiennent une concentration très élevée de principe actif comparé à la plante fraîche mais ne contiennent pas le totum de la plante (**Létard et al., 2015**).
- **La gélule** est une forme récente de prise d'un traitement phytothérapique avec des enveloppes 100% végétales. Elle permet une haute concentration de produits actifs avec des poudres micronisées ou des nébulisats. La quantité de plante dans une gélule est limitée à 500/750 mg de plante séchée, ce qui peut nécessiter la prise d'un nombre important de gélules (**Létard et al., 2015**).
- **Les poudres** sont obtenues par séchage et broyage. La plante entière se conserve très bien après dessiccation car la cellule végétale est adaptée à la carence en eau, le broyage quant à lui est susceptible d'altérer la stabilité des principes actifs dans le temps. La qualité du broyage est un élément important pour avoir une poudre de qualité la plus fine possible (**Létard et al., 2015**).

Outre, on rencontre des autres préparations des remèdes naturels en phytothérapie :

- **Les sirops** : en faisant cuire à feu doux un mélange d'infusion ou de décoction et de miel ou de sucre non raffiné en quantités égales. La saveur sucrée des sirops permet de masquer le mauvais goût. Il faut presser la plante pour recueillir le plus de liquide possible. (**Iserin, 2001**).

- **Les onguents** qui sont des préparations d'aspect crémeux, réalisées à base d'huile ou de tout autre corps gras, ils comprennent des constituants médicinaux actifs tels que les huiles essentielles. Les onguents sont efficaces contre les hémorroïdes, les gerçures des lèvres ou l'érythème fessier du nourrisson (**Iserin, 2001**).
- **Les cataplasmes** sont des préparations de plantes appliquées sur la peau. Ils calment les douleurs musculaires et les névralgies, soulagent les entorses et les fractures et permettent d'extraire le pus des plaies infectées, des ulcères et des furoncles (**Iserin, 2001**).
- **Les crèmes** : on prépare une crème en associant de l'huile ou un autre corps gras à de l'eau par un processus d'émulsion. Contrairement aux onguents, les crèmes pénètrent dans l'épiderme. Elles ont une action adoucissante, tout en laissant la peau respirer et transpirer naturellement (**Iserin, 2001**).
- **Lotions et compresses** : les lotions sont des préparations à base d'eau et de plantes - infusions, décoctions ou teintures diluées - dont on tamponne l'épiderme aux endroits irrités ou enflammés. Les compresses sont des linges imbibés de lotion que l'on applique sur la peau. Les lotions et les compresses contribuent à soulager les gonflements, les contusions et les douleurs, à calmer les inflammations et maux de tête, et à faire tomber la fièvre (**Iserin, 2001**).

II.2.4. Des précautions d'utilisation

Comme tous les médicaments, les plantes médicinales doivent être employées avec précaution. Il est recommandé de n'utiliser une plante que sur les conseils d'un spécialiste (**Iserin, 2001**).

Alors, il est primordial de noter que de nombreux effets secondaires indésirables, dont certains très graves, ont été attribués à certaines espèces. Certains effets indésirables, tels que réactions allergiques, mutations, intoxication, tératogénèse, carcinogénèse et interactions médicamenteuses, peuvent survenir si l'utilisation de la plante phytothérapeutique ou médicinale n'est pas limitée (**Magalhães et al., 2014**).

De ce fait, il faut éviter de récolter des plantes de manière sauvage. La plante désirée au traitement doit correctement être identifiée et il est important d'employer la bonne partie de la plante, et respecter les conditions de conservation (**Iserin, 2001**). Toutefois, lorsqu'un

traitement à base de plantes est suivi correctement, les risques d'effets secondaires sont fort limités (**Iserin, 2001**).

Chapitre III : Les Métabolites Secondaires

III.1. Généralités

Les métabolites secondaires constituent un groupe extrêmement diversifié de produits naturels synthétisés par les plantes, les champignons, les bactéries, les algues et les animaux. Différentes classes de ces composés constituent le composé bioactif dans plusieurs plantes médicinales, aromatiques, colorants et épices et / ou aliments fonctionnels (Agostini-Costa *et al.*, 2012).

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires (Raven *et al.*, 2014). À partir du métabolisme primaire, les plantes ont développé un réseau de voies de synthèse secondaires produisant un grand nombre de substances secondaires (Calatayud *et al.*, 2013). Chaque famille de plantes, genre et espèce produit un mélange caractéristique de ces produits chimiques, qui peuvent parfois être utilisés comme caractères taxonomiques dans la classification des plantes (Kabera *et al.*, 2014).

Bien que les métabolites secondaires sont des molécules organiques qui ne participent pas à la croissance et aux développements normaux d'un organisme (Agostini-Costa *et al.*, 2012; Anulika *et al.*, 2016), les métabolites primaires (tels que les acides nucléiques, les acides aminés, les glucides, les lipides...etc.) jouent un rôle clé dans la survie de l'espèce et jouent un rôle actif dans la photosynthèse et la respiration (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Le métabolite secondaire de la plante peut être trouvé dans les feuilles, la tige, la racine ou l'écorce de la plante, selon le type de métabolite secondaire produit (Anulika *et al.*, 2016).

L'utilité de ces substances pour les plantes n'est pas clairement connue, on pense que certaines d'entre elles repoussent les prédateurs et/ou les compétiteurs (Raven *et al.*, 2014). Alors que certaines sont des toxines, utilisées pour dissuader la prédation; ou des phéromones, utilisées pour attirer les insectes pour la pollinisation; d'autres sont des phytoalexines, qui protègent contre les infections microbiennes (Ameh *et al.*, 2010 ; Mazid *et al.*, 2011), ou sont également impliqués dans la défense contre le stress abiotique et la communication des plantes avec d'autres organismes (Mazid *et al.*, 2011).

III.2. Occurrence des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont réputés depuis l'Antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques, et depuis quelques décennies l'homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques (**Najjaa et al., 2011**).

Tandis que, les chimistes du secteur des produits pharmaceutiques organiques s'intéressent depuis longtemps à ces nouveaux composés phytochimiques, et étudient leurs propriétés chimiques de manière approfondie, dont l'intérêt pour ces composés bioactifs n'était pas purement théorique, mais était plutôt motivé par leur grande utilité en tant que colorants, polymères, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, parfums et médicaments (**Jimenez-Garcia et al., 2013**).

Toutefois, l'importance de ces substances n'a été découverte que récemment par des scientifiques. Notamment, ils effectuent un certain nombre de fonctions de protection dans le corps humain, il peut renforcer le système immunitaire, protéger le corps contre les radicaux libres, tuer les germes pathogènes et bien plus encore garder le corps en forme (**Anulika et al., 2016**).

En effet, le défi actuel de la pharmacologie consiste à décrire et à comprendre la diversité de ces composés, leurs modes d'action seuls ou en combinaisons naturelles, comme dans les plantes. Une autre tâche intéressante consiste à déterminer quelles plantes ont été utilisées dans les systèmes de médecine traditionnelle du monde entier, à explorer leur phytochimie et à expliquer si et comment leur métabolites secondaires pourrait contribuer aux activités pharmacologiques enregistrées (**Wink, 2015**).

Notamment, l'utilisation de techniques analytiques modernes telles que la chromatographie, l'électrophorèse, les techniques isotopiques et l'enzymologie a permis d'élucider des formules structurales exactes et les principales voies de biosynthèse (**Kabera et al., 2014**).

Actuellement, un grand nombre de ces métabolites secondaires sont extraits de plantes et sont utilisés en médecine moderne en tant qu'entités chimiques ayant des applications établies (**Wink, 2015**).

III.3. Classification et biosynthèse

Contrairement aux produits du métabolisme primaire, qui sont communs à toutes les plantes, le profil chimique des composés secondaires varie énormément et est considéré comme résultant des pressions évolutives auxquelles sont soumises les différentes espèces de plantes (**Calatayud et al., 2013**).

Dans la plupart des références, il est indiqué que les métabolites secondaires extraits de plantes sont subdivisés en trois classes principales: les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Les glycosides, les tannins et les saponines en font partie selon leur structure spécifique (**Kabera et al., 2014**).

Cependant, on peut aussi les classes généralement en deux groupes selon la voie de biosynthèse, les composés phénoliques d'un côté et les composés azotés comme les alcaloïdes, les glycosides et les terpénoïdes de l'autre côté (**Agostini-Costa et al., 2012 ; Calatayud et al., 2013**). La biosynthèse des trois différentes classes de métabolites secondaires varie en fonction de la classe concernée (**Anulika et al., 2016**). Les éléments de base importants employés dans la biosynthèse de ces métabolites sont dérivés de l'acétyl-CoA (acétyl-coenzyme A), de l'acide shikimique, de l'acide mévalonique et du 1-désoxylulose 5-phosphate (**Kabera et al., 2014**). Des études ont démontré que les terpènes sont synthétisés par la voie mévalonique à partir le précurseur l'acétyl-CoA, tandis que les composés phénoliques sont des substances aromatiques formées par la voie de l'acide shikimique ou de la voie mévalonique. Les métabolites secondaires contenant de l'azote, tels que les alcaloïdes, sont synthétisés principalement à partir d'acides aminés aliphatiques dérivés de la voie de l'acide tricarboxilique ou d'acides aromatiques dérivés de la voie d'acide shikimique, via l'acide acétyl-CoA, l'acide mévalonique (**Jimenez-Garcia et al., 2013 ; Anulika et al., 2016**).

Ces métabolites sont classés en trois grands groupes :

III.3.1. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent la classe la plus variée de produits naturels à base de plantes. Le terme terpénoïde, ou terpène, vient du fait que les premiers membres de la classe ont été isolés de la térébenthine («terpentin» en allemand) (**Croteau et al., 2000**). Les stéroïdes, les caroténoïdes et l'acide gibbérélique ne sont que quelques-uns de ses membres. Les terpénoïdes sont les composés actifs les importants avec plus de 23 000 structures connues (**Kabera et al., 2014**). Ils sont lipophiles et interagissent facilement avec les biomembranes et les protéines membranaires (**Wink, 2015**).

Le terpénoïde le plus simple est un hydrocarbure, l'isoprène (C₅H₈) (Figure n°3). Les terpénoïdes sont composés d'unités isoprène et comprennent les huiles essentielles, le taxol, le caoutchouc et les glycosides cardiotoniques (**Raven et al., 2014**).

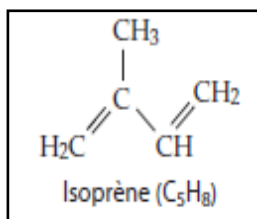


Figure n°3 : Structure de l'isoprène (Raven *et al.*, 2014).

Une grande majorité des différentes structures de terpènes sont supposées être impliquées dans la défense en tant que toxines et dissuasives pour l'alimentation d'un grand nombre d'insectes et de mammifères se nourrissant des plantes (Mazid *et al.*, 2011; Anulika *et al.*, 2016). De plus, les terpènes et leurs produits d'oxydation sont les principaux composants des huiles essentielles de plantes largement utilisées comme colorants alimentaires et aromatisants; et comme parfums en parfumerie et comme agents d'aromathérapie (Ameah *et al.*, 2010). Il est prouvé que les terpènes ont de grandes activités biologiques telles que: anti-cancers, anti-micro-organismes et anti-inflammatoires (Jimenez-Garcia *et al.*, 2013).

Tous les terpénoïdes sont synthétisés par condensation d'unités d'isoprène (C₅) (Agostini-Costa *et al.*, 2012), dont la plus part répondent à la formule générale (C₅H₈)_n. Ils peuvent être classés sur la base de la valeur de n ou du nombre d'atomes de carbone présents dans la structure (Mondal, 2018), comme indique le tableau suivant:

Tableau 01: Classification des terpénoïdes (Mondal, 2018).

la valeur de “n”	Nbr d'atomes de carbone	Classes	Formule moléculaire
1	5	Hémitepène ou isoprène	C ₅ H ₈
2	10	Monoterpènes	C ₁₀ H ₁₆
3	15	sesquiterpènes	C ₁₅ H ₂₄
4	20	diterpènes	C ₂₀ H ₃₂
5	25	Sesterpènes	C ₂₅ H ₄₀
6	30	Triterpènes	C ₃₀ H ₄₈
8	40	Tetraterpènes	C ₄₀ H ₆₄
> 8	> 40	Polyternènes	(C ₅ H ₈) _n

III.3.2. Les composés phénoliques

III.2.3.1. Définition

Les composés phénoliques constituent une grande classe chimique. Ces métabolites secondaires des végétaux disposent d'une extrême variété de structures et d'activités biologiques (**Bouayed et al., 2008**). Ils sont présents dans la plupart des médicaments utilisés en phytothérapie (**Wink, 2015**). On les trouve dans presque toutes les plantes (**Calatayud et al., 2013 ; Raven et al., 2014**), et l'on sait qu'ils s'accumulent dans toutes les parties de l'organisme (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits) (**Raven et al., 2014**).

Le terme «phénolique» ou «polyphénolique» peut être défini chimiquement avec précision comme une substance possédant un cycle aromatique portant un ou plusieurs substituant hydroxyle (phénol) (polyphénol), y compris des dérivés fonctionnels (esters, méthyléthers, glycosides, etc.) et la plupart montrent des activités oestrogéniques (**Jimenez-Garcia et al., 2013**). Cependant, les composés phénoliques des végétaux sont un composé chimiquement hétérogène, dont certains ne sont solubles que dans des solvants organiques, certains sont solubles dans l'eau, d'autres sont des polymères insolubles (**Anulika et al., 2016**).

En addition, ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (**Edeas, 2007**). C'est une classe constituée d'environ 8 000 composés, divisés en plusieurs catégories (**Hennebelle et al., 2004 ; Edeas, 2007**), les plus présentés sont le phénylpropanoïde simple, les dérivés d'acide benzoïque, l'anthocyanine, les isoflavones, les tannins, la lignine et les flavonoïdes à partir de phénylalanines (**Anulika et al., 2016**).

Bien qu'il soit le groupe le plus étudié de métabolites secondaires, la fonction de beaucoup de produits phénoliques reste encore inconnue (**Raven et al., 2014**). En revanche, les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections...) (**Edeas, 2007**). Ils sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires. Ils renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydant et préviendraient ainsi diverses maladies chroniques. L'effet protecteur des fruits et légumes est sans doute très lié à la présence des très nombreux polyphénols présents dans ces aliments (**Edeas, 2007**). Ils sont également

utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Chira *et al.*, 2008).

III.2.3.2. Structure et classification

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tannins complexes de très haut poids moléculaire (Tableau 02), et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Chira *et al.*, 2008).

Tandis que, ils peuvent être largement divisés en composés non solubles tels que les tanins condensés, les lignines et les acides hydroxycinnamiques liés aux parois cellulaires, et les composés phénoliques solubles tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les quinones (Jimenez-Garcia *et al.*, 2013).

Tableau 02: Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ C ₁	Acides hydroxybensoïques	<i>p</i> -hydroxybensoïque	Epices, fraise
C ₆ C ₃	Acides hydroxycinnamiques Caumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, ésculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C ₆ C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ - C ₆	Stilbènes	Resrvératrol	Vigne
C ₆ -C ₂ - C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéthine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Cirtus Soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pénorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅) _n	Tannins		Raisin rouge, kaki

III.2.3.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques (C6-C1) sont généralement représentés par les acides galliques, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et syringique. Les acides phénoliques sont généralement présents sous la forme soluble liée, conjuguée à des sucres ou à des acides organiques, et sont généralement des composants de structures complexes telles que les lignines. Les acides phénoliques libres et liés se trouvent dans les céréales. Les glycosides d'acide hydroxybenzoïque sont également caractéristiques de certaines herbes et épices. Des aldéhydes liés aux acides C6-C1 sont également présents dans les plantes (**Lattanzio, 2013**).

Les acides phénoliques, tels que les acides gallique et caféique, se trouvent dans la laitue et le chou; acides vanilliques et cinnamiques dans les oignons, le persil et les épinards; tandis que l'acide coumarique dans les tomates, les carottes et l'ail (**Jimenez-Garcia et al., 2013**).

III.2.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe important et diversifié de métabolites secondaires des plantes polyphénoliques (**Jimenez-Garcia et al., 2013**). La structure de base contient 15 atomes de carbone disposés en deux cycles aromatiques reliés par un pont à trois atomes de carbone. La fonction de base des flavonoïdes est la pigmentation et la défense. Les couleurs rouge, rose, violet et bleu observées dans les parties de la plante résultent de l'anthocyanine (**Anulika et al., 2016**).

Ils sont normalement associés à un sucre pour former un glycoside soluble dans l'eau et sont stockés dans les vacuoles des cellules végétales. On distingue les flavones (la lutéoline, etc.), les flavanones (la naringénine...), les flavonols (le kaempférol...), les anthocyanes et les chalcones (**Calatayud et al., 2013**). Les flavonoïdes sont eux-mêmes classés en fonction de leur degré d'oxydation en 6 grandes classes (Tableau 03) (**Edeas, 2007**).

Tableau 03 : Classification des flavonoïdes (Edeas, 2007).

Classes	Molécules
Flavanols	Catéchine
Anthocyanidines	Cyanidine, pélagonidine
Flavones	Apigénine, diosmine, lutéoline
Flavanones	Naringénine, naringine, hespérétine, hespérédine
Chalcones	Phlorétine, phloridzine
Flavonols	Quercétine, kaempférol, myricétine, fisétine, morine

Ces différents sous-groupes sont subdivisés en fonction du carbone du cycle C auquel le cycle B est attaché et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C. La structure squelettique de base des flavonoïdes et de leurs classes est représentée dans la figure suivante:

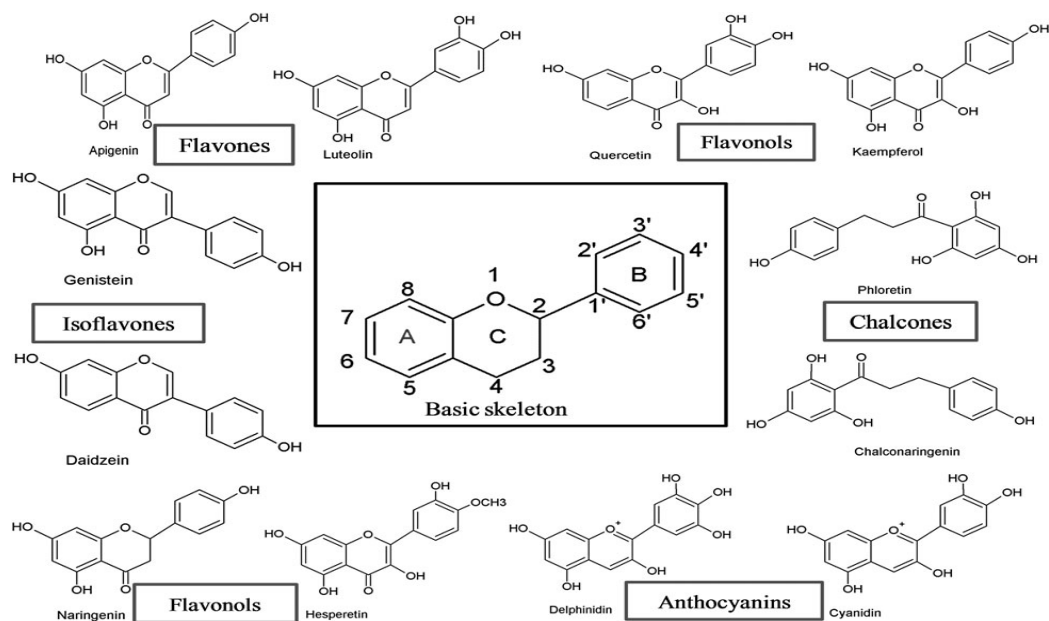


Figure n°4 : Structure squelettique de base des flavonoïdes et de leurs classes (Panche et al., 2016).

