



Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Ben M'Hidi Oum el Bouaghi

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie



N° d'ordre :

N° de série :

MÉMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de **Master en Biologie**

Filière : biotechnologie

Option : biotechnologie végétale

Intitulé :

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE SUIVIE PAR L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANT DE L'
ESPÈCE :**

PUNICAGRANATUM L.

Présenté par :

Merrouche Roumeissa et Bouras Soumia

Devant le jury:

Président :NebacheSeloua MBC Université d'Oum El Bouaghi

Encadreur :Kebaili ZoubirMAA Université d'Oum El Bouaghi

Examinatrice :Zaidisara MBC Université d'Oum El Bouaghi

Année universitaire : 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
وَالَّذِي يُضَوِّبُ الْمَوْتَاطِ
وَالَّذِي يُنَزِّلُ الْمَطَرَ
وَالَّذِي يُحْيِي الْمَوْتَى
وَالَّذِي يُحْيِي الْمَوْتَى
وَالَّذِي يُحْيِي الْمَوْتَى

Remerciement

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir

donné la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre encadreur, MAA

kebaili Zoubir , qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail.

Sa validité, ses grandes qualités scientifiques et humaines ont contribué au bon

déroulement de ce travail. Ses critiques et ses compétences étaient fortes et rassurantes.

Nous remercions les membres du jury d'avoir accepté de juger notre modeste travail :

MCBNebacheSeloua le president et MCB Zaidi Sara l'examineur.

Nous remercions également tous les membres de laboratoire de l'université d'O.M. B surtout Dr Djarmanemouammed et l'ingenieurDjouhraMansouri qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Merci à mes parents qui tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études et de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ces années.

Enfin que tous les étudiants de master de la promotion 2021 /2022, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à :

*A ma très chère mère **Nouna**,*

*La lanterne qui éclaire mon chemin et m'illumine de
douceur et d'amour,*

*A mon modèle et fierté, mon père **Hamid***

*En signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour
tout le soutien les sacrifices dont il a fait pour moi par mon*

*frère **Ahamanaet** ma sœur **Rimaet** son mari **Raouf**,*

*A tout ma famille élargie, mes amis et proches, surtout **khawlamerrouche***



Dédicace

Je dédie ce travail humble à ma famille et aux personnes les plus chères du monde, mes parents.

*À mon cher et bon père **Massoud***

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

*À ma chère mère **Nouna***

Vous êtes un exemple de dévouement qui ne cesse de m'encourager et de prier pour moi. Que Dieu Tout-Puissant vous protège avec santé, longue vie et bonheur.

*À mes sœurs **Nabila, Madiha, Samira***

*À mes frères **Bilal, Ossama, Lamin, Imad et Souhaib***

*À ma partenaire **Roumeisa** pour tous les moments surtout **Rima** de joie et de tristesse que nous avons passés ensemble et sa famille.*

À tous mes amis sans exception pour les aider et les encourager.

Enfin je le dédie à moi-même.



Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales

1-Définition des plantes médicinales6

2- Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....6

3-Utilisation.....7

4-Cueillettes et conservation.....7

4-1 Cueillettes.....7

4-2 Conservations et stockage.....8

5- Effets thérapeutiques du grenadier.....9

Chapitre II: Les métabolites primaires et secondaire

I. Les métabolites primaires.....12

II-Métabolisme secondaire.....13

II-1 Importance du métabolite secondaire.....14

II-2 Propriétés biologiques.....15

II-3 Les différents Types des métabolites secondaires.....15

-Les composés phénoliques.....15

1-Classification.....16

2-Voie de biosynthèse des principaux polyphénols26

3-Répartition de ces classes dans le fruit du grenadier.....28

4-Toxicité des composés phénoliques de la grenade34

Chapitre III: Etude botanique de grenade

I-Famille des Lythraceae.....36

I-1 Caractéristique.....36

I-2 Description.....37

I-3 les Genres.....38

II-l'espèce: (<i>punica granatum L</i>)	39
II-1 Classification (Position systématique).....	39
II-2 Origine et aire de répartition.....	39
II-3-Période de floraison.....	43
II-4-Description botanique.....	43
4-1 les feuille	44
4-2 les fleurs.....	45
4-3 les fruits.....	45
4-4 la baie.....	46
4-5 les graines.....	47
4-6 l'écorce.....	48
II-5 La composition chimique de <i>punicagranatum L</i>	48
II-6 Utilisation en médecine traditionnelle.....	52
7-Le grenadier en médecine traditionnelle.....	53
Chapitre IV: Activité antioxydant	
1-Définition.....	56
2-Les différents types d'antioxydants.....	56
2-1 Antioxydants endogènes.....	56
2-1-1Les antioxydants enzymatiques.....	56
2-1-2 Les antioxydants non enzymatique.....	57
2-2 Antioxydants exogènes.....	57
2.2.1. Les polyphénols	57
2.2.2. Les Vitamins.....	57
3- Méthodes d'évaluation de la présence d'antioxydants dans les plantes	58
3.1. Test DPPH.....	58
3-2 Test FRAP (FerricReducingAntioxidant Power).....	59
4-Utilisation des antioxydant.....	59
5-Les maladies liées au stress oxydatif.....	65
6-Classification des systèmes antioxydant.....	67

Deuxième partie : expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1-Matériel végétal.....	70
2-Préparation des échantillons de plantes.....	70
3-Méthodologie de travail.....	71
3-1 Récolte de la matière végétale.....	71
3-2 Technique de séchage.....	72
3-3 Préparation de l'extrait brut.....	72
3-3-1 Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes.....	72
3-3-2 Extraction par macération dans le méthanol (extraction solide-liquide)	72
3-3-3 Extraction par macération dans le méthanol (extraction liquide-liquide).....	72
3-3-5 Fractionnement de l'extrait brut (Extraction liquide- liquide).....	75
4-Analyses qualitatives (screening phytochimique).....	78
4-1 Réactions de caractérisation.....	78
4-2 Criblage des métabolites secondaires.....	78
-Criblage des polyphénols.....	78
-Criblage des flavonoïdes.....	78
5-Analyses quantitatives.....	79
5-1 Dosage des polyphénols totaux.....	79
5-2 Dosage des flavonoïde.....	82

Chapitre II : résultats et discussions

II-Screening phytochimique.....	86
2-Rendement d'extraction dePunicagranatumL.....	86
3-Rendements des extraits dePunicagranatum L.....	87
4-Quantification des composés phénolique.....	89
4-1 La teneur en polyphénols totaux.....	89
4-2 Teneur en flavonoïdes.....	92
5-Test de reduction de radicale stable DPPH.....	95
Conclusion.....	102

Références bibliographiques

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

Tableau 2 : Quelques composés phénoliques clés et leurs actions anti- cancérogènes et anti-inflammatoires

Tableau3 : Classification botanique du grenadier (**Spichiger et al, 2009, Benyahia, Hadbi, 2016**)

Tableau4 : Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit)(**Elodie Wald ; 2009**)

Tableau5 : utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle

Tableau 6: matériel biologique.