Les flavonoïdes ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Ce sont des antioxydants, et ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie (Iserin, 2001).

III.2.3.2.3. Les tannins

Le nom "tanin" est dérivé du français "tannin" (substance bronzante) et est utilisé pour une gamme de polyphénols naturels (**Lattanzio, 2013 ; Kabera et al., 2014**). Les tannins sont des métabolites secondaires de certaines plantes terrestres vasculaires. On les rencontre dans toutes les parties du végétal (racine, écorce, feuilles, enveloppe des graines, liège, fruits non mûrs, galles, etc.). Ce sont des molécules de nature phénolique (polyphénols hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 kDa) (**Brillouet et al., 2013**)

Outre leurs propriétés phénoliques habituelles, ils possèdent des propriétés spéciales telles que leur aptitude à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les d'autres protéines (**Lattanzio, 2013**). Ils sont capables de se complexer fortement avec les glucides, les protéines, l'amidon, la cellulose et les minéraux. Ils sont composés d'un groupe très divers d'oligomères et de polymères (**Kabera et al., 2014**).

Toutes les plantes contiennent des tannins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail (**Iserin, 2001 ; Ravenet et al., 2014**). Les tannins sont généralement divisés en deux groupes: les tannins hydrolysables (comprenant des gallotannins et des ellagitannins) et des tannins complexes, également appelé tannins condensés (**Calatayud et al., 2013 ; Kabera et al., 2014**).

- **Les tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables sont des esters de sucre simple (glucose ou xylose principalement) et d'acides phénoliques. Par hydrolyse (acide, alcaline ou enzymatique), les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique ou l'acide éllagique, ce qui divise ces tannins hydrolysables en deux sous-classes: les tannins galliques (gallotannins) et les tannins ellagiques (ellagitannins) (**Zimmer et Cordesse, 1996**).

- **Les tannins condensés**

Les tannins condensés (ou proanthocyanidines) sont des polymères d'unités flavanniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Les précurseurs sont des flavan-3ols (catéchine et épicatechine) et flavan-3,4 diols (**Zimmer et Cordesse, 1996**).

En effet, les catéchines forment un

e classe spéciale de flavonoïdes, qui souvent dimérisent ou même polymérisent en procyanidines et procyanidines oligomères. Les conjugués (qui ne peuvent pas être

hydrolysés; «tannins non hydrolysables») sont caractérisés par un grand nombre de groupes hydroxyle. Les groupes hydroxyles phénoliques peuvent interagir avec les protéines pour former des liaisons hydrogène et ioniques et éventuellement même des liaisons covalentes. Si plus de 10 groupes hydroxyle sont présents, ces composés agissent comme des "tannins" (**Wink, 2015**).

En revanche, les tanins sont de puissants antioxydants ayant des activités anti-inflammatoires, antidiarrhéiques, cytotoxiques, antiparasitaires, antibactériennes, antifongiques et antivirales. Ils sont la drogue commune de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie moderne (**Wink, 2015**).

III.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont définis comme des composés basiques synthétisés par des organismes vivants contenant un ou plusieurs atomes d'azote hétérocycliques, dérivés d'acides aminés (à quelques exceptions près) et pharmacologiquement actifs. Le nom de classe est directement lié au fait que presque tous les alcaloïdes sont des composés basiques (alcalins) (**Agostini-Costa et al., 2012**).

Les alcaloïdes sont produits par les bactéries, les champignons, les animaux mais surtout par les plantes (**Kabera et al., 2014**). **Ces dernières produisent environ 12 000 alcaloïdes (Ameh et al., 2010 ; Agostini-Costa et al., 2012)**. La plupart d'entre eux sont très toxiques et peuvent donc jouer un rôle dans la défense chimique contre les herbivores et les micro-organismes (**Jimenez-Garcia et al., 2013**).

Les alcaloïdes ont toujours été d'un grand intérêt en raison de leurs propriétés physiologiques et médicinales prononcées (par exemple, la caféine, la nicotine, la morphine, l'atropine, la quinine). (**Jimenez-Garcia et al., 2013**).

Comparés à la plupart des autres classes de métabolites secondaires, les alcaloïdes se caractérisent par une grande diversité structurelle et leur classification n'est pas uniforme (**Kabera et al., 2014**). Bien que leurs structures contiennent un ou plusieurs atomes d'azote, ils sont formés soit dans une structure cyclique (véritables alcaloïdes), soit dans une chaîne latérale (pseudoalcaloïdes) (**wink, 2015**).

La plupart des alcaloïdes sont classés chimiquement en fonction du système cyclique contenant de l'azote (pyrrolidine, pipéridine, etc.) et de leur origine biosynthétique, des acides aminés, des amines, des alcalamides, des glycosides cyanogéniques et des glucosinolates (**Jimenez-Garcia et al., 2013**). Selon **Calatayud et al. (2013)**, il existe six classes d'alcaloïdes :

- **Les benzyloquinolines** (comme la papavérine, la berbérine, la morphine, les alcaloïdes de type curare).
- **Les tropanes** caractéristiques des Solanacées (comme l'atropine, la scopolamine) et d'une autre famille végétale à laquelle appartient la plante de coca (comme la cocaïne).
- **Les indoles** qui se caractérisent par la possession d'un noyau indole (comme la strychnine, la quinine) et sont répulsifs envers de nombreuses espèces d'insectes.
- **Les pyrrolizidines** sont des esters d'alcaloïdes dont la biosynthèse a été largement décrite chez les plantes du genre *Senecio* (Asteraceae) (comme la sénécionine).
- **Les quinolizidines**, dérivés de la lysine, encore appelés les alcaloïdes du lupin, car abondantes chez les plantes du genre *Lupinus* (Fabaceae). Certains d'entre eux polyhydroxylés miment stéréochimiquement les sucres et interfèrent avec les glycosidases ; ils agissent souvent comme phago-répulsifs pour divers insectes.
- **Les purines** (comme la caféine), les dérivés de l'acide nicotinique, de l'acide anthranilique et des polyacétates.

Partie II:

Matériels et méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

Chapitre I: Etude Phytochimique

I.1. Matériel végétal

Deux sortes des échantillons sont utilisées comme matériel végétal pour réaliser ce travail. L'un est les écorces du fruit de la grenade (*Punica granatum L.*), et l'autre sont les membranes internes de ce même fruit.

I.1.1. Récolte et séchage

La collecte des échantillons a été effectuée à partir des fruits cultivés dans la région de Metlili wilaya de Ghardaïa au cours de la période d'automne 2018.

Ensuite, les échantillons sont mis en séchage pendant une dizaine de jour, à l'abri de la lumière dans un endroit sec, et à l'air libre, la figure n° 5 montre l'aspect des deux échantillons utilisés après séchage.

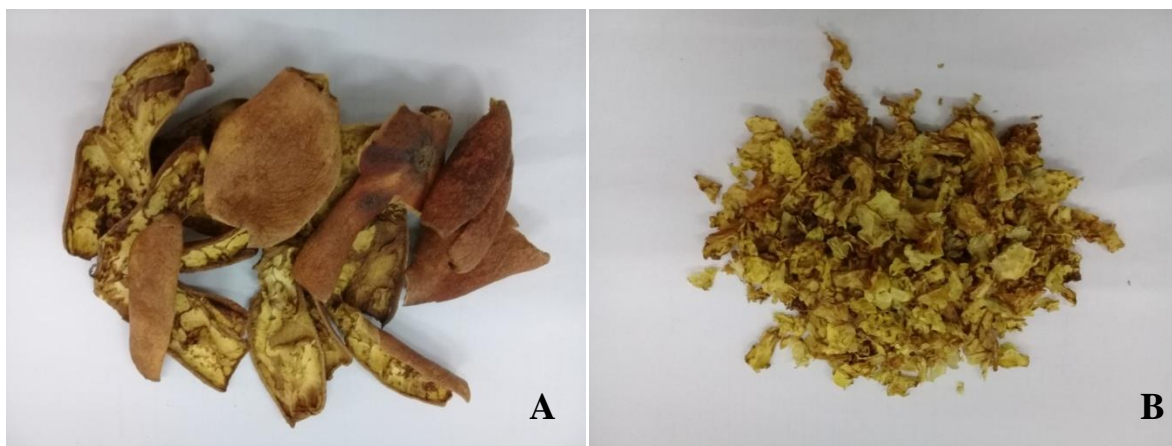


Figure n°5 : Photo des échantillons de grenade utilisés dans notre travail après séchage (A :écorces ; B : membranes internes)

I.1.2. Broyage

Tout d'abord le matériel végétal est débarrassé des impuretés et des débris indésirables puis chaque échantillon est broyé à l'aide d'un broyeur électrique (model M20) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

Les poudres obtenus sont conservés dans des flacons hermétiques en verre, à l'obscurité à fin préserver leurs qualité et notamment pour ne pas affecter leurs composés responsables de leurs éventuelles propriétés biologiques.

I.2. Méthodes d'analyse

1.2.1. Préparation des extraits

La méthode d'extraction effectuée pour préparer les extraits de grenade est la macération. Dans la quelle deux solvant sont utilisés à savoir l'eau distillée et un solvant hydro-éthanolique de 70% (v/v).Ceci permet d'obtenir quatre types des extraits qui sont étudiés dans cette partie expérimentale:

- 1- Extrait aqueux des écorces de grenade: **ÉCA**
- 2- Extrait hydro-éthanolique des écorces de grenade: **ÉCÉ.**
- 3- Extrait aqueux des membranes internes de grenade: **MRA.**
- 4- Extrait hydro-éthanolique des membranes internes de grenade: **MRÉ.**

- **Préparation des extraits aqueux**

5 g de chaque échantillon est mis dans un erlenmeyer, puis un volume de 100 ml d'eau distillée est ajouté. Le mélange est laissé en macération sous agitation pendant 24 h sur un agitateur magnétique. Les extraits sont par la suite filtrés à l'aide d'un papier filtre Whatman (N°1)(Figure n°9).

- **Préparation des extraits hydro-éthanolique de 70% (v/v)**

5 g de chaque échantillon est mis dans un erlenmeyer, puis 100 ml du solvant hydro-éthanolique (un mélange de 70 ml d'éthanol et 30 ml d'eau distillée) est ajouté. Le mélange est laissé en macération sous agitation pendant 24 h sur un agitateur magnétique. Les extraits sont ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre Whatman(N°1)(Figure n°6).

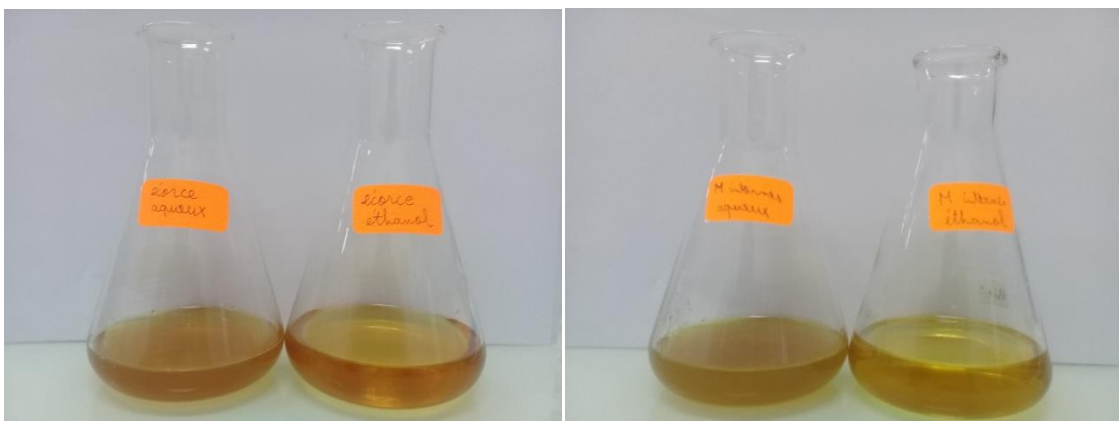


Figure n°6 : Photos des extraits filtrés après macération.

Les quatre types des filtrats obtenus sont mis en évaporation à l'aide d'un rotavapeur (Heidolph) à 45 °C, l'évaporation s'arrête de sorte qu'on laisse qu'un petit volume (3 à 5 ml)

pour le séchage à l'air libre. L'extrait sec obtenu (les extraits bruts) a été gratté et pesé pour déterminer le rendement puis conservé dans un congélateur à 4°C jusqu'aux analyses ultérieures. Les différentes étapes du protocole expérimental sont résumées dans la Figure 07:

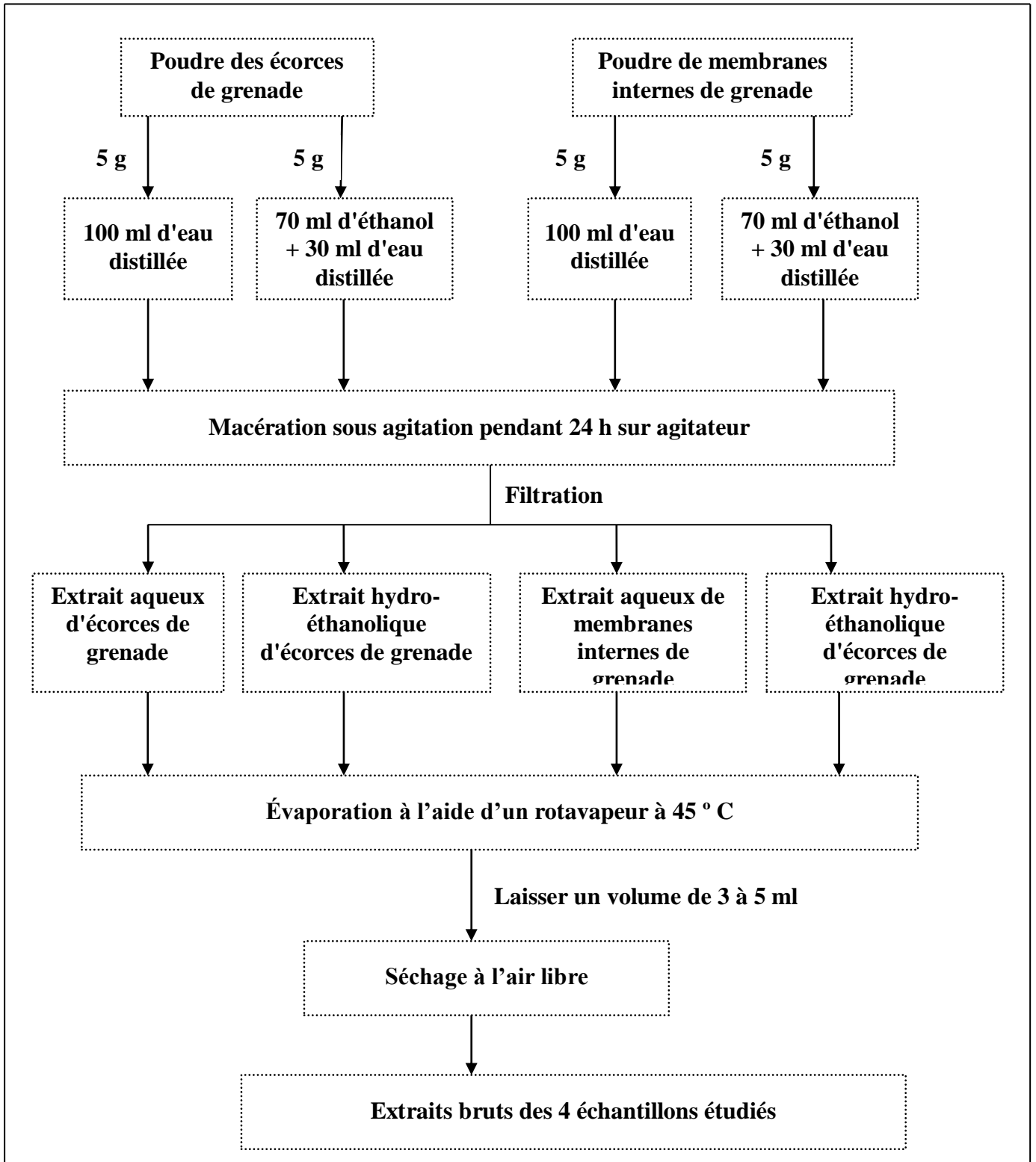


Figure n°7 : Différentes étapes du protocole de l'extraction.

I.2.2. Détermination du rendement d'extraction

La détermination du rendement d'extraction consiste à évaluer la masse du résidu sec (extrait brut) après séchage par rapport à la masse initiale de la matière végétal sèche utilisée dans la macération. La formule de calcul du rendement est comme suit :

$$\text{RE (\%)} = \frac{\text{PBE} - \text{PBV}}{\text{PP}} \times 100$$

RE : rendement d'extraction en pourcentage.

PBE : poids des boites pleins en extrait brut après séchage (en gramme).

PBV : poids des boites vides (en gramme).

PP : poids initiale de matière végétal sèche (en gramme) (**Padmaja et Prasad, 2011**).

I.2.3. Analyses des extraits de grenade (*Punica granatum*)

I.2.3.1. Analyses qualitatives : Screening phytochimique

Les analyses qualitatives des extraits de grenade reposent sur la détection ou bien l'évaluation de la présence des composés phytochimiques, notamment les principales familles des métabolites secondaires tel que : les phénols, les tanins, les flavonoïdes, les tèreptoïdes, les alcaloïdes...etc. Cette évaluation s'effectue par une série des tests standards de criblage ou screening phytochimique. Les analyses qualitatives réalisées sont :

- **Test des phénols**

Dans un tube à essai, 2 ml d'eau distillée a été ajouté à 1 ml de chaque extrait (ÉCA, ÉCÉ, MRA, MRÉ), ensuite quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) à 10% sont ajoutées. L'apparition de couleur bleue / verte indique la présence de phénols (**Jayaprakash et Sangeetha, 2015**).

- **Test des tannins**

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait (ÉCA, ÉCÉ, MRA, MRÉ), 1 ml d'eau distillés et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tannins catéchiques ou bleue verte indique la présence des tannins galliques (**EL-Haoud et al., 2018**).

- **Test des flavonoïdes**

Un volume de 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH à 10% est ajouté à 1 ml de chaque extrait dilué. La présence de flavonoïdes est indiquée par la formation de couleur jaune à orange (**Ali Redha et al., 2018**).

- **Test des alcaloïdes**

- a) **Test de Mayer**

1ml de solution d'HCl concentrée a été ajouté à 0.5 ml de chaque extrait (ÉCA, ÉCÉ, MRA, MRÉ). Ensuite, quelques gouttes du réactif de Mayer ont été ajoutées. La présence de couleur verte ou de précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes (**Jayaprakash et Sangeetha, 2015**).

- b) **Test de Dragendorff**

Quelques gouttes du réactif de Dragendorff ont été ajoutées à 2 ml de chaque extrait. La présence d'un précipité de couleur orange indique la présence d'alcaloïdes (**Ali Redha et al., 2018**).

- **Test des sucres réducteurs**

La révélation des sucres réducteurs est mise en évidence par l'ajout de 5 ml de la liqueur de Fehling à 5 ml de chaque extrait (ÉCA, ÉCÉ, MRA, MRÉ). La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive (**Bekroet et al., 2007**).

- **Test des quinones**

La présence des quinones est mise en évidence par l'ajout de 1 ml de l'acide sulfurique concentré à 1 ml de chaque extrait dilué. La formation d'une couleur rouge indique la présence des quinones (**Jayaprakash et Sangeetha, 2015**).

- **Test des terpénoïdes**

Dans un tube à essai 2 ml de chloroforme a été ajouté à 1 ml de chaque extrait, ensuite 1 ml d'acide sulfurique concentré est additionné lentement sur la paroi du tube. La formation de couleur brun-rouge à l'interface indique la présence de terpénoïdes (**Jayaprakash et Sangeetha, 2015**).

- **Test des saponines**

Dans un tube à essai, 10 ml de chacun des 4 extraits sont introduits, puis une agitation violente et horizontale durant 15 secondes a été effectuée. Après un repos de 15 min, l'observation d'une hauteur de mousse persistante et supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Daoudi et al., 2015**).

I.2.3.2. Analyses quantitatives : Dosage biochimique

L'analyse quantitative ou le dosage biochimique est basé sur des méthodes colorimétriques par spectrophotométrie tout en utilisant un standards de concentration connue pour quantifié le contenu en métabolites secondaires de nos extraits.

I.2.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie

La concentration en polyphénols totaux de nos extraits a été mesurée par spectrophotométrie UV tout en basant sur une réaction d'oxydation / réduction colorimétrique. L'agent oxydant utilisé était le réactif Folin-Ciocalteu (**Skерgetal., 2005**).

➤ Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'absorption de la coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

➤ Mode opératoire

Suivant la méthode utilisée par **Skерget et al. (2005)**, une prise de 200 μ l de chaque extrait (préparé à partir du résidu sec en différentes concentrations) est mélangée avec 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu (0.1N), puis 0,8 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 (75 g / l) étaient ajouté. Les échantillons sont incubés pendant 5 min à 50 ° C puis refroidi. Un blanc de la réaction est préparé avec 200 μ l du solvant d'extraction et avec les mêmes conditions que les extraits. L'absorbance a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV - VIS. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

Une courbe d'étalonnage est tracée en exploitant les absorbances des différentes concentrations de l'acide gallique(7,81- 15,625 - 31,25 - 62,5 -125 - 250 μ g/ml) préparées à partir d'une solution mère de 1mg/ml. Ces concentrations sont traitées dans les mêmes conditions que les extraits.

Les résultats obtenus du dosage des quatre extraits sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage tracée avec l'acide gallique (Annexe 1, figure 01).

I.2.2.2.2. Dosage des flavonoïdes par trichlorure d'aluminium

➤ **Principe**

L'estimation de la teneur en flavonoïdes dans les extraits est déterminée par spectrophotométrie, en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Ali-Rachedi *et al.*, 2018).

➤ **Mode opératoire**

Selon le protocole utilisé par Djeridane *et al.* (2006), 1 ml de chaque extrait (préparé à partir du résidu sec à différentes concentrations) a été mélangé séparément avec 1 ml de solution de chlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre UV – VIS. Toutes les mesures sont répétées trois fois. Un blanc de la réaction est préparé avec 1ml du solvant d'extraction et avec les mêmes conditions que les extraits.

Les concentrations en flavonoïdes de nos extraits sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage qui est tracée en exploitant les absorbances des différentes concentrations (7,81- 15,625 - 31,25 - 62,5 -125 – 250 - 500 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère (1mg/ml) de la rutine. Ces concentrations sont traitées dans les mêmes conditions opératoires du dosage des extraits.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent de la rutine par gramme de matière sèche (mg ER/ g de MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée avec la rutine (Annexe1, figure 02).

I. 2.2.2.3. Dosage des tannins condensés

➤ **Principe**

Le dosage des tannins condensés est réalisé par la méthode de la vanilline-HCl. En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie (Ghedadbaetal., 2015).

➤ **Mode opératoire**

Le dosage des tannins condensés des échantillons (extraits et standard) a été réalisé selon la méthode décrite par **Sun et al. (1998)** qui est celle de la vanilline – HCl. Pour cela, un volume de 200 µl de chaque extrait (préparé à partir du résidu sec en différentes concentrations) est introduit dans un tube à hémolyse en verre, puis mélangée avec 1 ml d'une solution fraîchement préparée de la vanilline à 1% (p/v) en acide acétique glaciale et d'HCl (98:2, v/v). Après une incubation pendant 20 minutes à 30 ° C, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 510 nm avec un spectrophotomètre UV – VIS. Toutes les mesures sont répétées trois fois. Un blanc de la réaction est préparé avec 200 µl du solvant d'extraction et avec les mêmes conditions que les extraits.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent de la catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/ g de MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage tracée avec la catéchine (Annexe1, figure 03).

Cette courbe d'étalonnage est tracée en exploitant les absorbances des différentes concentrations (7,81- 15,625 - 31,25 - 62,5 -125 – 250 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère (1mg/ml) de la catéchine. Ces concentrations sont traitées dans les mêmes conditions réactionnelles que les extraits.

Chapitre II : Etude des Activités Biologiques

II.1.L'activité antioxydante

Il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Popovici et al., 2009**).

Pour cela l'évaluation de l'activité antioxydante de nos différents extraits de grenade (*Punica granatum L.*) a été mise en œuvre par la réalisation des trois tests à savoir: le test de DPPH, le test de l'ABTS et le test de réduction du fer par le FRAP. Chaque test a une méthode expérimentale spécifique mais l'ensemble est basé sur les propriétés antioxydantes des composés phytochimiques présents dans les extraits testés.

La plupart des méthodes de détermination de l'activité antioxydante totale caractérisent l'aptitude du composé ou du produit testé à piéger les radicaux libres et / ou aux ions métalliques complexes à l'origine du processus d'oxydation (**Tirzitis, et Bartosz, 2010**).

II.1.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH)

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de nos extraits, est effectuée par la méthode qui utilise le DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) comme un radical libre.

➤ Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 8). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, de ce fait le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515 nm (Popovici *et al.*, 2009).

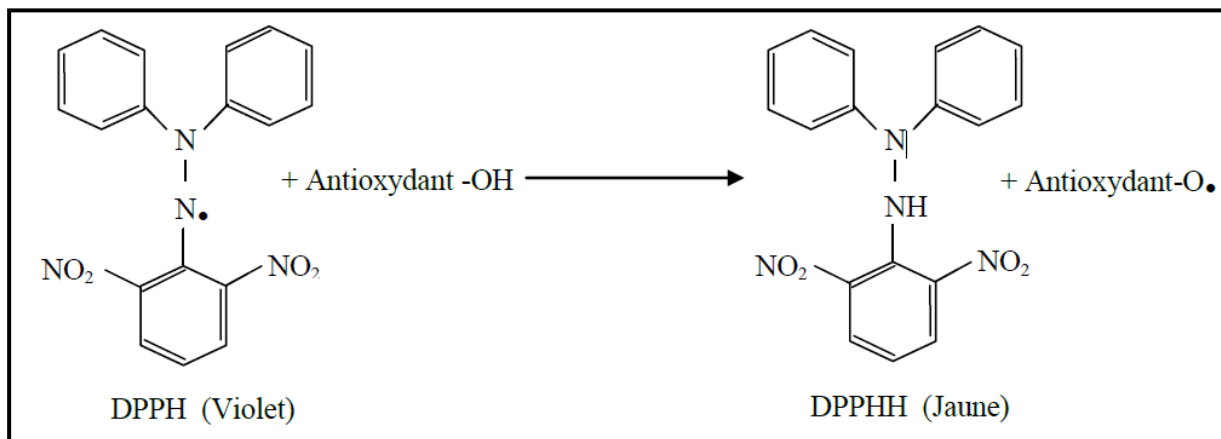


Figure n°8: Réaction de réduction du DPPH (Talbiet *et al.*, 2015).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes: (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) et (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Popovici *et al.*, 2009).

➤ Mode opératoire

Ce test du pouvoir antiradicalaire est réalisé selon la méthode de **Brand William *et al.* (1995)**. A 1,95 ml de réactif DPPH (Annexe 2) sont ajoutés 50 μ l de chaque extrait préparé à

différentes concentrations (Annexe 2 – Tableau 1) puis le mélange est incubé pendant 30 minutes à l'obscurité. Un contrôle négatif (blanc) est préparé avec 50 µl de méthanol et avec les mêmes étapes et conditions que les extraits. La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre UV-Visible à 515 nm contre une référence (le méthanol). Les mesures ont fait l'objet de 3 répétitions.

Un témoin positif avec l'acide ascorbique (un antioxydant standard) à différentes concentrations est préparé dans les mêmes conditions que les échantillons (Annexe 2-Tableau 2).

L'activité antioxydante de nos échantillons est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en suivant l'équation :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} * 100$$

Où :

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon (l'acide ascorbique ou les extraits).

La valeur de l'IC50 de l'acide ascorbique et des extraits a été déterminée. Elle est définie comme étant la concentration du substrat (standard ou échantillon) qui cause la perte de 50 de l'activité de DPPH. Ou encore c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constitué de DPPH.

Les valeurs de l'IC50 ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (de réduction) à l'aide du logiciel Excel.

II.1.2. Test de l'acide 2, 2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique) (ABTS)

➤ Principe

L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) ou ABTS, formant un radical relativement stable (ABTS[•]) lors de l'oxydation à un électron, est devenu un substrat populaire pour l'estimation de la capacité totale d'antioxydant (**Tirzitis, et Bartosz, 2010**).

L'estimation de cette capacité à piéger le radical cation ABTS^{•+}, est basée également sur une méthode colorimétrique où une décoloration de la solution bleue-verte contenant l'ABTS^{•+} sera observée lors de la formation de ABTSH⁺ (couleur bleue à verte). Cette décoloration pourra également être quantifiée par spectrophotométrie (Absorption UV/Visible) à 734 nm. En revanche, l'inconvénient majeur de cette méthode relève de

l'instabilité des radicaux $ABTS^{\bullet+}$. Ces derniers doivent être générés extemporanément à partir de sels d'ABTS et la mesure doit être faite assez rapidement (Desmier, 2016).

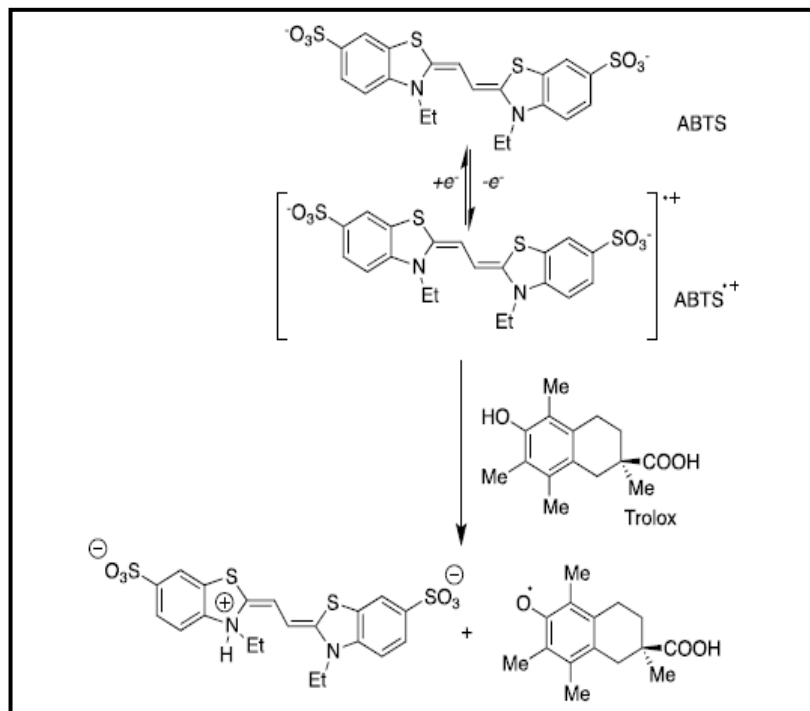


Figure n°9: Modification de l'ABTS lors du transfert électronique (Desmier, 2016).

➤ Mode opératoire

Selon le protocole rapporté par Youmbai (2015), l'ABTS à 7 mM et le sulfate de potassium ($K_2 SO_3$) à 2,45 mM sont mélangés avec des volumes égaux, le mélange est incubé pendant 16 h, puis une dilution par l'éthanol a été réalisée jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,700 \pm 0,01$ à 734 nm juste avant l'utilisation (Barahona *et al.*, 2011). Ensuite, pour 50 μ l de chaque extrait préparé à des concentrations différentes (Annexe 3-Tableau 1) 1,95 ml de la solution de l'ABTS est ajouté. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité pendant 6 min puis l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm. Les essais sont répétés 3 fois.

Un contrôle négatif (le blanc) est préparé par 50 μ l de l'éthanol et 1,95 ml de solution d'ABTS. Un témoin positif avec l'acide ascorbique (un antioxydant standard) à différentes concentrations est réalisé dans les mêmes conditions que les échantillons (Annexe 3-Tableau 2).

L'activité antioxydante de nos échantillons est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{\bullet+}$ suivant l'équation :

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) * 100$$

Où :

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon (l'acide ascorbique ou les extraits).

La concentration (IC50) des extraits et de l'acide ascorbique permettant de réduire 50% de l'ABTS⁺ est déterminée en traçant une courbe de pourcentage de réduction en fonction de la concentration à l'aide du logiciel Excel.

II.1.3. Test du pouvoir réducteur (Ferric Reducing Antioxydant Power, FRAP)

➤ Principe

Le test FRAP (ou Ferric Reducing Antioxydant Power) est une méthode basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'électrons (**Desmier, 2016**). En effet, cette réduction d'une forme ferrique 2,4,6-Tris (2-pyridyl) -1,3,5-triazine (Fe^{3+} -TPTZ) en une forme ferreuse colorée (Fe^{2+} -TPTZ) se fait en présence d'un antioxydant (**Jaitak et al., 2010**).

De par la nature de la réaction de réduction, l'antioxydant doit présenter une capacité de donneur d'électron. Le transfert d'atome d'hydrogène ne sera pas le mécanisme privilégié. L'absorbance est mesurée à 593 nm (**Desmier, 2016**).

➤ Mode opératoire

Le test FRAP a été réalisé selon le protocole de **Benzie et Strain (1996)** avec une légère modification. Le réactif FRAP a été préparé à partir de tampon acétate 0,3 M (pH 3,6), de 10 mmol de solution TPTZ (préparé dans 40 mmol de HCl) et de 20 mmol de solution de chlorure de fer (III) dans des proportions respectives de 10: 1: 1 (v/v/v). Le réactif FRAP a été fraîchement préparé avant analyse et chauffé à 37 ° C avant utilisation.

Ensuite 1ml de cette solution de FRAP a été ajouté à 100 µl de chaque extrait à différentes concentrations (Annexe 4 - Tableau 1). L'absorbance du mélange réactionnel a ensuite été enregistrée à 593 nm après 4 min d'incubation, contre du blanc (100 µl du solvant d'extraction utilisé). Toutes les mesures ont été effectuées en triplet.

Les valeurs obtenues sont comparées avec l'absorbance d'un témoin positif qui est préparé par l'acide ascorbique, dont les mêmes étapes et conditions opératoires sont effectuées pour ce standard à différentes concentrations (Annexe 4 - Tableau 2).

Les résultats sont exprimés en évaluant la variation des absorbances obtenus en fonction des concentrations testées des extraits et du standard, ainsi le pouvoir réducteur des extraits est aussi exprimé par équivalent en acide ascorbique (en μg EAA/ml), en exploitant l'équation de la régression linéaire de ce standard.

II.2. L'activité antibactérienne

Pour étudier l'activité antibactérienne de nos extraits de grenade (*Punica granatum L.*) deux souches microbiennes sont utilisées:

- 1) *Escherichia coli* ATCC 25922 : une souche bactérienne à Gram négatif:
- 2) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 : une souche bactérienne à Gram positif :

Les deux souches ont été fournies par un laboratoire des analyses médicales: Laboratoire ESSALAM -W. GHARDAIA.

II.2.1. Test antibactérien par Méthode de diffusion sur gélose

Nous avons opté la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques) pour évaluer l'activité antibactérienne de nos différents extraits vis à vis des deux souches bactériennes ainsi expérimentées.

Le principe du test consiste à utiliser des disques en papier buvard imprégnés d'une concentration fixe d'antibiotique, placés à la surface d'agarensemencée avec la souche bactérienne testée. Cette méthode permet de déduire la sensibilité ou la résistance de chaque souche bactérienne à partir de certains paramètres de la croissance bactérienne (diamètre de zone d'inhibition autour de disques chargés en antibiotiques) (Bonev *et al.*, 2008).

Cette méthode est réalisée en suivant les étapes citées par Meddour *et al.* (2013):

II.2.1.1. Repiquage

Les deux souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, dans un milieu de gélose nutritif (GN), puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées.

II.2.2.2. Préparation de l'inoculum

Des colonies bien isolées des cultures bactériennes fraîchement repiquées et incubées ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et homogénéisées chacune dans des tubes stériles contenant 9 ml de solution d'eau physiologique stérile à 0.9%, afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland (pour cela nous avons mesuré l'absorbance de cette suspension à 625 nm dans l'intervalle de 0,08 à 0,12 à l'aide

d'un spectrophotomètre afin d'avoir une concentration bactérienne entre 10^6 à 10^8 UFC/ml (Unités Formant Colonies par millilitre).

II.2.2.3. Ensemencement

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension bactérienne servant d'inoculum, on trempe un écouvillon stérile dans la suspension puis on l'essor en le pressant fermement contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. Le contenu de l'écouvillon est étalé à la surface entière de la gélose Mueller-Hinton (coulée préalablement dans des boîtes de pétrie stériles) à trois reprises. Après chaque application, on tourne la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on écouvillonne partout autour du bord de la surface de la gélose.

II.2.2.4. L'application des disques

Sur la surface du milieu ainsi ensemencé, et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) sont déposés, puis ces disques sont imprégnés par un volume de 10 μ l des différentes concentrations de nos extraits. Ces concentrations sont 10 - 5 - 2,5 et 1,5 mg/ml préparées par une dilution de chaque extrait brut dans le solvant approprié (pour les extraits hydro-éthanolique la dilution se fait par une solution de diméthyle sulfoxyde (DMSO) diluée 10 fois alors que pour les extraits aqueux la dilution a été réalisée dans de l'eau distillée stérile). Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées dans une étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C . Tous les tests sont répétés deux fois.