Tableau 7 : Les résultats expérimentaux de l'examen phytochimique.

Tableau8 : courbe détalonnage de l'acide gallique

Tableau9 : courbe d'étalonnage de la quercétine

Tableau10 : Valeurs d'IC50 des extraits **écorce** *punicagranatum*L.

Tableau11 : Valeurs d'IC50 des extraits **feuilles** *punicagranatum*L

List des figures :

Figure1 : Différentes classes des composés phénoliques

Figure2 : Acide galliqueAcide

Figure3 : Acide ellagique

Figure4 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque

Figure 5 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques

Figure6 : Structure chimique de quelques coumarines

Figure7 : Squelette de base des flavonoïdes

Figure8 : Structures chimiques de quelques flavonols

Figure 9 : Structure de quelques anthocyanidine

Figure 10 : Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-désoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3-4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

Figure 11 : Grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques .

Figure12 : Répartition géographique de la grenade en Afrique

Figure13 : *punicagranatum L*

Figure14 : les feuilles de *punicagranatum l*

Figure 15 : Les fleurs de la *punicagranatum L*

Figure16: les fruits de (*Punicagranatum l*)

Figure17 :*Punicagranatum L* : (A) la baie

Figure18 : la *Punicagranatum L* (B) les graines

Figure19 : la *punicagranatum L* (C) l'écorce séchée

Figure 20 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punicagranatum L*) .

Figure21 : les feuilles et fleure *punicagranatum l*

Figure22 : usages traditionnels du *punicagranatumL*

Figure23 : Réaction de test DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

Figure24 : Structure chimique de la vitamine C

Figure25 : Structure chimique du palmitate d'ascorbyle

Figure26 : Structure chimique du stéarate d'ascorbyle

Figure27 : Structure chimique de la 2-BHA et de la 3-BHA

Figure28 : Structure chimique de la BHT

Figure29 : Structure chimique de la TBHQ

Figure30 : Structure chimique du méthoxsalène

Figure31 : *PunicaGaanatum L*

Figure32 : Matériel végétal séché.

Figure33 : les étapes de la macération.

Figure34: les étapes de la filtration .

Figure35 : les étapes de l'évaporation.

Figure36 : Etape de séparation des extraits macérés dans des solvants à polarité croissante.

Figure 37 : l'extrait après séparation

Figure38 : extrait sec

Figure39 : Protocole pour extraire les polyphénols

Figure40 : protocole du dosage des polyphénols.

Figure41 : les étapes du dosage des polyphénols totaux .

Figure42 : les étapes du dosage des flavonoïdes .

Figure43 : les étapes de la courbe d'étalonnage de l'acide Gallique .

Figure44 : Rendement d'extraction de la feuille et de l'écorce de la plante *punicagranatum l*

Figure45 : rendements des extraits de feuilles et écorce de *punicagranatum L*

Figure46 : courbe détalonnage de l'acide gallique.

Figure47 : Histogramme de teneurs des polyphénols des extrait de écorce.

Figure48 : Histogramme de teneurs des polyphénols de l'extrait de feuille

Figure49 : Courbe d'étallonnage de quercetine.

Figure50 : Histogramme de teneurs des flavonoïdes des extrait de écorce.

Figure51 : Histogramme de teneurs du flavonoïde de l'extrait de feuille

Figure52 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH, en fonction de concentrations utilisées pour les extraits de chloroforme, d'Hexane, d'acétate d'éthyle et de n-butanol de plante *punicagranatum L* (écorce)

Figure53 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH, en fonction de concentrations utilisées pour les extraits de chloroforme, d'Hexane, d'acétate d'éthyle et de n-butanol de plante *punicagranatum L* (feuille)

Liste des abbreviations :

DPPH : 2,2-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl)

CI(50%) : Concentration d'inhibition de 50%

Et al. : Et autre auteur

mg : Milligramme

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

UV : Ultra-violet

[C] : Concentration

g : gramme

Cat : Catéchine

AlCl₃: trichlorure d'aluminium

INTRODUCTION

GENERAL

Introduction Générale :

Depuis la nuit du temps, l'homme a connue les plantes ; il les utilisées pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et même pour se soigner. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques, car elles contiennent des produits chimiques agissant directement sur l'organisme.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population mondiale à recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne **(Ma et al. 1997)**.

La flore algérienne est riche de nombreuses espèces de plantes encore peu nombreuses ou non étudiées mais possédant de vraies plantes Propriétés pharmacologiques.

(Graham et al., 2000; Bnouham et al ., 2002 ; Gonzalez-Tejero et al ., 2008).

Ces types sont pour la plupart spontanés avec un nombre important d'espèce endémiques **(Ozenda,1997)**.

Le grenadier est une espèce fruitière pérenne tolérante à la sécheresse et capable de valoriser les sols pauvres et salins.

Il jouit de grandes capacités d'adaptation aux conditions de milieu caractérisé par une aridité climatique marquée **(Melgarejo and Salazar, 2003)**.

Sur le plan environnemental, il joue un rôle très important dans la protection, la restauration et la fixation des sols. Ses plantations ont connu une grande extension dans de différentes régions du monde et ont conduit à une augmentation de la production.

Cette dernière a stimulé le développement des industries de transformation de jus de grenades et la prolifération des compagnies pharmaceutiques qui opèrent dans l'extraction des composés bénéfiques des fruits **(Seeram et al.2006)**.

L'importance économique du grenadier réside également dans ses fruits qui ont une grande valeur nutritive comparable à celle des fruits juteux comme les abricots, les oranges, les pommes et d'autres. La production mondiale annuelle de grenades est

Introduction générale

estimée à environ trois millions de tonnes. Les pays les plus producteurs de ces fruits sont l'Inde, l'Iran et la Chine avec une production respectivement de 900 000, 800 000 et 250 000 Tonnes (**Melgarejo and Valero, 2012**).

Depuis ces dernières années, une grande attention est accordée aux bienfaits de la consommation régulière des fruits et légumes sur la santé humaine.

Cette valeur nutritive réside dans la grande variété de molécules biologiquement actives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines...) (**Tomas-Barberan and Gil, 2008**).

La grenade est l'un des produits les plus riches en antioxydant notamment les polyphénols solubles, les tanins et les antocyanes (**Gil et al., 2000**).

Ces constituants présentent diverses activités biologiques telles que l'élimination des radicaux libres, l'inhibition de la croissance microbienne et la diminution des risques de maladies cardiovasculaires, cérébro-vasculaires et certains cancers (**Mena et al., 2011**).

Les extraits du grenadier peuvent être utilisés aussi pour la prévention ou la guérison de l'athérosclérose, des diarrhées, des ulcères gastriques et des maladies liées à l'œstrogène telle que la maladie de Paget du mamelon (**Holland et al., 2009**).