Des disques standards contenant l'antibiotique de référence ont servent comme des contrôles positifs. Deux antibiotiques sont utilisés: La gentamicine (10 μ g) et l'ampiciline (10 μ g).

II.2.2.5. La lecture des résultats

Les résultats sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques des différentes concentrations des extraits et des témoins positifs, dont la mesure s'effectue à l'aide d'un pied à coulisse.

Partie III:

Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique

I.1. Détermination du rendement d'extraction

Après l'extraction par une macération, le séchage des extraits obtenus permet d'obtenir des extraits bruts dont leurs aspects, couleurs et les % du rendement sont regroupés dans le tableau suivant:

Tableau 04: Aspect, couleur et rendement des extraits bruts de grenade (*Punica granatum L.*).

Type d'extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Écorces-aqueux (ÉCA)	Pâteux	Marron foncée	25,2
Écorces – éthanol 70 %(ÉCÉ)	Pâteux	Marron	50,2
Membranes – aqueux (MRA)	Pâteux	Miel foncée	48,20
Membranes– éthanol 70%(MRÉ)	Pâteux	Miel clair	57

Chaque extrait brut a des caractéristiques spécifiques selon la nature de sa matière végétale et aussi selon le solvant d'extraction. Le rendement d'extraction est calculé par rapport à la masse initiale de la matière végétale sèche (en poudre) mise en macération. Selon les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait hydro-éthanolique présente un pourcentage du rendement d'extraction plus élevé par rapport à l'extrait aqueux, pour les deux échantillons. Le rendement le plus élevé est enregistré pour l'extrait hydro-éthanolique des membranes avec 57%, suivi par 50,2 % enregistré pour l'extrait hydro-éthanolique des écorces. Les extraits aqueux ont présentés des rendements de 48,20 % et 25.2% respectivement pour les membranes et les écorces de *Punica granatum L.*

Tous les extraits bruts des échantillons ont un aspect pâteux, avec une couleur foncée (marron) chez les extraits des écorces, par rapport à ceux des membranes (miel), tandis que les extraits bruts aqueux des deux échantillons présentent une couleur plus foncée par rapport aux extraits hydro – éthanoliques.

I.2. Analyses qualitatives : Screening phytochimique

Pour les quatre types des extraits de grenade (*Punica granatum L.*), une série des tests de screening phytochimique est réalisée pour détecter la présence ou l'absence des différentes catégories des métabolites, par l'intermédiaire des réactifs spécifiques (Tableau 05).

Tableau 05: Les résultats des tests de screening phytochimique.

Métabolite		ÉCA	ÉCÉ	MRA	MRÉ
Les phénols		+++	+++	+++	+++
Les tannins	Galliques	+++	+++	+++	+++
	Catéchiques	-	-	-	-
Les flavonoïdes		++	+++	+	+
Les alcaloïdes	Mayer	-	-	-	-
	Dragendroff	-	-	-	-
Les sucres réducteurs		+++	+	+	+
Les quinones		++	+++	++	+++
Les terpénoïdes		+	+	+	+
Les saponines		+		-	

(+) présence, (-) absence.

Sur la base de ces résultats des analyses primaires, les extraits des écorces de grenade ainsi de ses membranes marquent une présence intense des phénols et des tannins dont la coloration engendrée par l'ajout du FeCl₃ est très intense (un bleu noirâtre), indiquant parallèlement la richesse en tannins hydrolysables (tannins galliques).

Les flavonoïdes sont aussi fortement présents dans tous nos extraits, avec une intensité de la couleur plus au moins élevée dans l'extrait hydro-éthanolique des écorces(ÉCÉ). Par ailleurs, une absence totale des alcaloïdes (avec les deux tests) est marquée pour tous les extraits.

Un test positif est aussi enregistré pour la révélation des sucres réducteurs chez tous nos extraits, pour lequel un précipité rouge brique est formé, sa quantité est très élevée dans l'extrait aqueux des écorces(ÉCA).

Les quinones ont une présence forte dans tous les extraits, particulièrement dans les extraits éthanoliques des deux échantillons (ÉCÉ, MRÉ). D'autre part, tous les extraits marquent la présence des terpénoïdes.

Concernant la détection des saponines, une mousse persistante d'une hauteur dépassant 1cm a été observée chez l'extrait aqueux des écorces de grenade (ÉCA).

I.3. Analyses quantitatives

I.3.1. Teneurs en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits ont été estimées en exploitant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique (Annexe 1, Figure1). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure n°10.

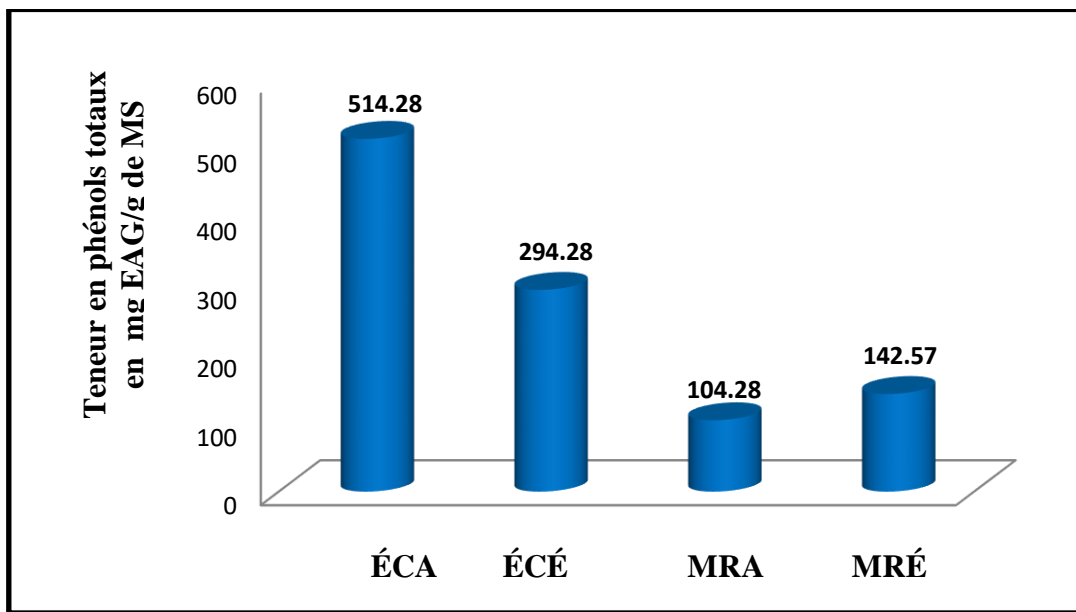


Figure n°10: Teneur en phénols totaux des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Les résultats du dosage des phénols totaux dans notre étude indiquent que l'extrait aqueux des écorces de grenade (ÉCA) présente la concentration en phénols totaux la plus élevée avec $514,28 \pm 0,05$ mg EAG/g de MS, suivie par l'extrait éthanolique de cet même type d'échantillon avec une concentration aussi importante de l'ordre de $294,28 \pm 0,024$ mg EAG/g de MS. Tandis que l'extrait hydro-éthanolique des membranes présente une teneur en phénols totaux plus ou moins élevée par rapport à l'extrait aqueux avec des teneurs de $142,57 \pm 0,035$ et $104,28 \pm 0,019$ mg EAG/g de MS respectivement. Ces dernières teneurs restent nettement inférieures aux teneurs obtenues dans les extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces de grenade.

Ces résultats obtenus montrent une différence claire dans les teneurs en phénols totaux entre les extraits des écorces de grenade et les extraits des membranes ainsi entre les extraits aqueux et ceux hydro-éthanoliques, ceci est due à l'influence du type de solvant d'extraction et également à la nature de la matière végétale de l'extrait ainsi dosé.

I.3.2. Teneur en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont estimées en exploitant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par la routine (Annexe 1, Figure 2). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure n°11.

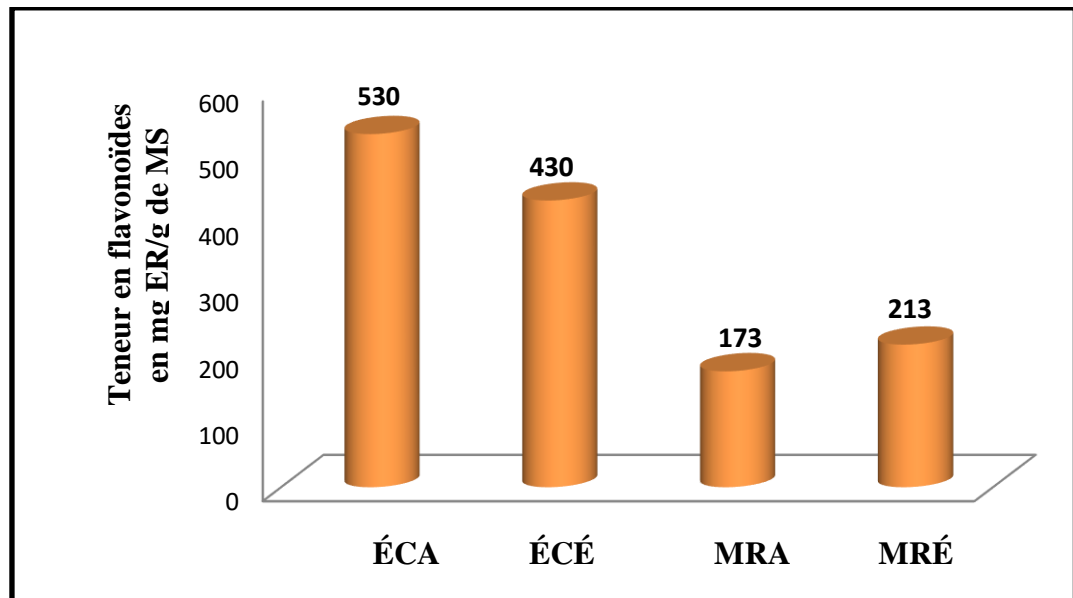


Figure n°11: Teneur en flavonoïdes des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Le dosage des flavonoïdes permet d'estimer les teneurs de nos extraits en ces composés, dont les résultats obtenus montrent que l'extrait des écorces aqueux (ÉCA) a enregistré la concentration en flavonoïdes la plus élevée avec $530 \pm 0,01$ mg ER/ g de MS par rapport aux autres extraits ÉCÉ, MRÉ et MRA où les teneurs en flavonoïdes enregistrées sont respectivement de $430 \pm 0,03$ mg ER/ g de MS, $213 \pm 0,0004$ et $173 \pm 0,0008$ mg ER/ g de MS.

Au vu de ces résultats obtenus, les extraits des écorces de la grenade présentent des teneurs élevées en flavonoïdes par rapport aux extraits des membranes, et pour ceux des écorces l'extrait aqueux est le plus riche en flavonoïdes, et pour l'échantillon des membranes l'extrait hydro-éthanolique a une teneur en flavonoïdes plus élevée par rapport à l'extrait aqueux. Ces différences sont dues à l'effet du solvant et aussi à la nature de la matière végétale des extraits dosés.

I.3.3. Teneur en tannins condensés

Les teneurs en tannins condensés des extraits sont exprimés en mg/g de MS tout en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par la catéchine (Annexe 1, Figure 03). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure n°12.

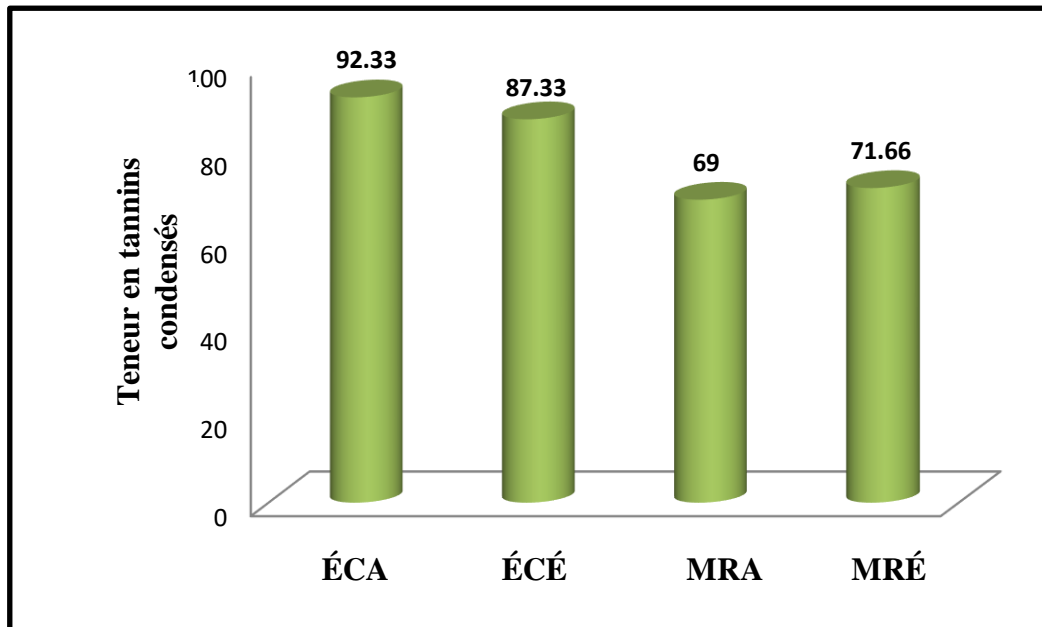


Figure n°12: Teneur en tannins condensés des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Les résultats des teneurs en tannins condensés ne présentent pas une grande différence entre les quatre extraits dosés. La teneur des tannins condensés la plus élevée ($92,33 \pm 0,004$ mg EC/g de MS) a été enregistré chez l'extrait ÉCA suivi par la teneur de l'extrait ÉCÉ avec $87,33 \pm 0,002$ mg EC/g de MS. Les extraits MRÉ et MRA ont présentés presque des teneurs égales de $71,66 \pm 0,002$ et $69 \pm 0,001$ mg EC/g de MS respectivement avec une légère teneur supérieur chez l'extrait MRÉ.

I.3.4. Comparaison globale des teneurs en composés phénoliques

Les résultats du dosage des principaux composés phénoliques: les phénols, les flavonoïdes et les tannins condensés, sont regroupés dans la figure suivante:

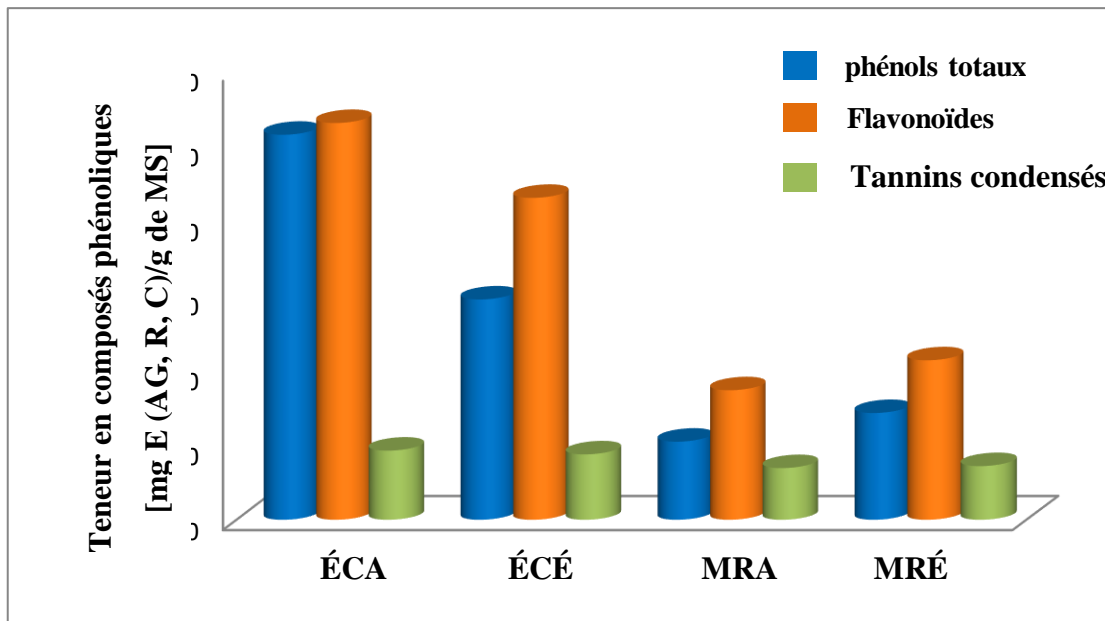


Figure n°13: Teneur en composés phénolique des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Selon les résultats affichés dans la Figure n°13, il ressort qu'il ya une similarité dans l'ordre des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes ainsi les tannins condensés des extraits dosés dans cette présente étude. En d'autre terme, l'extrait aqueux des écorces de grenade (ÉCA) a toujours enregistré la valeur la plus élevée de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de même en tannins condensés, suivi par l'extrait hydro-éthanolique de ce même échantillon (ÉCÉ). Par la suite, les extraits hydro-éthanoliques et aqueux des membranes de la grenade (MRÉ, MRA) ont présentés respectivement des teneurs inférieurs à ceux obtenus par les extraits des écorces. Dans ce sens, on peut classer nos extraits en fonction de leurs teneurs en ces composés phénoliques ainsi dosés par ordre décroissant comme suit $\text{ÉCA} > \text{ÉCÉ} > \text{MRÉ} > \text{MRA}$.

D'autre part, il apparait qu'il n'y a pas une grande différence entre la teneur en flavonoïdes et en phénols totaux dans l'extrait ÉCA, tandis que les autres extraits ont notés des teneurs élevés en flavonoïdes par rapport à celles des phénols totaux et des tannins condensés, ces derniers ont des teneurs faibles par rapport aux flavonoïdes et aux phénols totaux dans tous les extraits.

De manière générale, et d'après ces résultats du dosage des composés phénoliques de cette présente étude, on peut constater que les extraits des écorces de grenade sont plus riches en composés phénoliques par rapport aux extraits des membranes de grenade (*Punica granatum L.*) où eux même présentent des teneurs considérables.

Chapitre II : Etude des Activités Biologiques

II.1. Activité antioxydante

II.1.1. Test du pouvoir antiradicalaire du DPPH

L'activité antiradicalaire de nos extraits vis-à-vis du piégeage des radicaux libres DPPH est mesurée en basant sur les résultats obtenus par spectrophotométrie, dont les absorbances enregistrées permettent de tracer des courbes de pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des échantillons.