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

Il est subdivisé en deux grandes parties, **une partie théorique** qui résume les principales caractéristiques de l'espèce : *Punicagranatum L.* Comprenant les chapitres suivants :

- **Chapitre I**: Les Plantes Médicinales.
- **Chapitre II** : Les métabolites primaires et secondaires.

Introduction générale

- **Chapitre III** : Etude botanique.
- **Chapitre IV** : Activité antioxydante

Par contre **la partie expérimentale** comprenant deux chapitres :

- **Chapitre I** : Matériels et méthodes.
- **Chapitre II** : Résultats et discussions.

Notre travail est achevé par une conclusion générale.

Première
partie :Synthèse
bibliographique

CHAPITRE I :
LES PLANTES
MEDICINALES

1-Définition des plantes médicinales :

La plante organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (**Bruneton, 1993**).

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinale .C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Moreau, 2003**).

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

Une plante médicinale est un végétal dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce, possède des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise. Une plante médicinale est définie par la pharmacopée européenne comme une «drogue végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une «drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (**Sofowora, 2010**).

L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments.

La plante médicinale porte sur deux origines. Les plantes spontanées dites "sauvages" et les plantes cultivées (**Bezanger, Beauquesne et al., 1986**)

2- Intérêt de l'étude des plantes médicinales :

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 1999**).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutique mentactifs (**Decaux., 2002**)

3-Utilisation :

Pendant long temps, les plantes ont été utilisées uniquement en nature, sous forme De tisane sou de poudres Maintenant beaucoup ont présentées en gélules, mais il existe de nombreuses formes d'utilisation des plantes médicinales (**Ghabrier,2010**).

Les plantes médicinales servent pour les productions de produits pharmaceutiques, onguents, crèmes et autres produits naturels (**Adouane,2016**).

Selon les végétaux, herbacée sou arbrisseaux ou arbres toutes les parties peuvent être retenues feuilles, sommités fleuries, tiges, fruits, racines, écorces, gomme, la texteurs. Une fois recueillies, les plantes sont en général séchées pour les conserver pour des emplois futurs. (**GorietTebbale,2014, in, Zerrouk,2018**).

4-Cueillettes et conservation :

Les plantes médicinales Sont cueillies pour être utilisées comme médicament afin des ou langer le patient. Les techniques de cueillette et conservation sont en étroite liaison avec le lieue coutumes. (**Adouane,2016**).

4-1 Cueillettes :

Les propriétés des plantes dépendent essentiellement de la région de production, période et techniques de cueillette. La cueillette est liée avec la variation climatique et saisonnière. Pour déterminer les propriétés d'une plante, il est nécessaire de prendre en considération la partie utilisée, morphologie, couleur, nature, saveur (**Adouane, 2016**).

Si vous souhaitez cueillir vos plantes le matin, attendez le soleil ait séché la rosée. En général, il est conseillé de ne prélever qu'une partie des feuilles et des fleurs afin de ne pas endommager la plante et de permettre aux fleurs restantes de former leur graine. De plus,

certaines parties de la plante doivent être cueillies à des moments précis dans l'année: les graines devront en général être récoltées lorsqu'elles sont à maturité, les racines seront quant à elle prélevées au début du printemps ou à l'automne, car de nombreuses plantes sont alors en phase de repos et ont en conséquence stocké la majeure partie de leurs substances utiles dans leur organes souterrains(**Naumann, 2007**)

En voici quelque exemple, non exhaustifs, ainsi que les troubles contre lesquels elles peuvent agir

Les plantes	Les effets
l'absinthe	Troubles de la digestion
le café	psychostimulant
le cacao	troubles de l'humeur
le chanvre	douleurs
l'eucalyptus	toux
le houblon	anxiété
le lin	constipation
le pavot	douleurs
le tilleul	fièvre

4-2 conservations et stockage :

Certains facteurs majeurs doivent être pris en compte pour garantir des conditions optimales de conservation. Il s'agit principalement de la lumière, de la température, de l'humidité, du degré de fragmentation et des récipients pour le stockage. Il est préférable d'imposer une protection vis-à-vis de la lumière à toutes drogues, car les feuilles, les fleurs, se décolorent rapidement à la lumière, d'où une détérioration de leur aspect. En effet, la luminosité

peut accélérer de nombreux processus chimiques et entraîner une dégradation ou une modification des constituants **présents (Mousnier, 2013)**.

Le stockage des plantes médicinales se fait toujours dans des lieux secs, frais et sombres. Pour les grandes quantités, les sacs en papier de plusieurs épaisseurs, des sacs toiles, des cartons, des conteneurs en métal, sont utilisées.

- Les petites quantités sont conservées dans des bocaux ou des pots en verre bien fermées.
- Les conteneurs en plastique ne doivent pas être utilisés.

Enfin, il faut étiqueter le récipient où la plante est stockée, outre le nom de la drogue, l'étiquette doit aussi indiquer l'année de récolte Fleur, feuilles, semences doivent être desséchées étendues sur des claies ou suspendues en petits paquets isolés.

Les conserver dans des boites en métal par exemple **(Gori et Tebbale, 2014)**

5- Effets thérapeutiques du grenadier :

L'une des plus importantes de ces plantes médicinales est la grenade fruits du Grenadier (*Punica granatum L*) ainsi que ses graines , son écorce et ses fleurs sont utilisés de puis des milliers d'années pour leurs pro médicinale et thérapeutiques dont plusieurs régions où ce tarabuste est originaire (bassin méditerranéen, Moyen-Orient, sud de l'Asie et Amérique latine). **(Afaq-Fetal.,2005)**.

Il est utilisé, de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Il a été abandonné ensuite en raison de la toxicité de certains de ses principes actifs, le grenadier fait l'objet, de puis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur un plan cosmétologique **(WALD,2009)**.

Depuis 2005, plus de 475 produits à base de grenade ont vu le jour en Amérique.

Cette croissances' explique principalement par l'attrait des pros bénéfiques de la grena de sur la santé humaine, en relation avec sa composition **(Storey,2007)**.

D'un point de vue pratique, la plupart de ces travaux de recherches ses ont vus concrétisés dans des projets industriels. Plusieurs marques de produits cosmétiques (Archipelago, Ushuaïa, Tocopheatec.) in colportent les extraits de grenade dans leur gamme des produits, pour ses pros antioxydants, anti-inflammatoires et antimicrobiennes.

D'autre part, plusieurs médicaments à base de grenades ont été utilisés pour lutter contre l'état inflammatoire, ainsi que l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires. (Curtay, et al., 2008).

Dans le domaine alimentaire, divers produits à base de graines de grenade ont été présentés récemment sur le marché mondial : le jus, la crème-glacée, etc. (Storey, 2007).

L'écorce de grenade possède en effet de fortes capacités antioxydantes et anti-ulcéreuses liées à la présence de polyphénols, de tanins ellagiques et de tannins hydrolysables.

L'utilisation des techniques d'irradiation a permis de constater des effets bénéfiques sans que des effets délétères sur les qualités des aliments.