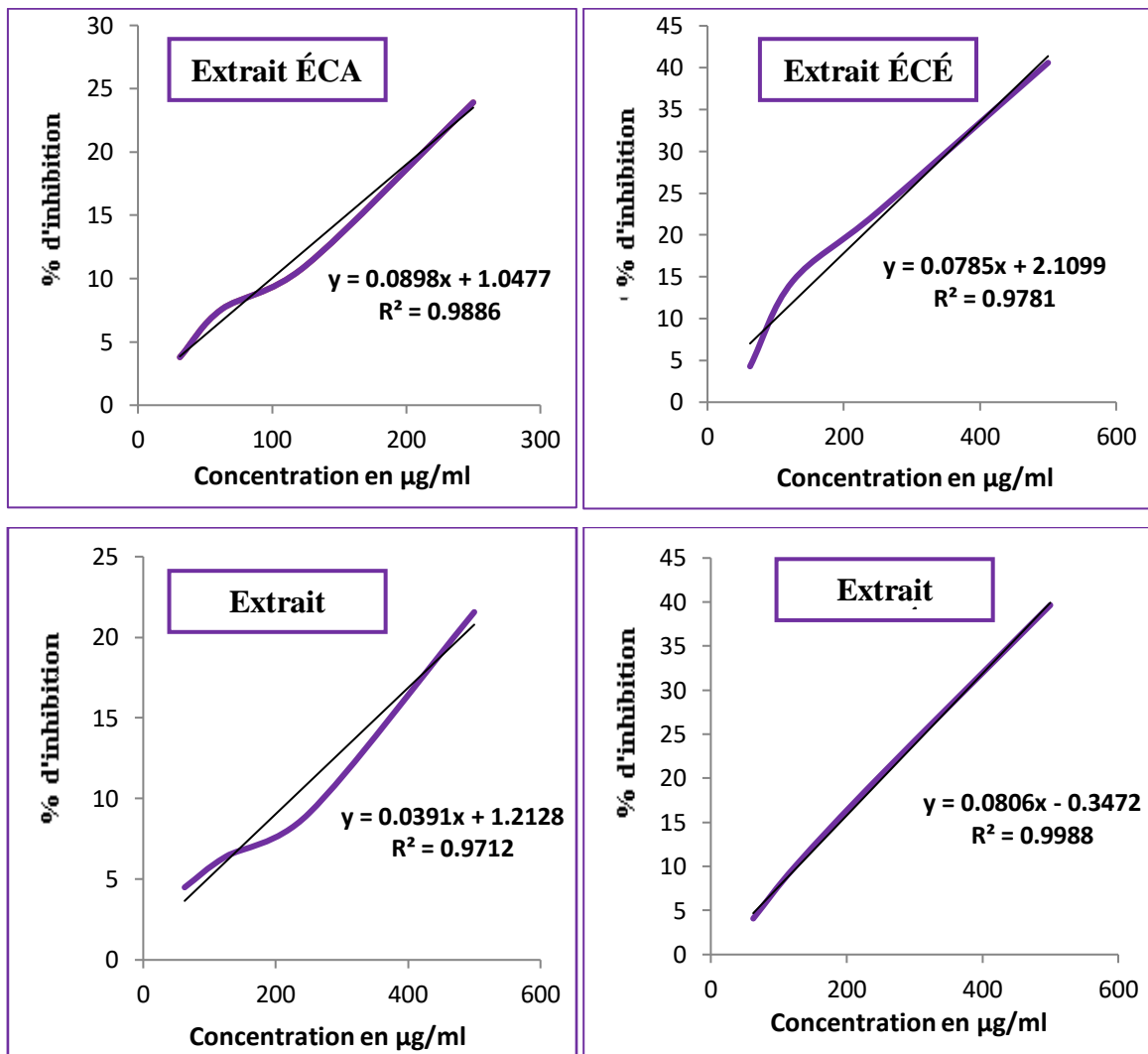


Figure n°14: Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Des allures presque linéaires sont obtenus dans les courbes tracées (Figure n°14), elles permettent de montrer qu'il ya une relation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition et la concentration de l'extrait testé, une augmentation de cette dernière se

traduit par une activité antioxydante importante. Ces résultats déterminent que nos extraits des écorces et des membranes de grenade ont une activité antiradicalaire vis-à-vis le piégeage des radicaux libres DPPH.

Les pourcentages d'inhibition à 500 µg/ml des extraits étudiés ÉCA, ÉCA, MRA et MRÉ sont respectivement 45.54%, 40,59%, 21,56 % et 39,65 %, pour lesquelles les extraits des écorces de la grenade ont un pourcentage d'inhibition élevé par rapport aux ceux des membranes, avec la valeur la plus importante appartient à l'extrait aqueux des écorces et celle la moins faible enregistrée pour l'extrait aqueux des écorces.

A partir des équations de la régression linéaire (Figure n°14), on peut calculer les valeurs d'IC50 qui représentent un autre paramètre permettant d'évaluer l'activité antiradicalaire de nos extraits. La figure suivante présente les valeurs d'IC50 de chaque extrait en comparaison avec l'IC50 du standard qu'est l'acide ascorbique.

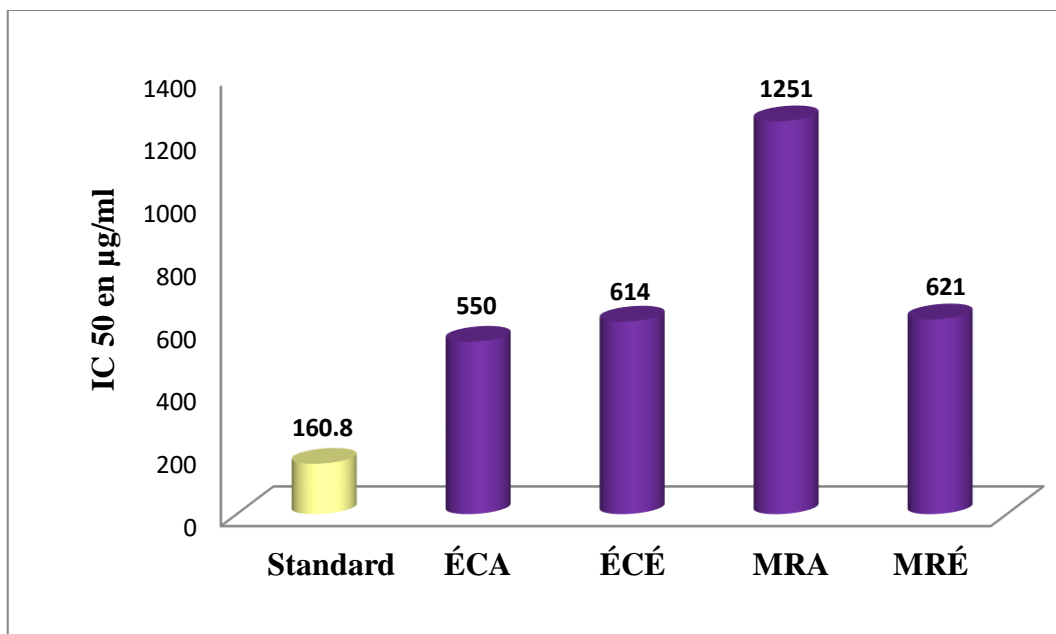


Figure n°15: Les valeurs d'IC50 des extraits des écorces et des membranes de grenade en comparaison avec du standard pour le test du DPPH.

Plus la valeur d'IC50 est petite plus que l'activité antioxydante est puissante, sur cette base et d'après les résultats présentés dans la Figure n°15, l'acide ascorbique utilisé comme un standard montre une activité antiradicalaire (vis à vis les radicaux libres DPPH) légèrement élevée par rapport à nos extraits.

D'autre part, au niveau de nos extraits testés, des activités antiradicalaires très importante ont été enregistrée avec trois de nos extraits à savoir les extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces et l'extrait hydro-éthanolique des membranes de la grenade, dont des valeurs d'IC50 de 550 µg/ml, 614 µg/ml et 621 µg/ml ont été obtenues respectivement. Ces valeurs d'IC50 obtenues ne sont pas loin de la valeur d'IC50 obtenue par l'acide ascorbique qui est de 160.8 µg/ml et qui est presque la moitié de celles de nos extraits. Par contre l'extrait aqueux des membranes de grenade montre l'activité antiradicalaire la plus faible avec une IC50 égale à 1251 µg/ml.

De manière générale et d'après ces résultats, on peut distinguer que les extraits des écorces de grenade possèdent une activité antioxydante élevée par rapport aux extraits des membranes vis-à-vis le piégeage des radicaux libres du DPPH.

Il convient aussi de noter qu'il ya une corrélation entre les résultats du test de DPPH et du dosage des composés phénoliques, pour laquelle les extraits qui ont des teneurs les plus élevées en composés phénoliques ainsi dosés, sont les mêmes qui ont présentés une activité antiradicalaire la plus importante, vis-à-vis les radicaux DPPH*. La figure suivante (Figure 16) serve à démontrer cette corrélation.

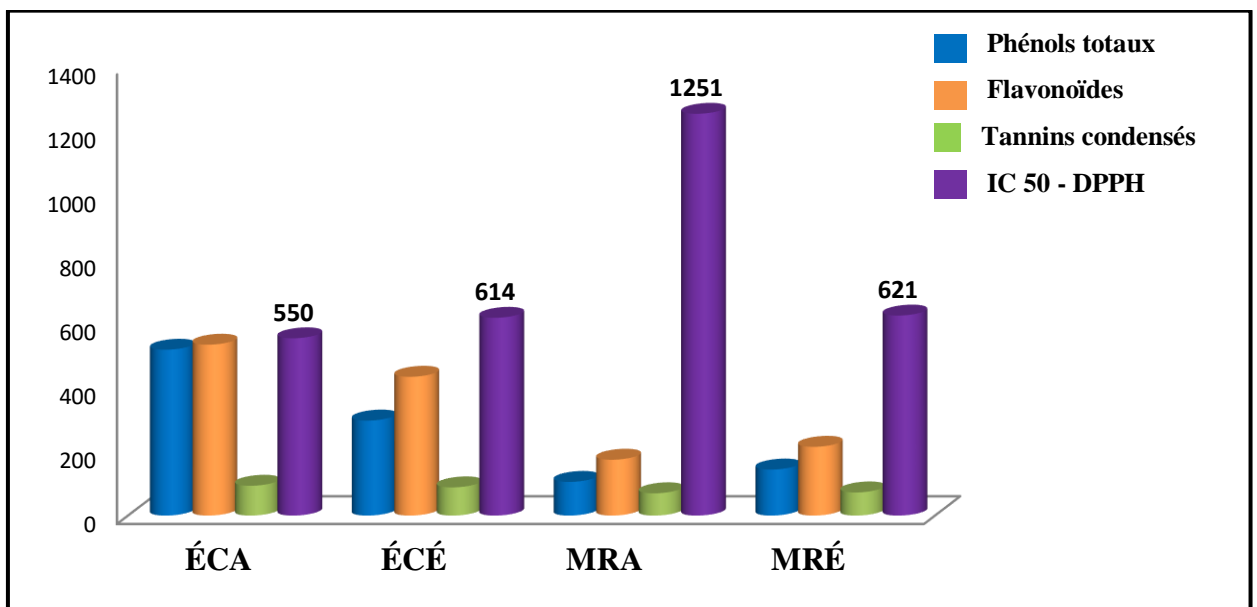


Figure n°16: Corrélation entre les résultats du test de DPPH et du dosage des composés phénoliques des quatre extraits de la grenade (*Punica granatum L.*).

II.1.2. Test d'ABTS

Dans ce test, l'activité antioxydante de nos échantillons est évaluée par la capacité de piéger le radical cation $ABTS^{*+}$, en utilisant les valeurs d'absorbances obtenus par spectrophotométrie. On peut exprimer les résultats en pourcentage d'inhibition du radical cation $ABTS^*$ en fonction des différentes concentrations des extraits testés de la grenade (*Punica granatum L.*).

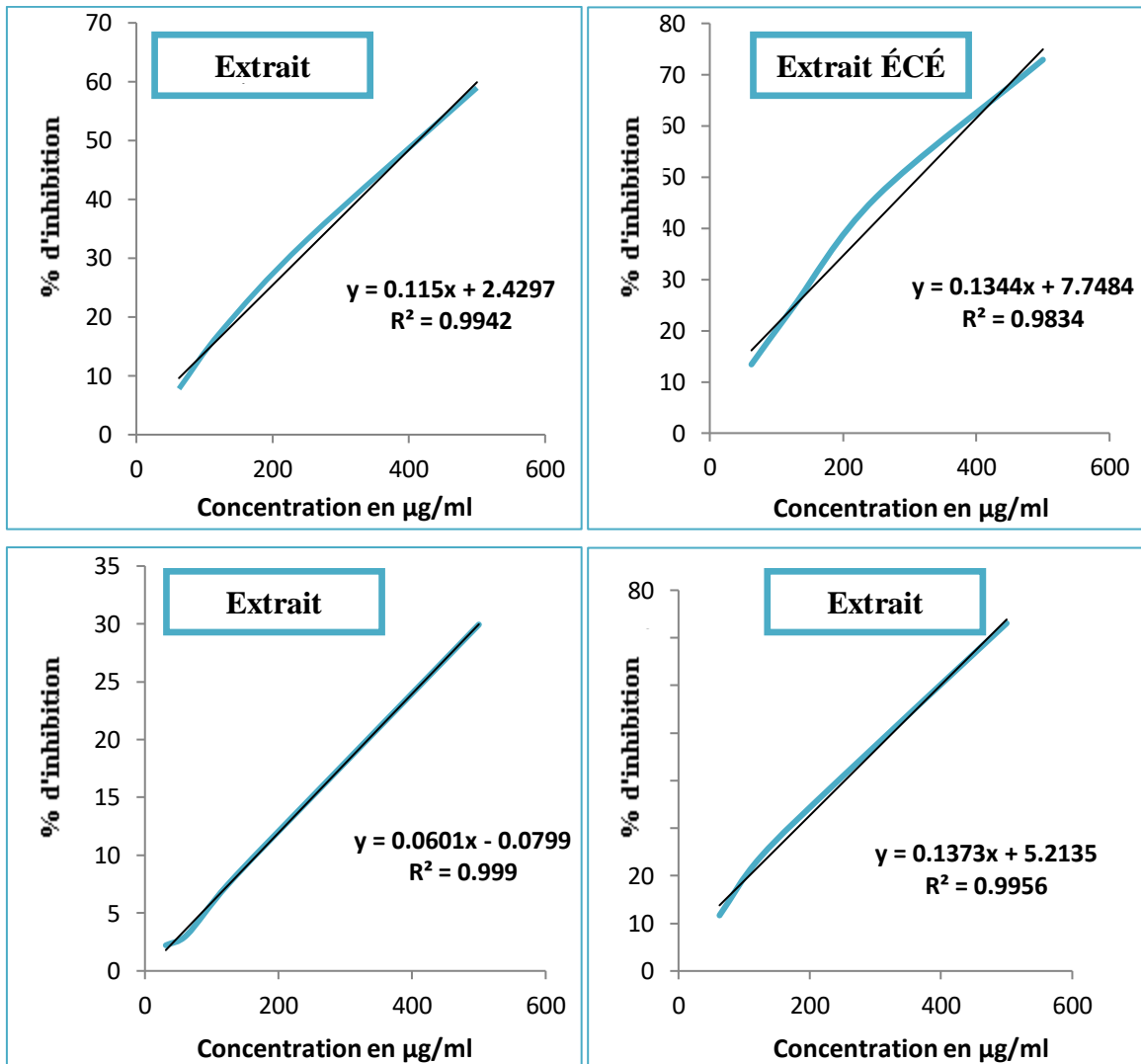


Figure n°17: Les pourcentages d'inhibition du cation $ABTS^{*+}$ en fonction des concentrations des extraits des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Selon ces courbes, tous les extraits testés présentent une activité antioxydante vis-à-vis la réduction des cations $ABTS^{*+}$, dans lesquelles des allures linéaires permettent de

constater qu'une augmentation de la concentration est accompagnée par une augmentation du pourcentage d'inhibition ou bien de la réduction du radical cation $ABTS^{*+}$.

Les pourcentages d'inhibitions à 500 $\mu\text{g/ml}$ des extraits étudiés ÉCA, ÉCA, MRA et MRÉ sont respectivement 58,97 %, 72,90 %, 29,94 % et 73,05 %, pour lesquelles les extraits hydro – éthanoliques des écorces et des membranes de la grenade ont enregistré des pourcentages d'inhibition très importants (72,90 % et 73,05 %) vis à vis la réduction des cations $ABTS^{*+}$, et sont élevés par rapport aux ceux des extraits aqueux.

Les équations de la régression linéaires (Figure n°18) nous ont permis de calculer les valeurs d'IC50 de chaque extrait.

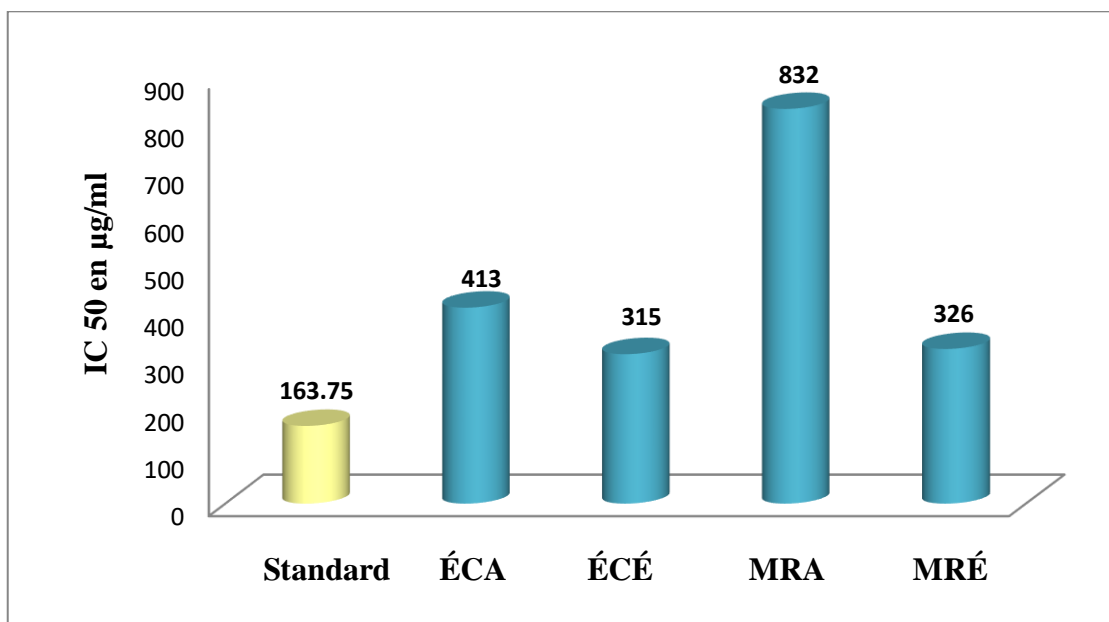


Figure n°18: Les valeurs d'IC50 des extraits des écorces et des membranes de grenade en comparaison avec du standard pour le test d'ABTS.

Le standard utilisé dans ce test (l'acide ascorbique) a montré une valeur d'IC50 la plus faible comparant à nos extraits, ce qui lui attribue une activité antioxydante plus élevée par rapport à nos extraits de grenade ainsi testés.