CHAPITRE II :

LES

METABOLITES

PRIMAIRES ET

SECONDAIRE

I Les métabolites primaires :

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule.

Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque.

Les métabolites primaires rassemblent les acides aminés, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques.

Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais possède typiquement une fonction écologique importante (c'est-à-dire une fonction relationnelle). (Khorssi, 2015).

II Métabolisme secondaire

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général (métabolisme primaire).

Ce sont des métabolites secondaires qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétale (croissance développement, reproduction...), mais ils participent à la vie relationnelle de la plante (ou de leur organisme hôte), Et ils ont des rôles très variés, ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, par des messages d'alerte par exemple, ou faire partie de la structure de la plante (tanin et lignine), (Merghem, 2009)

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires dans l'organisme végétale. Suivant les espèces et les diverses catégories de composés, on peut les trouver dans les différents organes ou au contraire, ne les rencontrer que dans les tissus très spécialisés, leur taux relevé par l'analyse d'une plante ou d'un fragment, varie grandement durant l'ontogenèse (croissance jusqu'à la floraison) et l'ontogenèse (formation du fruit), par ailleurs, il est certain que la quantité observée de métabolites secondaires, à un

moment donné, est la résultante de nombreux mécanismes métaboliques et physiologiques : biosynthèse, dégradation transport, capacité d'accumulation et de bioconversion (réponse à la pression de l'environnement)(Merghem ,2009)

1- Importance du métabolite secondaire

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante qui n'est pas encore parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entre pas dans le métabolisme générale (primaire), ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétale (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétale lui – même, rôle de défense, rôle de résistance (Merghem, 2009,inDjimli et Kouiza,2016).

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaire dans l'organisme végétale. Suivant les espèces et les diverses catégories de composés , on peut les trouver dans les différents organes ou au contraire, ne les rencontre que dans les tissus très spécialisés, leur taux relevé par l'analyse d'une plante ou d'un fragment, varie grandement durant l'ontogenèse (croissance jusqu'à la floraison et formation du fruit), par ailleurs, il est certain que la quantité observée de métabolites secondaires, à un moment donné, est la résultante de nombreux mécanismes métaboliques et physiologiques : biosynthèse, dégradation transport, capacité d'accumulation et de bioconversion (réponse à la pression de l'environnement).(Moualkia,Gourmati., 2015).

2-Propriétés biologiques

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (Bounatirou et al., 2007).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les

champignons, ou par les bactéries. (Makoi et al., 2007).

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autres sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (Bruneton, 1999).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999).

3-Les différents Types des métabolites secondaires :

On peut identifier trois types de métabolites secondaires :

Molécules phénoliques

Terpénoïdes

Alcaloïdes

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, les quelles procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire parmi les quelles :

-Les composés phénoliques

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

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Desjardins, 2008).

Par exemple la lignine est un composé essentiel des plantes qui permet leur maintien et la conduction de l'eau (Macheix et al., 2005). Les composés phénoliques contribuent également à la croissance et au développement de la plante par des actions diverses et variées. Ils interviennent par exemple dans le métabolisme et le transport de l'auxine (Treutter, 2006) et dans celui de l'éthylène (Vendrell, 2003).

Les flavonoïdes conditionnent même la formation des grains de pollen chez le pétunia. (Napoli et al., 1999).

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

1- Classification des composés phénoliques

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

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins

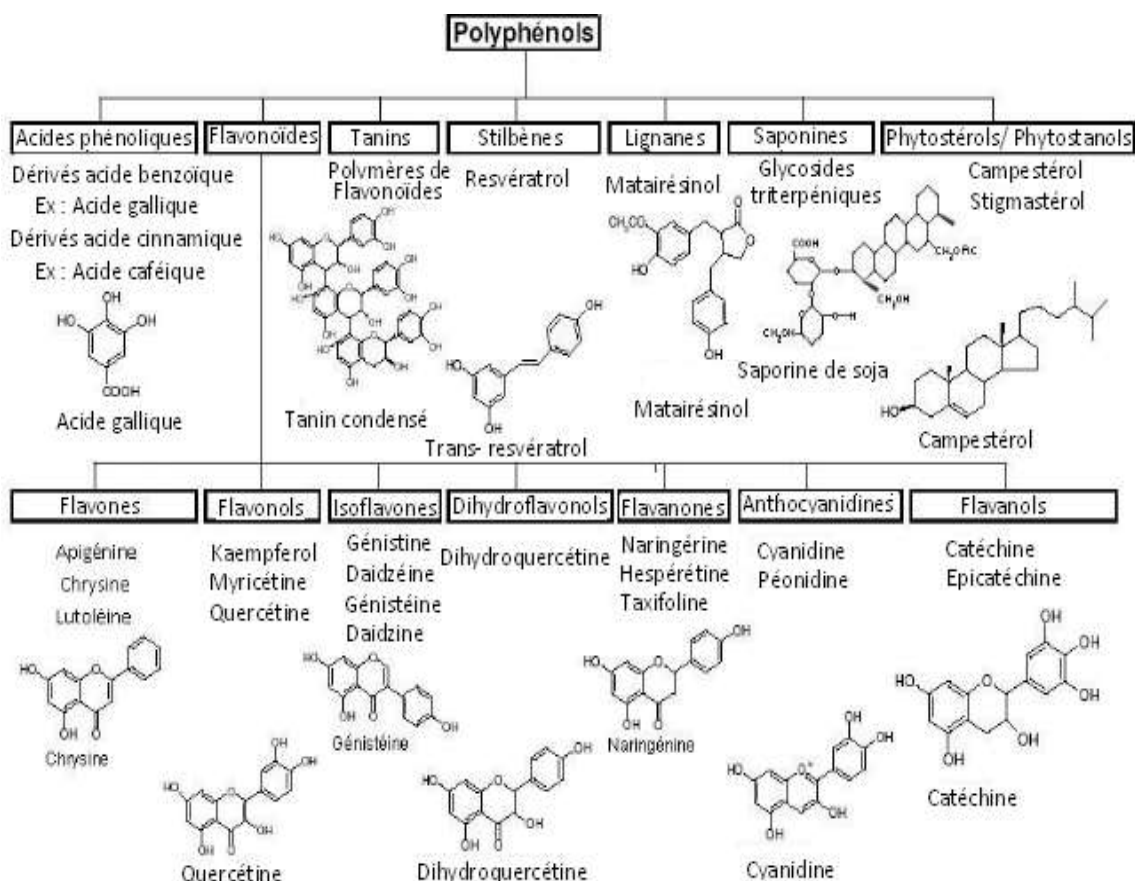


Figure 1 : Différentes classes des composés phénoliques.

1-1 Acides phénols et les coumarines

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotova et al., 2003).

Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (Amakura et al., 2000).