De même, les résultats de ce test (Figure n°18) indiquent que les extraits hydro-éthanoliques des deux échantillons (les écorces et les membranes) et l'extrait aqueux des écorces ont enregistré les valeurs d'IC50 les plus faibles pour le test d'ABTS (de 315 $\mu\text{g/ml}$, 326 $\mu\text{g/ml}$ et 413 $\mu\text{g/ml}$ respectivement) et qui ne sont pas loin de celle de l'acide ascorbique (163.75 $\mu\text{g/ml}$), et donc ils possèdent une activité antioxydante importante vis à vis la réduction des radicaux $ABTS^*$. Par contre, une valeur d'IC50 légèrement supérieure à

celle des trois extraits et du standard a été enregistrée chez l'extrait aqueux des membranes (MRA) de 832 $\mu\text{g/ml}$, ce qui lui attribue l'activité antioxydante la plus faible dans ce test d'ABTS.

Il est à noter que, les extraits qui présentent l'activité antioxydante la plus importante sont les ceux qui ont enregistrées des teneurs élevées en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tannins condensés) du fait que ces composés sont les majoritaires antioxydants présents dans les extraits des plantes.

II.1.3. Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Dans ce test, le pouvoir réducteur du fer de nos extraits est évalué vis à vis la réduction d'un complexe ferrique tripyridyletriazine ferrique (TPTZ- Fe^{3+}) en sa forme ferreux (TPTZ- Fe^{2+}).

Les résultats de la variation de l'absorbance de nos extraits ainsi que du standard (l'acide ascorbique) sont représentés dans la figure suivante (Figure 19)

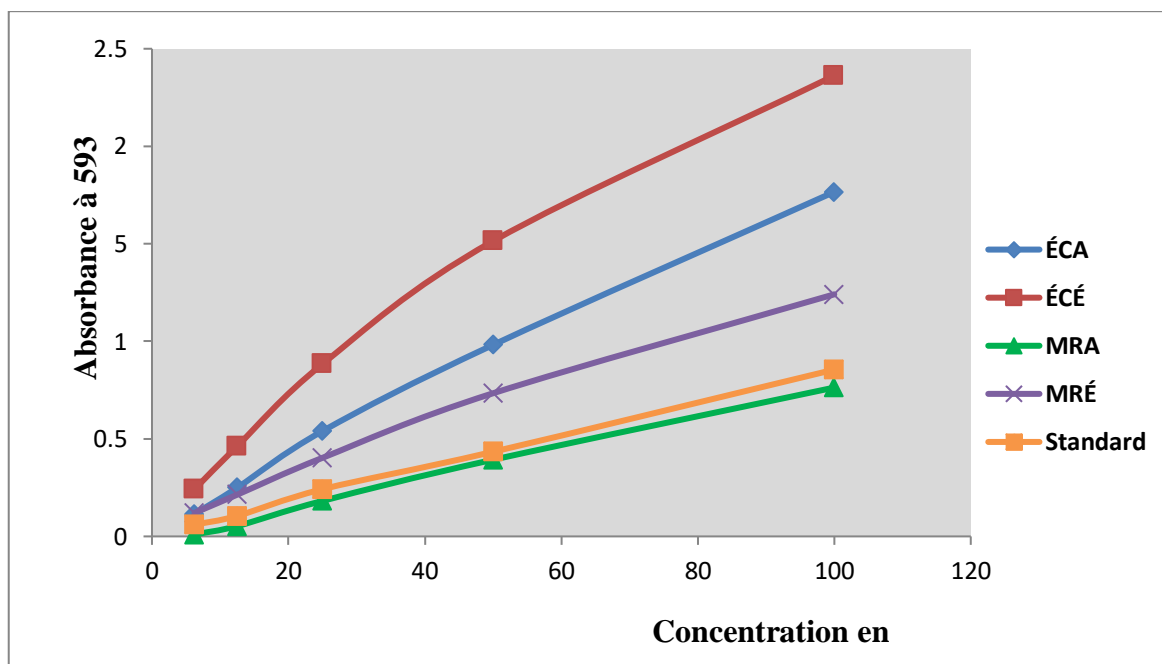


Figure n°19: Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

Dans cette présente étude, les extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces et des membranes de grenade ont présentés une activité antioxydante vis-à-vis leurs capacités réductrices du fer représentées dans la Figure n°19. D'après les résultats de cette figure, une augmentation proportionnelle de l'absorbance de nos extraits et du standard (l'acide

ascorbique) a été enregistrée avec l'augmentation de la concentration, ce qui est expliqué par une réduction du fer dans le milieu réactionnel.

Il ressort que les deux extraits (aqueux et hydro-éthanolique) des écorces de grenade ainsi l'extrait hydro-éthanolique des membranes présentent un pouvoir réducteur du fer nettement plus élevé par rapport à l'acide ascorbique, ceci révèle que ces trois extraits ont un pouvoir réducteur du fer très intéressant. Alors que seul l'extrait aqueux des membranes qui a présenté un pouvoir de réduction du fer inférieur au standard mais presque similaire à ce dernier ce qui lui donne aussi un pouvoir de réduction du fer considérable.

D'autre part, on peut exprimer le pouvoir réducteur du fer des extraits par équivalent en acide ascorbique, en exploitant l'équation de la régression linéaire de ce standard. Les résultats sont affichés dans le tableau suivant:

Tableau 06: Le pouvoir réducteur du fer des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*) exprimé en µg EAA/ml.

Extrait (100µg/ml)	ÉCA	ÉCÉ	MRA	MRÉ
Pouvoir réducteur en µg EAA/ml	0,206	0,276	0,089	0,144

Les résultats de ce tableau renforcent ceux obtenus dans la figure n°19, pour lesquels les extraits testés sont classés par rapport à ses capacités réductrices du fer en ordre décroissant: ÉCÉ > ÉCA > MRÉ > MRA, tout en constatant que les extraits des écorces de grenade sont plus actifs que les extraits des membranes (l'endocarpe).

II.1.4. Corrélation entre les résultats du dosage des polyphénols et les tests de l'activité antioxydante

D'après les résultats précédents de la comparaison globale des teneurs en composés phénoliques, l'extrait qui présente la teneur élevée en polyphénols (phénols totaux) celui qui possède aussi des teneurs élevées en flavonoïdes et en tannins condensés. De ce fait, la corrélation entre les résultats des tests de l'activité antioxydante et les résultats du dosage des polyphénols seuls ou avec les flavonoïdes et tannins condensés est la même. Cette corrélation est représentée dans la figure suivante:

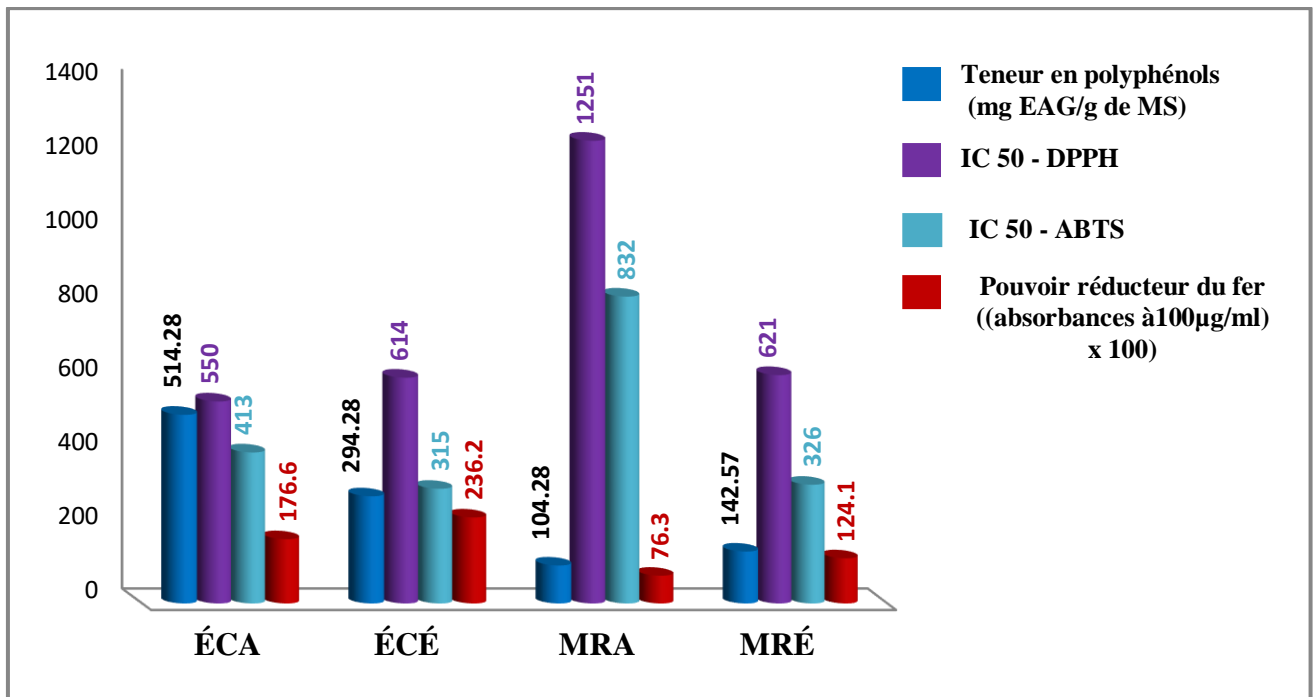


Figure n°20: Corrélation entre les résultats du dosage des polyphénols et les tests de l'activité antioxydante des écorces et des membranes de grenade (*Punica granatum L.*).

A la lumière des résultats représentés dans la Figure°20, on peut constater qu'une corrélation positive est fortement présentée entre les teneurs en polyphénols et les activités antioxydantes des extraits étudiés, de même pour les teneurs en flavonoïdes et en tannins condensés. Cette corrélation sert à prouver que les deux extraits des écorces de la grenade (ÉCA, ÉCÉ) puis l'extrait hydro-éthanolique des membranes (MRÉ), ayant des teneurs les plus élevées en polyphénols, expliquent leur activité antioxydante la plus importante, pour laquelle ces extraits ont présentés des valeurs d'IC 50 les plus faibles dans le test de DPPH et d' ABTS, ainsi un pouvoir réducteur du fer plus puissant (des valeurs d'absorbances mesurées du milieu réactionnel les plus grandes).

Alors que l'extrait MRA a toujours présenté les teneurs les plus faible ce qui explique leur activité antioxydante la plus faible aussi.

II.2. Activité antibactérienne

La méthode de diffusion des disques sur gélose est la plus couramment utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits.

Les extraits des écorces et des membranes de la grenade sont testés en utilisant des différentes concentrations de 10 - 5 - 2,5 - 1,5 mg/ml. Après incubation pendant 24 h à 37°C, il apparaît que la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 présente une résistante

totale vis à vis de tous les extraits testés, pour cela aucune zone d'inhibition n'a été formée (Figure n°21). Par contre, cette bactérie a montré une sensibilité à l'antibiotique de référence la gentamicine, (dont le diamètre d'inhibition est 24 mm), et une résistance à l'ampicilline (Figure n°22).



Figure n°21: Test d'antibiogramme d'*Escherichia coli* ATCC 25922 vis-à-vis les extraits des écorces (gauche) et des membranes (droite) de la grenade (*Punicagranatum* L.).

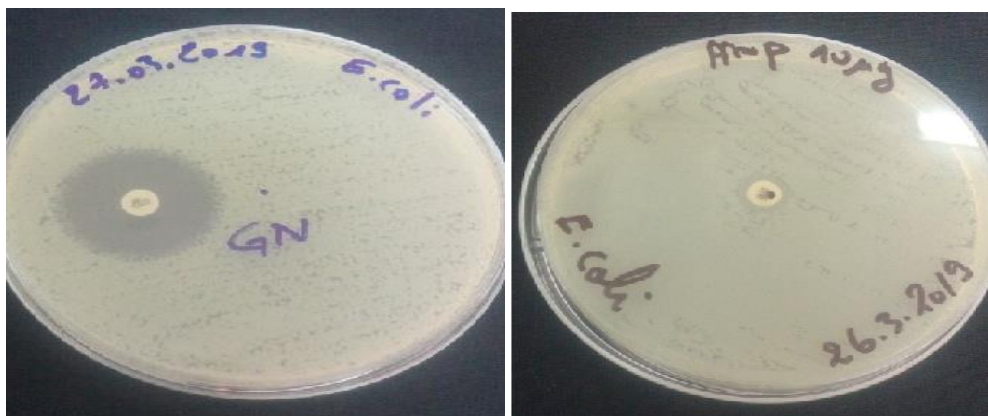


Figure n°22: Test d'antibiogramme d'*Escherichia coli* ATCC 25922 vis-à-vis les antibiotiques de référence (la gentamicine (gauche) et l'ampicilline (droite)).

En revanche, d'après les résultats présentés dans les Figures n°23 et 24, il ressort que les extraits aqueux et hydro-éthanoliques des écorces et des membranes de la grenade présentent des zones d'inhibition pour les concentrations testées contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ceci se traduit par que nos extraits des écorces et membranes de *Punica granatum* L. (à différentes concentrations testées) présentent un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus*. Cette même sensibilité a été observée avec la gentamicine

(dont le diamètre d'inhibition est 30,30mm), alors qu'une résistance est observée avec l'ampiciline (Figure n°25).



Figure n°23: Test d'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis à vis les extraits des écorces de la grenade (*Punica granatum* L.).



Figure n°24: Test d'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis à vis les extraits des membranes de la grenade (*Punica granatum* L.).

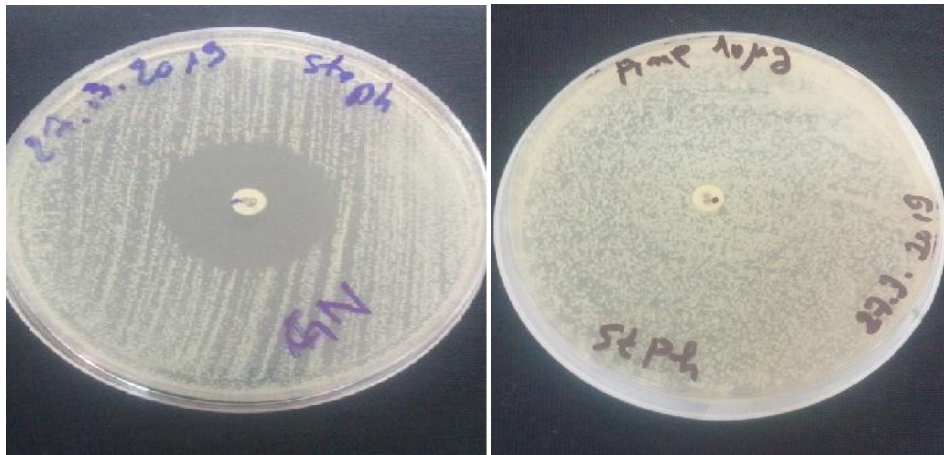


Figure n°25: Test d'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis à vis les antibiotiques de référence (la gentamicine (gauche) et l'ampicilline (droite)).

Après la mesure des zones d'inhibition ainsi formés, les moyennes des valeurs des deux répétitions sont regroupées dans le tableau suivant:

Tableau 07: Les diamètres des zones d'inhibition des extraits des écorces et des membranes de la grenade contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Concentration Extrait	C ₁ (10 mg/ml)	C ₂ (5 mg/ml)	C ₃ (2,5 mg/ml)	C ₄ (1,5 mg/ml)
ÉCA	13,91 mm	11,98 mm	9,94 mm	9,83 mm
ÉCÉ	11,80 mm	9,12 mm	8,89 mm	7,87 mm
MRA	13,95 mm	10,59 mm	8,75 mm	-
MRÉ	12,67 mm	10,00 mm	8,33 mm	7, 02 mm

L'effet antibactérien des extraits étudiés augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait testé. En basant sur les valeurs des diamètres des zones d'inhibition, les extraits aqueux des deux échantillons montrent un effet antibactérien plus ou moins élevé par rapport aux extraits hydro –éthanoliques.

Nos résultats montrent qu'il n'ya pas une grande différence de l'activité antibactérienne entre les extraits des écorces et des membranes de la grenade contre la souche de *Staphylococcus aureus*.

Discussion générale

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont accordé une attention particulière à l'utilisation de résidus provenant en particulier de l'industrie alimentaire, y compris les écorces de fruit *Punica granatum L.* (Marchi *et al.*, 2015; Jalal *et al.*, 2018).

Tandis que, on rencontre un manque des données de recherche dans la littérature qui misent en évidence les activités biologiques de l'endocarpe du fruit de *Punica granatum L.* (les membranes internes qui entourent les cavités).

Dans cette présente étude, les écorces ainsi que les membranes de grenade sont utilisés séparément pour déterminer leurs contenus en composés phénolique et pour l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de leurs extraits aqueux et hydro-éthanoliques.

Le rendement

L'extraction est la première étape d'isolement des composés antioxydants majoritaires à partir des échantillons des plantes. Le rendement d'extraction de ces composés à partir de matières végétales est principalement influencé par les conditions dans lesquelles le processus d'extraction liquide-solide est effectué pour séparer une fraction soluble d'un solide perméable (Wang *et al.* (2011).

Au vu de nos résultats, il est avéré qu'un mélange éthanol (70ml) – eau (30ml) donne les meilleurs pourcentages du rendement d'extraction par rapport à un extrait aqueux. Ceci est aussi déterminé dans une étude faite par Malviya *et al.* (2014), dans laquelle le rendement d'extraction est 13% pour un extrait éthanolique (70%) des écorces de grenade, et un rendement de 6% est noté pour l'extrait aqueux (100% d'eau) de ce même échantillon.

Ces rendements sont nettement inférieurs à ceux obtenus par nos extraits (50.2% pour ÉCÉ et 25.2 % pour ÉCA). Par contre Shibani *et al.* (2012) ont enregistré un rendement d'extraction de 37% pour l'extrait aqueux des écorces. Pour ce même type d'extrait ÉCA, les rendements d'extraction de deux variétés égyptiennes rapportés par Zaki *et al.* (2015) sont de 17.1% et 12.5%. Ces résultats sont aussi nettement moins que ceux trouvés dans notre étude pour l'extrait aqueux des écorces.

Il est prouvé que les composés phénoliques sont des constituants polaires et par conséquent, les solvants polaires sont de meilleurs agents d'extraction d'antioxydants actifs issus de plantes. Un mélange de méthanol, d'éthanol, d'acétone et d'eau s'est avéré être un

meilleur extractant des composés phénoliques actifs des écorces de grenade (**Shiban et al., 2012**).

De même, l'eau en tant que solvant respectueux de l'environnement s'est avérée très efficace pour l'extraction d'antioxydants à partir des écorces de grenade dans des études antérieures (**Malviya et al., 2014**).

En effet, le rendement d'extraction et l'activité antioxydante du matériel végétal dépendent fortement de la nature du solvant d'extraction en raison de la présence de différents composés antioxydants de caractéristiques chimiques et de polarités variables, qui peuvent ou non être solubles dans un solvant donné (**Marchi et al., 2015**).

Screening phytochimique

Une évaluation phytochimique a été réalisée pour la détection qualitative de divers constituants chimiques permettant de détecter la présence d'une entité active qui induit une réponse pharmacologique majeure. Nos extraits ont prouvé une forte présence des phénols et tannins, ainsi les flavonoïdes, les quinones, les terpénoïdes, les sucres réducteurs, et les saponines.