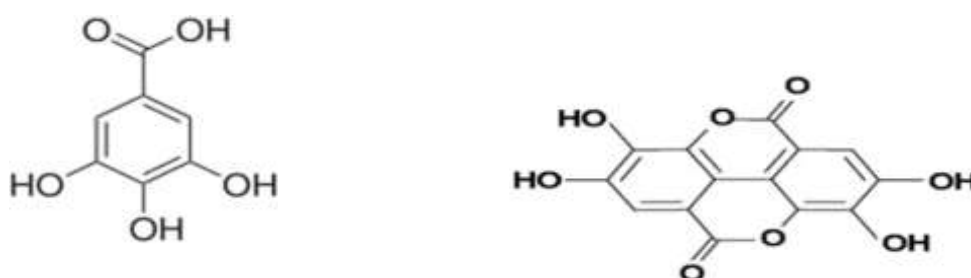


Figure 2 : Acide gallique **Figure 3 :** Acide ellagique

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996) et les dérivés de l'acide cinnamique (Malagas, 1992).

La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (Fleuriet et al., 2005).

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement représentés par les acides p- hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentisiques (Figure 4).

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

Composés	R1	R2	R3	R4
Ac.Benzoïque	H	H	H	H
Ac.Salicylique	OH	H	H	H

Ac.p-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Ac.Gallique	H	OH	OH	OH
Ac.protocatéchique	H	OH	OH	H

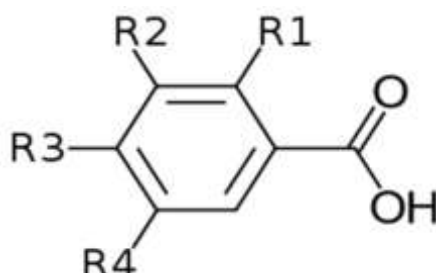
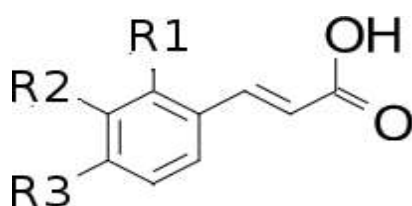


Figure 4 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996).

1-2 Acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique (Figure 5) (Ribereau-Gayon, 1968)



Composés	R1	R2	R3
Ac.Cinnamique	H	H	H
Ac.o-coumarique	OH	H	H
Ac.p-coumarique	H	H	OH
Ac.Caféique	H	OH	OH

Figure 5 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques (Malagas, 1992)

1-3 Coumarines

Nous pouvons considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide *o*-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides *p*-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (voir figure 6) (Dean, 1963).



Figure6 :Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

1-4 Flavonoïdes

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

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

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (Figure 7) (**Bruneton, 1999**).

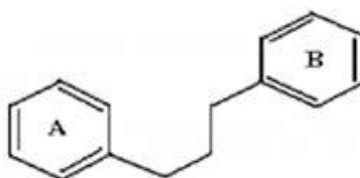


Figure7 :Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963).

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

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical pour leurs activités antivirales, antitumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancéreuses (**Meddleton and Kardasnam, 1993**).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic-Sanic et al., 2004**). Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure des flavonoïdes, il convient de citer notamment:

- Flavonols

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

Parmi les flavonols les plus répandus, nous trouvons le kaempférol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7). Ces deux flavonols sont incolores; le myricétol est l'isorhamétol (Figure 8). Pour le grenadier nous trouvons le kaempférol dans les feuilles et la quercétine dans le jus (**Artik, 1998 ; VanElswijk et al., 2004**)

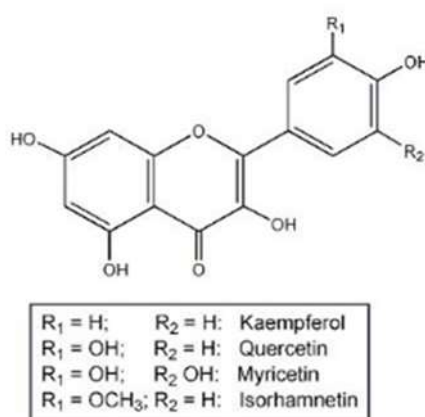


Figure 8 : Structures chimiques de quelques flavonols (Van Elswijk et al., 2004).

➤ Flavanones

Ces composés ne comportent pas des groupements OH en position 3 et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols.

Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citron, orange : la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose), l'hespéridine (Alais and Linden, 1997).

La naringine est détectée aussi dans les feuilles du grenadier (Kim et al., 2002).

➤ Anthocyanes

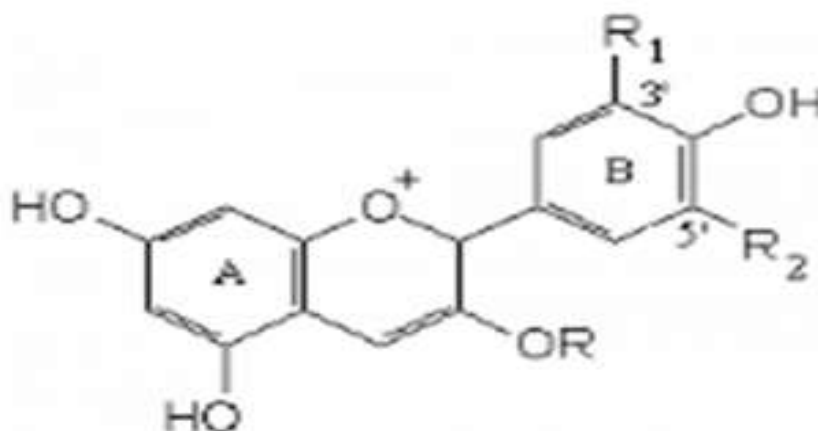
Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (Guignard, 1996). Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capable d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les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

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

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

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 (**Ribereau-Gayon, 1968**). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 9).

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



Si la forme est monoglucoside : R = glucose

Figure 9 : Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau-Gayon, 1968).

1-5 Tanins

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

Les tanins sont divisés en deux groupes :

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

1-5-1 Tanins condensés (flavan-3-ols)

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

Il a été rapporté par Haslam (1998) que les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits). Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Porter et al., 1986**).

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

(**Haslam, 1998**) a montré que seuls des monomères flavan-3-ol (catéchine) et flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidine) constituent les tanins condensés. La figure 10 présente les principales unités des tanins condensés.

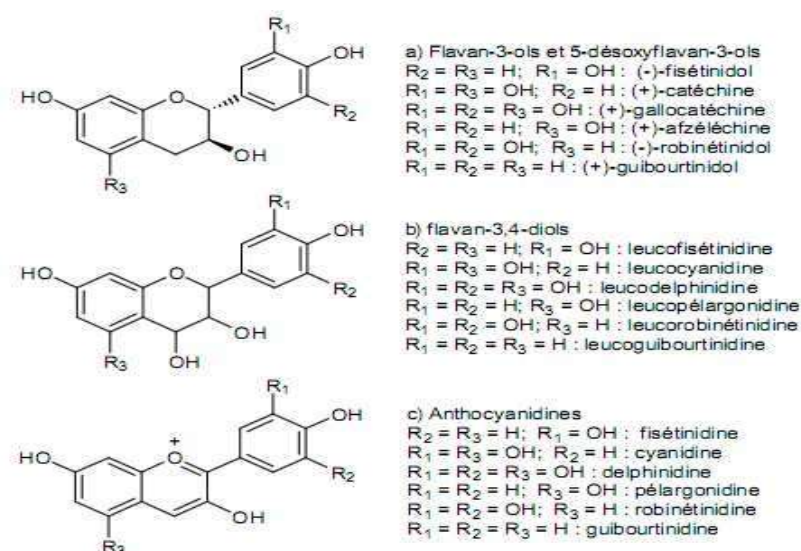


Figure 10 : Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-déoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3,4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

La plupart des proanthocyanidines oligomères, qui sont les vrais tanins condensés, sont presque retrouvées accompagnées par un des flavan-3-ols. La (+)-catéchine et la (-)-épicatechine sont les plus fréquentes, surtout quand il s'agit d'oligomères de type B (**Haslam, 1998**).

D'un point de vue structural les procyanidines dimères de type B sont formées par liaison entre le carbone 4 d'un monomère et le carbone 8 de l'autre. Les dimères catéchiques sont à la base des tanins de type phloroglucinol (d'après l'hydroxylation du cycle A, y compris l'oxygène du pont chromane).

Les dimères de type A sont constitués d'unités 5-déoxyflavan-3-ol (par exemple fisétinidol, robinétinidol) qui sont liés de préférence par des liaisons C4-C6. Ces dimères sont à la base des tanins condensés de type résorcinol. Il est donc probable que la substitution préférentielle dans les positions 6 et 8 (soit des liaisons 4-6 ou 4-8) dépende de l'accessibilité à chacune de ces positions.

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

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

1-5-2 Tanins hydrolysables

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

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

2- Voie de biosynthèse des principaux polyphénols

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues (Figure 11) (**Dixon et Paiva, 1995**).

Leur étude relève de trois approches complémentaires dont la dernière a pu être développée au cours des dernières années : identification et dosage des intermédiaires des voies métaboliques, caractérisation et purification des enzymes qui catalysent les réactions de biosynthèse, clonage et étude de l'expression des gènes impliqués. Par ailleurs, l'utilisation de mutants obtenus soit à l'aide des techniques traditionnelles soit grâce aux apports de la biologie moléculaire et du génie génétique ont permis de mieux comprendre la régulation du métabolisme phénolique. Dans tous les cas, de nombreuses informations ont été apportées en étudiant simultanément la modulation de ce métabolisme par les facteurs externes, biotiques ou abiotiques.

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines, mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ils sont formés, à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie bien connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine qui, par désamination, donne le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanides, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques (Figure 11) : acides coumariques, caféique, férulique et sinapique, généralement présents dans le matériel végétal sous forme d'esters (esters quiniques comme l'acide chlorogénique, esters glucosés...) ou de glucosides. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

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

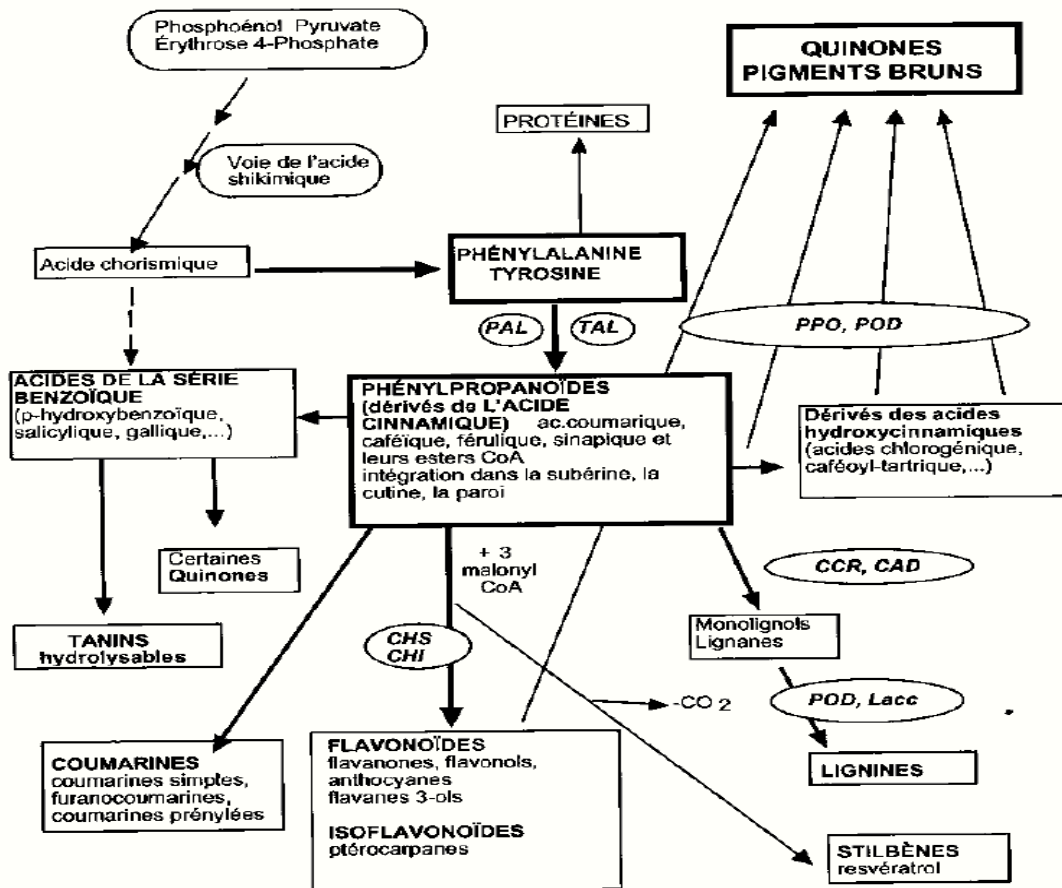


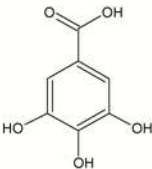
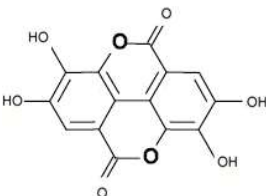
Figure 11 : Grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Macheix, 1996). PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; CCR : cinnamateCoA réductase ; CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; CHS : chalconesynthase ; CHI : chalconeflavanone isomérase ; PPO : polyphénoloxydases ; POD : peroxydases ; Lacc : laccases.