Les résultats du screening phytochimique des extraits des écorces sont similaires à ceux trouvés par **Jayaprakash et Sangeetha (2015)**, sauf qu'une absence des alcaloïdes a été noté dans nos extraits, ainsi leur extrait éthanolique des écorces a noté l'absence des tannins tandis que notre extrait a noté une forte présence des tannins.

De même pour les résultats de **Ali Redha et al. (2018)**, ils sont semblables de ceux trouvés dans l'extrait ÉCA. **Rajan et al. (2011)** signalent par des analyses qualitatives la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de composés phénoliques, de tannins, de lignines, de graisses et d'huile, d'inuline, de glycosides cardiaques et de glucides, dans des extraits aqueux et alcooliques des écorces de grenade.

Il convient de noter que des disparités concernant la présence / l'absence de composés phytochimiques diffère selon le cultivar, la région de culture, le climat, la maturité, les pratiques de culture et les conditions de stockage (**Viuda-Martos et al., 2010; Abd El Mageid et al., 2016**).

Dosage des composés phénoliques

En raison de la présence d'un large éventail de composés phytochimiques dans les écorces de la grenade, on peut prédire qu'ils ont des valeurs médicinales significatives (**Ali**

Redha et al., 2018). Pour cela, le choix de quantifier (doser) les composés phénoliques parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que ces composés ont des activités biologiques très importantes.

Les teneurs en phénols totaux des extraits étudiés varient entre $514,28 \pm 0,05$ et $104,28 \pm 0,019$ mg EAG/g de MS, ils semblent être supérieurs par rapport à la teneur de $91,2 \pm 09,5$ mg EAG/g de MS pour l'extrait ÉCA étudié par **Shiban et al. (2012)**. **Lairini et al. (2014)** ont trouvés un taux de $18 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait ÉCA préparé par une infusion, qui semble être plus faible que nos résultats, également pour la teneur de $143,5 \pm 4,1$ mg GAE/100 g de ce même extrait qui est enregistrée par **Altunkaya, 2014**. Le choix du solvant et les méthodes d'extraction affectent également la concentration en phénols totaux (**Altunkaya, 2014**).

Similaire à nos résultats, **Malviya et al. (2014)** ont rapporté que la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux a été détectée dans les extraits aqueux, tandis que la teneur la plus faible a été obtenue dans les extraits eau à 30% : éthanol à 70%. Par contre **Manasathien et al. (2012)** ont trouvés que les extraits éthanoliques (70%) des écorces présentent des teneurs en phénols totaux élevées par rapport à l'extrait aqueux, qui sont respectivement de $449,60 \pm 4,40$ et $380,54 \pm 5,87$ mg GAE/mg de MS, ces teneurs sont nettement supérieures à celles enregistrées pour nos extraits.

Les teneurs en composés phénoliques enregistrées par nos extraits des écorces et des membranes de grenade révèlent qu'elles sont une source très riche en ces composés.

La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus. Le type de standard utilisé dans le dosage peut aussi changer les résultats (**Ghedadba et al., 2015**). En plus, les différences constatées peuvent être attribuées au fait que les phénols constituent un groupe hétérogène de mélanges complets de substances organiques dont la qualité et la quantité varient en fonction du stade de croissance, des conditions écologiques, des conditions d'extraction, d'autres facteurs sur lesquels sont extraits les composés phénoliques (**Shiban et al., 2012 ; Al-Rawahi, 2014 ; Jalal et al., 2018**).

Les teneurs en flavonoïdes de nos extraits des écorces et des membranes de grenade varient entre $530 \pm 0,01$ et $173 \pm 0,0008$ mg ER/ g de MS, et les teneurs en tannins condensés varient entre $92,33 \pm 0,004$ et $69 \pm 0,001$ mg EC/g de MS.

Or, les teneurs en tannins condensés peuvent être variables aussi en raison de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tannins aux plusieurs voie de dégradation

(l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions culturales, climatiques, pédologiques ou le stress de prédation (**Ghedadba et al. , 2015**).

En effet, il convient de noter que nos résultats de dosage des composés phénoliques confirment fortement leurs révélations dans les tests primaires de screening phytochimiques, dont une abondance intense de ces composés est indiquée.

Il a été montré que l'écorce de fruit de *Punica granatum L.* est riche en polyphénols qui représentent la principale catégorie des composés phytochimiques présente dans cette partie du fruit (**Dahham et al., 2010 ; Al-Rawahi et al., 2014**).

Activité antioxydante

En plus de leur contribution aux propriétés chromatiques et sensorielles des fruits et des légumes, les composés phénoliques jouent également un rôle très important dans la protection contre l'oxydation *in vivo* et *in vitro* (**Shiban et al., 2012**). Ils ont été largement étudiés pour leur capacité antioxydante, qui dépend de leurs propriétés de piégeage des radicaux et / ou de chélation des métaux de transition (**Akhtar et al., 2015**).

Dans cette présente étude, trois tests (DPPH, ABTS, FRAP) sont réalisés afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits des écorces et des membranes de la grenade.

L'activité de piégeage de DPPH[•] a été largement utilisée pour détecter l'activité antiradicalaire de différents échantillons, en raison de sa sensibilité aux concentrations les plus faibles de principes actifs provenant de sources naturelles (**Shiban et al., 2012; Patel et al., 2017**).

Les extraits de nos échantillons présentent une activité antiradicalaire vis-à-vis le piégeage des radicaux DPPH[•], avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre 550 et 1251 µg/ml, qui sont supérieures à celle de l'acide ascorbique. Par rapport aux autres travaux, elles semblent être aussi supérieures, dont **Rajan et al. (2011)** ont noté une IC₅₀ de 135.27±39.30 µg/ml pour l'extrait ÉCA, également **Manasathien et al. (2012)** ont indiqués des IC₅₀ pour piéger les radicaux DPPH égal à 121.65±2.66 µg/ml pour l'extrait ÉCÉ (70%), et 151.78±2.70 µg/ml pour l'extrait ÉCA.

Malviya et al. (2014) ont signalés que l'extrait aqueux des écorces des grenade (ÉCA) montre une activité de piégeage des radicaux du DPPH élevée par rapport l'extrait éthanolique (70 %), ceci est similaire à la différence notée entre nos extraits testés.

Plusieurs études, **Shiban et al. (2012); Lairini et al. (2014); Bharani et al. (2016); Patel et al. (2017); Jalal et al. (2018); Redha et al. (2018)** ont prouvés l'activité

antioxydante des extraits des écorces de grenade *Punicagranatum*L.vis à vis le piégeage des radicaux libres DPPH'.En effet, le contenu phénolique des écorces de grenade est responsable de la puissante activité antioxydante (**Patel et al., 2017**)

En addition, **Barathikannan et al.(2016)** mentionnent que les extraits des écorces du fruit de grenade sont des puissants réducteurs des radicaux DPPH similaires à la catéchine. Il est probable que ces extraits possédait la capacité de donner des protons et en association avec un certain nombre de groupes hydroxyle pour stabiliser les radicaux libres. Cette capacité était clairement liée aux composés phénoliques totaux des extraits des écorces (**Shiban et al., 2012**), en raison de leurs structures chimiques et de leurs propriétés redox. Étant donné que leurs groupes hydroxyle permettent le piégeage des radicaux libres, la concentration en composés phénoliques totaux pourrait être utilisée comme base d'évaluation rapide de l'activité antioxydante. Les flavonoïdes, y compris les flavanols, les flavones et les tannins, sont des métabolites secondaires des plantes dont l'activité dépend de la présence de groupes OH libres (**Bharani et al., 2016**).

De ce sens, et d'après nos résultats, l'ordre de classer les extraits des écorces et membranes de la grenade par rapport à ses activités antiradicalaires vis à vis les radicaux DPPH, est nettement similaire et proportionnel à ces concentrations en composés phénoliques de ces extraits ainsi dosés.

D'autre part, le test de décoloration par les cations de radicaux ABTS est une autre technique habituellement utilisée pour étudier l'activité antioxydante. La diminution de la couleur indique une réduction du radical ABTS (**Malviya et al., 2014**).

Selon les résultats de ce test, les extraits de nos échantillons présentent une activité antioxydante vis-à-vis la réduction des cations ABTS⁺, les valeurs d'IC50 obtenues varient entre 315 et 832 µg/ml. **Rajan et al. (2011)** ont rapportés que l'extrait aqueux des écorces présente une valeur d'IC50 inférieur à nos extraits et qui est égale à 34.78±14.04 µg/ml.

Dans ce même test, l'extrait éthanolique (70%) de notre échantillon des écorces a montré une activité antioxydante légèrement élevée par rapport à l'extrait aqueux, ceci est aussi noté dans l'étude réalisée par **Malviya et al.(2014)**.

La différence des valeurs entre les deux méthodes (DPPH et ABTS) est probablement due aux différences de capacité de réaction des radicaux libres dans les dosages et aux vitesses de réaction des antioxydants dans les conditions réelles d'analyse. La structure chimique des antioxydants dans les préparations à base de fruits varie

suffisamment pour donner différents niveaux de capacité antioxydante lorsque deux méthodes sont comparées (**Jalal et al., 2018**).

Le test de FRAP réalisé dans cette présente étude, a permis de trouver des résultats intéressants, dont les deux extraits des écorces de *Punica granatum L.*, ainsi que l'extrait éthanolique des membranes ont montré un pouvoir réducteur du fer nettement supérieur par rapport à l'acide ascorbique, qui est utilisé comme un standard dans ce test. Même pour l'extrait aqueux des membranes, il a présenté une similitude du pouvoir réducteur du fer par rapport à ce même standard.

Shiban et al. (2012) notent que l'efficacité d'extraction des antioxydants, mesurée par le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP), était supérieure dans les extraits des écorces avec le mélange de solvants.

Il convient de noter que le pouvoir réducteur d'un composé constitue un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. La capacité antioxydante basée sur les mécanismes de piégeage des radicaux libres et d'oxydo-réduction peut être déterminée par plusieurs méthodes. Cependant, l'efficacité de chaque extrait diffère vis à vis divers radicaux libres en fonction de la méthodologie d'analyse utilisée, ce qui reflète la complexité des mécanismes et la diversité de la nature chimique du matériel végétal (**Rajan et al., 2011**).

La qualité des extraits naturels et leur performance antioxydante dépendent non seulement de la qualité initiale de la plante, de son origine géographique, du climat, de la date de récolte et de stockage, mais également de facteurs environnementaux et technologiques d'effet équivalent sur les activités antioxydantes des sources résiduelles (**Marchi et al., 2015**). Les antioxydants sont principalement constitués de composés phénoliques qui ont un fort potentiel de piégeage des radicaux libres (**Zakiet al., 2015**). Étant donné que le pouvoir réducteur était directement lié à la teneur en phénol des extraits (**Shiban et al., 2012**).

L'écorce (péricarpe, peau) représente environ 60% du poids du fruit de la grenade, et possède un contenu phénolique total et une activité antioxydante plus élevées que la pulpe. Il a été signalé que les peaux de grenade avaient une activité antioxydante supérieure à celles des fleurs, des feuilles et des graines (**Malviya et al., 2014**). L'activité antioxydante a été proposée pour jouer un rôle vital dans diverses activités pharmacologiques (**Patel et al., 2017**).

Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des écorces de *Punica granatum L.* peut indiquer la présence de toxines métaboliques ou de composés antimicrobiens à large spectre agissant à la fois sur les bactéries Gram + et Gram- (Malviya *et al.*, 2014; Barathikannan *et al.*, 2016).

Dans cette présente étude, les extraits des écorces et des membranes de la grenade ont montrés un effet antibactérien contre la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, tandis que la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922 a présenté une résistance totale à tous les extraits ainsi testés.

Les différentes concentrations (10 - 5 - 2,5 - 1,5 mg/ml) des extraits testés ont permet d'obtenir une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 13,95 et 7, 02 mm, pour lesquels il n'y a pas une grande différence entre les extraits des deux échantillons, avec un développement de l'effet antibactérien proportionnel à la concentration de l'extrait testé.

Dans le même contexte, nos extraits des écorces ont montrés des diamètres des zones d'inhibition inferieurs par rapport à ceux trouvés par Malviya *et al.*, 2014 où des diamètres de 22.6 ± 0.31 mm pour ÉCA et 22.9 ± 0.44 mm pour ÉCÉ ont été obtenus. Lairini *et al.* (2014) ont signalés que l'extrait ÉCA montre un remarquable effet antimicrobien à partir de 0,12 mg/ml d'extrait pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (diamètre d'inhibition de $9,03 \pm 0,15$ mm) et 0,31 mg/ml pour *Escherichia coli* ATCC 25922 ($10,04 \pm 0,03$ mm).

Bharani *et al.* (2016) ont trouvés que pour *S. aureus*, l'extrait ÉCA donne une zone d'inhibition d'environ 11 mm à 10 µL et 21 mm à 100 µl. Tandis que *E. coli* a montré une forte sensibilité à la concentration élevée d'extrait ÉCA (100 µL, 50 µL, 10 µL avec des diamètres de 22, 21 et 7 mm de zone d'inhibition ont été observés aux concentrations respectives). Pour ce même extrait, Ali Redha *et al.* (2018) ont rapportés qu'il était également très efficace pour inhiber la croissance de *S. aureus* (21.00 ± 1.73 mm), et *E. coli* ($19,67 \pm 0,58$ mm), en utilisant la méthode des puits (50 µl d'extrait brut). Alors que Fawole *et al.* (2012) signalent qu'aucun des extraits aqueux n'a présenté une bonne activité antibactérienne à la concentration de dépistage la plus élevée ($> 12,5$ mg / ml) contre les deux bactéries ainsi mentionnées. De même, le diamètre de la zone d'inhibition contre *S. aureus* et *E. coli* s'est révélé comparativement inférieur à celui des autres souches bactériennes (Malviya *et al.*, 2014).

Pour l'extrait éthanolique (70%) des écorces, **Nozohour et al. (2018)** ont montrés un effet antibactérien ($27.5 \pm 1.0\text{mm}$) contre *S. aureus*, en imprégnant 30 μl de 9 mg/ml d'extrait. En effet, dans le cadre d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des écorces de *Punica granatum L.*, **Lairini et al. (2014)** notent que les bactéries Gram+ sont les plus susceptibles par comparaison avec les bactéries Gram-; ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-.

Des études antérieures ont également été menées sur l'activité antibactérienne des écorces de grenade et différents résultats ont été révélés par différents chercheurs (**Malviya et al., 2014**). Cette activité antimicrobienne est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols. Cela est confirmé par d'autres recherches qui ont attribué l'activité antimicrobienne à la présence des polyphénols (**Lairini et al., 2014**).

La méthode de toxicité des polyphénols contre les microbes peut être liée à l'inactivation des adhésines microbiennes, à l'inhibition des protéases, aux interactions non spécifiques avec les glucides et aux protéines de transport de l'enveloppe cellulaire (**Bharani et al., 2016**). Cependant, les extraits des écorces de la grenade étant des mélanges complexes de métabolites, il est difficile de localiser tous les métabolites responsables de l'activité pharmacologique (**Fawole et al., 2012**). Également, nos extraits ont prouvé une forte présence des phénols et les flavonoïdes, les quinones, les terpénoïdes, les sucres réducteurs, les saponines et les tannins. Ces derniers sont les principaux composants de ses extraits impliqués dans le potentiel antimicrobien qui pourrait être due à l'aptitude de ces composés à précipiter les protéines, provoquant une fuite de la membrane cellulaire du microorganisme et une lyse cellulaire susceptible d'entraîner la mort cellulaire (**Fawole et al. (2012)**). Il a également été établi que les flavonoïdes inhibent la germination des spores d'agents phytopathogènes (**Bharani et al., 2016**).

Récemment, **Nozohour et al. (2018)** mentionnent que l'effet synergique de l'association d'antibiotique avec des extraits de grenade contre les bactéries résistantes peut conduire à de nouveaux choix pour le traitement des maladies infectieuses.

Conclusion

Les écorces et les membranes (endocarpe) du fruit de *Punica granatum L.*, sont considérées comme des parties non comestibles et notamment des sous-produits de l'industrie alimentaire. Des produits à valeur ajoutée pourraient être fabriqués à partir de ces déchets, qui sont riches en composés phytochimiques bioactifs, tout en retournant vers l'application de la phytothérapie traditionnelle, mais plus renforcée par des recherches scientifiques récentes.

Dans ce cadre, cette présente étude a porté sur la réalisation des tests préliminaires pour analyser qualitativement les quatre types d'extraits de *Punica granatum L.* (écorces et membranes) obtenus avec les deux types de solvant (aqueux et hydro-éthanolique) par un screening phytochimique suivie par un dosage des composés phénoliques majoritaire dans les quatre extraits et terminons par une étude des activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) de ces même extraits.

Les résultats obtenus dans notre étude nous ont permis d'enregistrer des rendements d'extraction des extraits aqueux et hydro-éthanoliques (70%) des écorces et des membranes de la grenade qui varient entre 25,2 et 57 %. Par la suite les analyses phytochimiques qualitatifs de ces quatre extraits indiquent la présence de divers métabolites principalement les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins galliques, les terpénoïdes, les sucres réducteurs, les saponines et les quinones.

Le dosage des composés phénoliques serve à quantifier ces teneurs dans les extraits étudiés, la teneur la plus importante en phénols totaux $514,28 \pm 0,05$ mg EAG/g de MS a été enregistré pour l'extrait ÉCA et la moins faible pour l'extrait ÉCA $104,28 \pm 0,019$ mg EAG/g de MS. Les teneurs en flavonoïdes situées entre $173 \pm 0,0008$ et $530 \pm 0,01$ mg ER/g de MS pour l'extrait MRA et ÉCA respectivement. Ainsi des teneurs en tannins condensés comprises entre $69 \pm 0,001$ et $92,33 \pm 0,004$ mg EC/g de MS pour l'extrait MRA et ÉCA respectivement.

Trois test sont réalisés (DPPH, ABTS et FRAP) dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des quatre extraits étudiés. Les résultats obtenus ont révélé que ces extraits montrent une activité antioxydante très intéressante vis à vis le piégeage des radicaux libres DPPH^{*}, et les radicaux cations ABTS⁺, dont la valeur d'IC 50 la plus importante est $550 \mu\text{g/ml}$ enregistrée dans l'extrait ÉCA pour le test de DPPH, et $315 \mu\text{g/ml}$ dans l'extrait ÉCÉ pour le test de l'ABTS. De plus, les extraits des écorces et membranes de la grenade présentent un pouvoir réducteur (estimé par le test de FRAP) très important et puissant que

le standard utilisé qui était l'acide ascorbique, dont les quatre extraits testés ont présentés des valeurs d'absorbances élevées par rapport à l'acide ascorbique.

Ces activités sont attachées significativement avec le contenu en composés phénoliques qui sont des majeurs antioxydants. Au vu générale de nos résultats obtenus dans les analyses qualitatifs et quantitatives, les extraits des écorces du fruit de *Punica granatum L.* présentent de très bons résultats dans tous les tests ainsi réalisés par rapport aux extraits des membranes internes de ce même fruit.