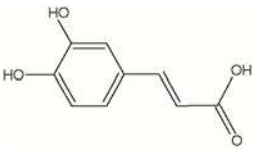
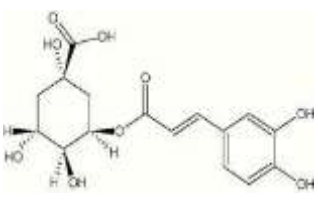
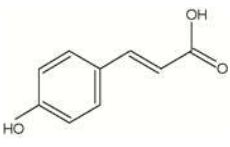
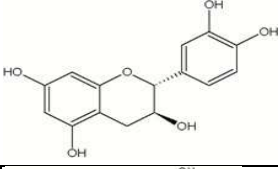
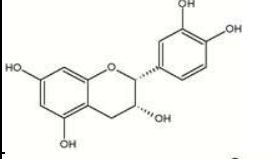
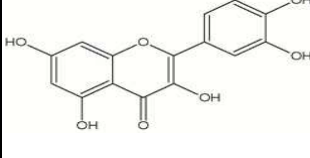
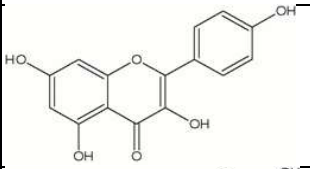
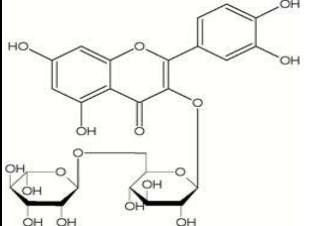
3- Répartition de ces classes dans le fruit du grenadier

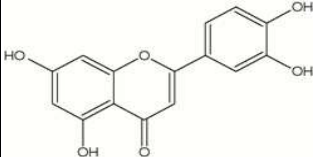
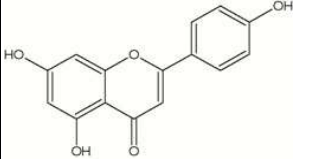
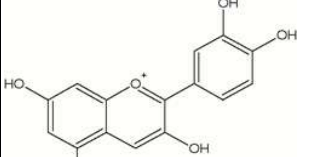
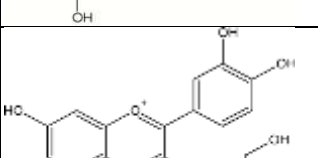
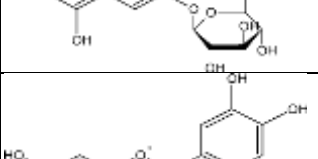
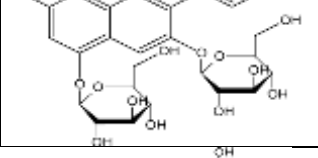
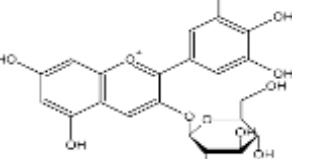
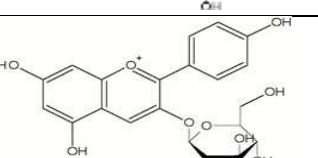

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de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

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

Tableau 1 : Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

Classe chimique	Nom composé	Structure chimique	Organes	References
Acides Hydroxybenzoïques	Acide gallique		Jus - fleurs feuilles	Amakura et al. (2000b) Huang et al. (2005b)
Acides Hydroxybenzoïques	Acide Ellagique		Jus - feuilles Pépins	Amakura et al. (2000b) Wang et al. (2004)
Acide Hydroxycinnamique	Acide Cafféique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al.

(phenylpropanoids)				(2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide Chlorogénique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide		Jus- feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Flavan-3-ols	Catéchine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa et al. (2000)
Flavan-3-ols	Epicatechine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa
Flavonols	Quercétine		Jus Feuilles	Artik (1998)
Flavonols	Kaempferol		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavonol glycosides	Rutine		Jus - feuilles	Artik (1998)

Flavones	Luteoline		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavones	Apigénine		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Anthocyanidines	Cyanidin		Feuilles	Noda
Anthocyanidines	Cyanidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Cyanidin 3,5-di-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Delphinidin O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Pelargonidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Ellagitannins	Punicalin		Ecorce de l'arbre, écorce de la racine, feuilles	Gilet et al. (2000)
Ellagitannins	Punicalagin		Ecorce de l'arbre, écorce de la racine et feuilles	Gilet et al. (2000)

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

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

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

Tableau 2 : Quelques composés phénoliques clés et leurs actions anti- cancérogènes et anti-inflammatoires

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

4- Toxicité des composés phénoliques de la grenade

La grenade est largement consommée par de nombreuses civilisations depuis des milliers d'années, et aucun incident n'est signalé et donc elle ne représente aucun danger pour la santé humaine. Cependant, la consommation de la décoction de l'écorce de l'arbre et aussi du péricarpe du fruit peut provoquer une toxicité qui reste à confirmer. Cette toxicité se manifeste par une inflammation sévère aiguë de l'estomac et même la mort de la personne, cela est dû à la présence des tanins et des alcaloïdes à la fois (**Squillaci and Di Maggio, 1946**). Une autre étude élaborée par **Vidal et al. (2003)** a montré que les Extraits phénoliques de fruits entiers causent une congestion des organes internes et une élévation de la créatinine in vivo. L'huile de pépins de grenade n'était pas toxique pour les larves de crevettes de saumure (**Fatope et al., 2002**), mais des réactions allergiques graves et cancer d'œsophage (**Hegde et al., 2002**) suite à une consommation très élevée de grain de grenades (**Ghadirian et al., 1992**) ont été mentionnés.

Le jus de grenade contient des taux élevés en polyphénols (≥ 2 g/L), et il était considéré comme aliment toxique pour le bétail, une étude a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ces composés via un régime enrichi en punicalagine à une concentration de 6% administré sur une période de 37 jours. La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet toxique significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa faible appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (**Cerdá et al., 2003**).

CHAPITRE
III : ETUDE
BOTANIQUE DE
GRENDEDE.

I- La famille Lythraceae :

Lythraceae est une famille de plantes à fleurs , comprenant 32 genres , avec environ 620 espèces d'herbes , d'arbustes et d'arbres(Stevens, PF., (2001-2011)). Les plus grands genres comprennent *Cuphea*(275spp), *Lagerstroemia*(56), *Nesaea*(50), *Rotala*(45) et *Lythrum* (35)(Judd et al,2008).Il comprend également la grenade (*Punicagranatum* , anciennement dans *Punicaceae*) et le caltrop d'eau (*Trapanatans* , anciennement des *Trapacées*). Lythraceae a une distribution mondiale, avec la plupart des espèces dans les tropiques, mais aussi dans les régions climatiques tempérées.

La famille est nommée d'après le genre type, *Lythrum*, les salicaires (par exemple *Lythrum salicaria* salicaire pourpre) et comprend également le henné (*Lawsonia inermis*). Il comprend désormais la grenade, autrefois classée dans une famille distincte des *Punicacées*. La famille comprend également les myrtes de crêpe largement cultivés. Botaniquement, les feuilles sont généralement par paires (ci-contre), et les pétales des fleurs émergentes du bord du tube du calice. Les pétales apparaissent souvent froissés.

1- Caractéristiques :

Les espèces de Lythraceae sont le plus souvent des herbes, et moins souvent des arbustes ou des arbres ; les arbustes et les arbres ont souvent une écorce écaillée (Mabberley, David J., 2008). Les traits partagés par les espèces au sein des Lythraceae qui les distinguent de l'appartenance à d'autres familles de plantes sont les pétales froissés dans le bourgeon et le tégument externe à plusieurs couches de la graine(Judd et al,2008).

✓ Feuilles

Les feuilles ont généralement une disposition opposée, mais sont parfois verticillées ou alternes. Ils sont simples avec des marges lisses et une nervation pennée(Judd et al,2008). Les stipules sont généralement réduites, apparaissant comme une rangée de poils minuscules ou absents (Mabberley, David J., 2008)..

✓ Fleurs

Les fleurs sont bisexuées, radialement ou parfois bilatéralement symétriques, avec un hypanthium bien développé. Les fleurs sont le plus souvent quadricères mais peuvent être hexamères, avec quatre à huit sépales et pétales. Les sépales peuvent être distincts, partiellement fusionnés pour former un tube ou se toucher sans se chevaucher. Les pétales sont froissés dans le bourgeon et ridés à maturité, et sont généralement distincts et se chevauchent ; ils sont parfois absents (**Judd et al,2008**).

Habituellement, on voit deux fois plus d'étamines que de pétales, disposées en deux verticilles, et les étamines sont souvent de longueur inégale. Parfois, les étamines sont réduites à un seul verticille, ou sont plus nombreuses avec plusieurs verticilles (**Stevens, PF., 2001-2011**).

L'ovaire est généralement supérieur, rarement semi-inférieur (**Graham et al, 28 mars 2011**), ou rarement inférieur. Les deux à plusieurs carpelles peuvent être fusionnés (syncarpe), avec deux à plusieurs ovules dans chaque loge, avec une placentation axile des ovules (**Judd et al,2008**).

L'hétérostylie - la présence de deux (disstyles) ou trois (tristyles) morphes de fleurs distincts au sein d'une espèce différant par la longueur du pistil et des étamines - est courante chez les Lythraceae. (**Judd et al,2008**).

✓ Fruits et graines

Le fruit est généralement une capsule sèche et déhiscente, parfois une baie. Les graines sont généralement aplaties et/ou ailées, avec un tégument externe multicouche.(**Judd et al,2008**). Les poils épidermiques qui se dilatent et deviennent mucilagineux lorsqu'ils sont mouillés se trouvent dans environ la moitié des genres (**Stevens, PF., (2001-2011)**).

2-Description

Famille lythraceae est une famille de plantes à fleurs qui comprend. 1e genres répartis en 620 espèces répertoriées différentes, dont le grenadier. Ce sont des arbres et des arbustes, mais ce sont surtout des herbes vivaces que l'on trouve dans les régions tropicales et tempérées du monde.

Papiers lythraceae simples et disposés par paires face à face. Les fleurs contiennent à z pet ales qui semblent ridés. Ils sont bisexués et homozygotes. Le fruit produit est une capsule sèche, parfois une baie. (**Judd et al,2008**).

3-Genres

Lythraceae a 31 genres dans cinq sous-familles :

Sous-famille LythroideaeJuss. ex Arn. 1832 = 'Lythraceae sensu stricto ', 27 genres (**Christenhusz, MJM ; Byng, JW,2016**) :

- Adenaria
- Ammannia
- Capuronie
- Crénée
- Cuphéa
- Décodon
- Didiplis
- Diplusodon
- Galpinia
- Ginoria
- Haïti
- Heimia
- Hionanthera
- Koehneria
- Lafoensia
- Lagerstroémie
- Lawsonia
- Lourtella
- Lythrum
- Nésée
- Péhria
- Pemphis
- Physocalymme
- pleurophora
- Rota

II-*Punica granatum L*

Punica granatum l ou grenadier sauvage, c'est-à-dire petit arbre fruitier possédant des feuilles caduques. Le balaustier est originaire d'Asie occidentale et est réputé pour la qualité de ses fruits

1-Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification, Cette classification encore adoptée est décrite dans le Tableau 1. (Spichiger et al, 2009 in Benyahia, Hadbi, 2016)

Tableau 3 : Classification botanique du grenadier (Spichiger et al, 2009, Benyahia, Hadbi, 2016)

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae (lythraceae)
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punicagranatum L</i>

2-Origine géographique et aire de répartition du grenadier

A/ Origine géographique du grenadier

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée, depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. Les nomades arabes, dans leurs transhumances, en ont facilité la dissémination. En effet, en raison de la résistance de son écorce, qui en fait un fruit de longue conservation et peu susceptible d'être altéré durant le transport, la grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. D'autant plus que sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif durant les longues traversées du désert. (AMOURETTI MC, 1992).

La grenade a été introduite en Chine au début du II^{ème} siècle avant JC, par le ministre Tchang K'ien, à l'occasion d'une mission en Inde.

C'est donc dans l'ancienne Perse que débuta la culture du grenadier et c'est également de la Perse que le grenadier fut importé en Occident, sur les pourtours de la bassin déterrants en de l'Europe et de l'Afrique du nord. En effet, la plante fut introduite à Rome à la fin des guerres puniques, rapportée par les Romains après leur victoire sur les Carthaginois. **(BOULLARD B,2001)**

La grenade porte le nom de pomme punique, c'est le *Malumpunicum* de Pline, ou pomme de Carthage. Elle sera alors renommée *Punicagranatum*. *Punica* en souvenir des guerres puniques ou peut-être pour *puniceus* qui signifie rouge écarlate en latin, et *granatum* pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit **(LEMOINE E,1998)**

Les Maures, berbères d'Afrique du nord, l'introduisirent dans la péninsule ibérique, au VIII^{ème} siècle après JC, lors de la conquête de ce territoire. Forts appréciés dans le sud de l'Espagne, les grenadiers connaissent alors une culture intensive. L'ancienne cité primitive d'Elvira, située dans le sud de l'Espagne, conquise par les Maures, fut, au XI^{ème} siècle, renommée « Garnat Al Yahud », c'est-à-dire Grenade. **(LEMOINE E,1998)**

Les conquistadors espagnols l'introduisirent en Amérique et aux Antilles au XV^{ème} siècle lors de la découverte du continent américain. Dans les Antilles, au nord du Venezuela, se trouve d'ailleurs un archipel d'une superficie d'environ 340 km², composé d'une île principale dénommée Grenade, et de quelques îles appelées « îles des grenadines ». **(LEMOINE E, 1998)**

B/ Aire de répartition géographique du grenadier

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc.

On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée.

De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride.

C/Production de la grenade

Dans le monde, les plus importants pays producteurs de grenades sont les pays d'Orient dont l'Iran, la Turquie, la Transcaucasie et l'Inde mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, l'Italie et la Grèce. Aux Etats-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est très développée.

La production de grenade est en nette augmentation ces dernières années, montrant un regain d'intérêt pour ce fruit oublié depuis plusieurs décennies.

Ainsi, un article paru