Par ailleurs, deux souches pathogènes sont testées pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits mentionnées avec différentes concentrations (10 - 5 - 2,5 - 1,5 mg/ml). Tous les extraits ont montrés un effet antibactérien contre la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 13,95 et 7,02 mm obtenus respectivement avec la concentration de 10mg/ml de l'extrait MRA et la concentration de 1,5mg/ml de l'extrait MRÉ, pour lesquels il n'y a pas une grande différence entre les extraits des deux échantillons. Tandis *Escherichia coli* ATCC 25922 a présenté une résistance totale contre toutes les concentrations des extraits ainsi testés.

A la lumière de ces résultats obtenus et dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait judicieux de :

- Réaliser d'autres travaux similaires qui pourraient servir à développer des techniques de valorisation des parties non comestibles du fruit de *Punica granatum L.* comme agent de conservation naturel à la fois antioxydant et antimicrobien dans l'industrie agroalimentaire, et également dans le cadre de synthétiser des produits pharmacologiquement actifs ;
- Réaliser une extraction avec d'autres solvants tel que le méthanol et l'acétone pures ou en mélange avec l'eau ;
- Etudier et comparer avec d'autres modes d'extraction traditionnelles à savoir une infusion, une décoction ou autres ;
- Etudier l'effet de la méthode du séchage par comparaison à différents processus.
- Identifier et purifier des molécules des composés phénoliques par des techniques chromatographique notamment la chromatographie liquide à haute performance HPLC ;
- Faire une étude comparative entre des variétés d'autres régions algériennes, en vue d'évaluer l'effet de la provenance ;
- Tester l'activité antifongique et même l'activité antibactérienne des autres souches ;

- Réaliser une évaluation *in vivo* supplémentaire nécessaire pour confirmer les propriétés biologiques obtenues.

Références bibliographiques

Aboulgasem, G. J., et Azab, A. E. (2014). The Potential Protective Effects of Pomegranate Juice Against (S)-(-)-1-Methyl-2-(3-Pyridyl) Pyrrolidine (+)-Bitartrate Salt Induced Serum Biochemical Changes in Rabbits. *Int. J. Sci. Res*, 4(11), 360-371.

Agostini-Costa, T. D. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., et Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites. In *Chromatography and its applications*. IntechOpen.

Akhtar, S., Ismail, T., et Layla, A. (2018). Pomegranate Bioactive Molecules and Health Benefits. *Bioactive Molecules in Food*, 1-27.

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., et Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*, 174, 417-425.

Ali Redha, A. A., Hasan, A. M., et Mandeel, Q. (2018). Phytochemical Determinations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Nat Prod Chem Res*, 64, 15-20.

Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., et Mesbah, S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 87, 13-21.

Al-Rawahi, A. S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A. S., et Rahman, M. S. (2014). Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum* L.) cultivated in Oman. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(3), 315-331.

Alshammari, N. D., Fatima, N., et Nayeem, N. (2017). *Punica granatum* Rind, a Traditional Herbal Medicine: Effect on wound healing. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 6(1).

Altunkaya, A. (2014). Potential antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts and synergism with added phenolic antioxidants in a liposome system: a preliminary study. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 121-131.

- Ameh, S. J., Obodozie, O. O., Inyang, U. S., Abubakar, M. S., et Garba, M. (2010).** Current phytotherapy-A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 072-081.
- Anulika, N. P., Ignatius, E. O., Raymond, E. S., Osasere, O. I., et Hilda, A. (2016).** The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *International journal of technology enhancements and emerging engineering research*, 4(8), 1-8.
- Ashton, R., Baer, B., et Silverstein, D. (2006).** The Incredible Pomegranate: Plant and Fruit. *Third Millennium Publishing*, 162.
- Barahona, T., Chandía, N. P., Encinas, M. V., Matsuhira, B., et Zúñiga, E. A. (2011).** Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 529-535.
- Barathikannan, K., Venkatadri, B., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., Agastian, P., Arasu, M. V., ... et Kim, Y. O. (2016).** Chemical analysis of Punica granatum fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 264.
- Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., et Ehile, E. E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217-225.
- Bharani, R. A., et Namasivayam, S. K. R. (2016).** Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract-A Study On Potential Source Of Pharmacological Activities. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(4), 282-290.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., et Kumar, K. (2013).** Medicinal uses of *Punica granatum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5), 28-35.
- Bidri, M., et Choay, P. (2017).** Regain d'intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. *Phytothérapie*, 15(2), 91-103.

Boizot, N., et Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*, 79-82.

Bonev, B., Hooper, J., et Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(6), 1295-1301.

Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Dicko, A., et Soulimani, R. (2008). Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie*, 6(2), 71-74.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., et Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Brillouet, J. M., Romieu, C., Schoefs, B., Solymosi, K., Cheynier, V., Fulcrand, H., Verdeil, J.L., et Conéjéro, G. (2013). The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany*, 112(6), 1003-1014.

Capasso, F., Gaginella, T. S., Grandolini, G., et Izzo, A. A. (2003). *Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine*. Springer Science & Business Media.

Carillon, A. (2009). Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXI^e. In *Conférence SIPAM Djerba Island*.

Chandra, R., Babu, D. K., Jadhav, V. T., Jaime, A., et Silva, T. D. (2010). Origin, history and domestication of pomegranate. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 2, 1-6.

Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., et Teissèdre, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.

Croteau, R., Kutchan, T. M., et Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.

Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., et Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 9(3), 273-281.

Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibijbijen, J., et Nassiri, L. (2015). Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens L.*, *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera L.* *Journal of Applied Biosciences*. 87(1), 8094-8104.

Desmier, T. (2016). Les antioxydants de nos jours: définition et applications. Thèse de Doctorat, Université De Limoges.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.

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

El Mageid, M. M. A., Salama, N. A., Saleh, M. A. M., et Abo-Taleb, H. M. (2016). Evaluation of antidiabetic, hypocholesterolemic of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice powders and peel powder extracts in male albino rats. *IOSR-JPBS*, 11(6), 53-64.

EL-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., et Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique d'une plante medicinale: *Mentha Spicata L.* *Am. J. innov. res. appl. Sci*, 7(4), 226-233.

Evreinoff, V. A. (1957). Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 4(3), 124-138.

Fawole, O. A., Makunga, N. P., et Opara, U. L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 200.

Ferreira, T. S., Moreira, C. Z., Cária, N. Z., Victoriano, G., SILVA, J., et Magalhães, J. C. (2014). Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(2), 290-298.

Fourasté, I. (200). Étude botanique - Le Grenadier – Punicaceae. Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse. *Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal, INSTITUT KLORANE.*

Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselfela, H., et Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.

Hmid, I. (2013). Contribution a la valorisation alimentaire de la Grenade Marocaine (*Punica Granatum L.*): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. (*Doctoral dissertation, Université d'Angers*).

Idlimam, A., Kane, C. E., et Kouhila, M. (2007). Single layer drying behaviour of grenade peel in a forced convective solar dryer. *Revue des Energies Renouvelables*, 10(2), 191-203.

Iserin P., (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed., Paris, 10-335.

Jaitak, V., Sharma, K., Kalia, K., Kumar, N., Singh, H. P., Kaul, V. K., et Singh, B. (2010). Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(2), 142-147.

Jalal, H., Pal, M. A., Hamdani, H., Rovida, M., et Khan, N. N. (2018). Antioxidant activity of pomegranate peel and seed powder extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 7(5), 992-997.

Jayaprakash, A., & Sangeetha, R. (2015). Phytochemical screening of *Punica granatum* Linn. peel extracts. *J Acad Indust Res*, 4, 160-162.

Jimenez-Garcia, S. N., Vazquez-Cruz, M. A., Guevara-Gonzalez, R. G., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernandez, A., et Feregrino-Perez, A. A. (2013). Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(2), 67-78.

Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*, 13(2).

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., et He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol*, 2, 377-392.

Khan, S., Patel, A., et Bhise, K. S. (2017). Antioxidant activity of pomegranate peel powder. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7(2), 81-84.

Laccourreye, O., Werner, A., Laccourreye, L., et Bonfils, P. (2017). La phytothérapie en pratique clinique en otorhinolaryngologie: apport, limites et risques. *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale*, 134(2), 90-95.

Lairini, S., Bouslamti, R., Zerrouq, F., et Farah, A. (2014). Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante (Enhancement of the aqueous extract of the bark of *Punica granatum* fruit through the study of its antimicrobial and antioxidant activities). *J Mater Env. Sci*, 5(S1), 2314-2318.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 1543-1580.

Létard, J. C., Costil, V., et Dalbiès, P. (2015). Phytothérapie-principes généraux. HEGEL, 5(1).

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*.
- Malviya, S., Jha, A., et Hettiarachchy, N. (2014).** Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of food science and technology*, 51(12), 4132-4137.
- Manasathien, J., Indrapichate, K., et Intarapichet, K. O. (2012).** Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. *Global Journal of Pharmacology*, 6(2), 131-141.
- Marchi, L. B., Monteiro, A. R., Mikcha, J., Santos, A., Chinelatto, M., Marques, D., ... et Costa, S. C. (2015).** Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Pomegranate Peel Extract (*Punica Granatum* L.) Under Different Drying Temperatures. *Chemical Engineering Transactions*, 44, 121-126.
- Mazid, M., Khan, T. A., et Mohammad, F. (2011).** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, 3(2), 232-249.
- Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., et Ayachi, A. (2013).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. *Lebanon Scientific Journal*, 14(1), 49-60.
- Mehta, D., et Mehta, M. (2012).** *Punica granatum* L.(Punicaceae): Lifeline for Modern Pharmaceutical Research. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*.
- Meier, B., Falch, B., et Eltbogen, R., (2013).** La Phytothérapie – la base bien documentée de la Médecine classique. SSPM, Organisations Du Corps Medical. Bulletin des médecins suisses, 94(5), 161-163.
- Melgarejo, P., et Valero, D. (2012).** II International Symposium on the Pomegranate, Madrid, Spain, 19-21 October 2011. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, (103), 1-337.

Meziane, Z. K., (2015). Perspectives de développement et de valorisation des sous-produits de la grenade (*Punica granatum L.*) de la zone de la Mitidja (nord Algérie). Symposium international Société, Agro-Biotechnologie, Environnement et Développement Durable du : 27 au 29 Mai 2015.

Meziane, Z. K., Elothmani, D., et Benhadja, L. B. (2016). Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in northern Algeria. *Fruits*, 71(1), 17-26.

Mondal, S., (2018). UNIT – II: Terpenes. *Lecturer Notes _B. Pharm 7th Semester _GITAM University*, 1-14.

Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Makunga, N. P., et Opara, U. L. (2016). Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 143.

Najjaa, H., Zouari, S., Arnault, I., Auger, J., Ammar, E., et Neffati, M. (2011). Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum L.* et *Allium ampeloprasum L.* *Acta Botanica Gallica*, 158(1), 111-123.

Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R., et Fartashvand, M. (2018). Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(1), 32-36.

Padmaja, A., et Prasad, N. B. L. (2011). Pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extract as a source of natural antioxidant. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(3), 171.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47, 1-15.

Popovici, C., Saykova, I., et Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.

Prasad, D., et Kunnaiah, R. (2014). *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(4), 428.

Qamar Abbas S, Zara B, Rizwan S, et Tahir Z. (2018). Nutritional and Therapeutic Properties of Pomegranate. *Scho J Food & Nutr.* 1(4), 115-120.

Rahmani, A. H., Alsahli, M. A., et Almatroodi, S. A. (2017). Active constituents of pomegranates (*Punica granatum*) as potential candidates in the management of health through modulation of biological activities. *Pharmacognosy Journal*, 9(5).

Rajan, S., Mahalakshmi, S., Deepa, V. M., Sathya, K., Shajitha, S., et Thirunalasundari, T. (2011). Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(3), 82-88.

Rasool Hassan, B. (2012). Medicinal plants (importance and uses). *Pharmaceut Anal Acta*, 3(10), e139.

Raven, P. H., Evert, R. F., et Eichhorn, S. E. (2014). *Biologia végétale*. Traduction de Jules Bouharmont. 3ème Ed., De Boeck, Bruxelles, p 30-34.

Sauvion, N., Calatayud, P. A., Thiéry, D., et Marion-Poll, F. (2013). *Interactions insectes-plantes*. Editions Quae.

Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., et Al-Zoreky, N. S. (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, 3(07), 991.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., et Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2), 191-198.

Stover, E. D., et Mercure, E. W. (2007). The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5), 1088-1092.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., et Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.

Syed, ND., Chamcheu, J. C., M Adhami, V., et Mukhtar, H. (2013). Pomegranate extracts and cancer prevention: molecular and cellular activities. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1149-1161.

Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., Hilali, A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L. Mater. Environ. Sci.*, 6 (4), 1111-1117.

Tirzitis, G., et Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1), 139–142.

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., et 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(6), 635-654.

Wald, E. (2009). Le grenadier (*punica granatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat, UHP-Université Henri Poincaré.

Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., et Du, L. (2010). Pomegranate: constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, 4(2), 77-87.

Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., et Atungulu, G. G. (2011). Extract of phenolics from pomegranate peels. *The open food science journal*, 5, 17-25.

Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286.

Wu, S., et Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules*, 22(10), 1606.

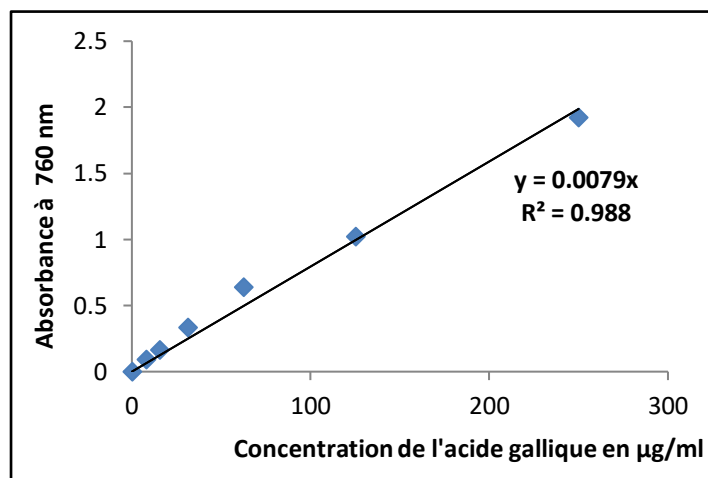
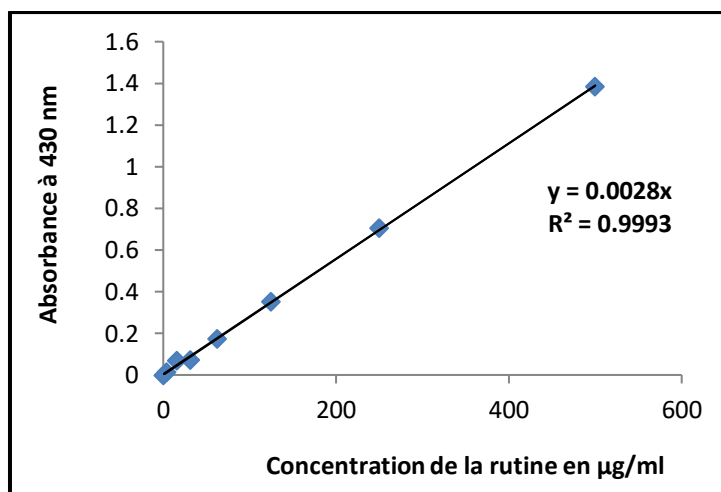
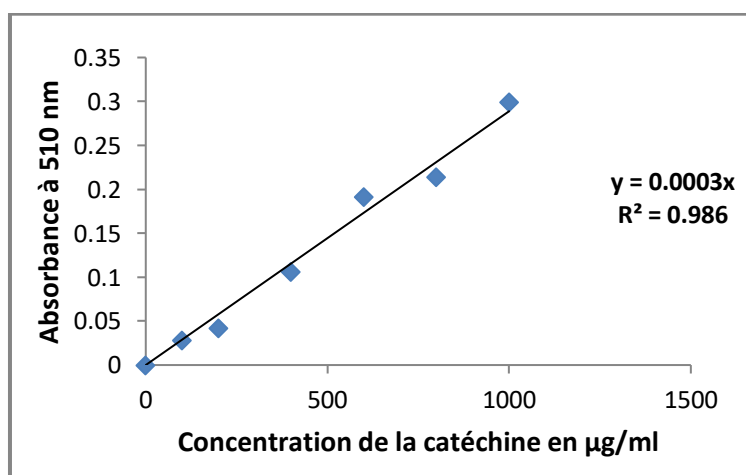
Yehia, H. M., Elkhadragey, M. F., et Moneim, A. E. A. (2011). Antimicrobial activity of pomegranate rind peel extracts. *African journal of microbiology research*, 5(22), 3664-3668.

Youbai, A., (2015). Contribution à l'étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes de la famille des Apiaceae récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Algérien). Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla, Ouargla, Algérie.

Zaki, S. A., Abdelatif, S. H., Abdelmohsen, N. R., et Ismail, F. A. (2015). Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Pomegranate Peels. *International Journal of Food Engineering*,1(2), 73-76.

Zimmer, N., et Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales*, 3 (9), 167-179.

Annexes

Annexe 1 : Les courbes d'étalonnage des différents standards du dosage phytochimique**Figure 01:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.**Figure 02:** Courbe d'étalonnage de la rutine.**Figure 02:** Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Annexe 3: Préparation du réactif et les concentrations des extraits et du standard dans le test d'ABTS

➤ Préparation de l'ABTS⁺ et K₂ SO₃:

Pour l'ABTS à 7 mM, dissoudre 0,036 g dans 100 ml d'eau distillée, calculée par la relation suivante : Concentration massique = Concentration molaire * masse molaire.

Donc: $3,6 \text{ g/l} = 7\text{mM} * 514,62\text{g/mol}$.

Et pour le K₂ SO₃ à 2,45 mM : dissoudre 0,0662g dans 100ml d'eau distillée. Mélanger en volumes égaux l'ABTS (7mM) et K₂ SO₃ de (2,45 mM) et incuber pendant 16 h à l'obscurité, ensuite juste avant l'utilisation, ce mélange est dilué par l'éthanol à fin d'atteindre une absorbance de 0,700 à 734 nm.

➤ Préparation des concentrations des extraits

A partir des résidus secs (extrait brut) des différents extraits, une solution mère de 1mg/ml est préparée pour chaque extrait, et par des dilutions de moitié on obtient les concentrations suivantes:

Tableau 1 : Les concentrations des extraits dans le test d'ABTS.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extrait	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Extrait aqueux d'écorces de grenade	500	125	62.5	31.25
Extrait hydro-éthanolique d'écorces de grenade	500	250	125	62.5
Extrait aqueux de membranes internes de grenade	500	250	125	62.5
Extrait hydro-éthanolique de membranes internes de grenade	500	250	125	62.5

➤ Préparation des concentrations du standard (l'acide ascorbique)

A partir d'une solution mère de 1mg/ml, une série de dilution de moitié est effectuée:

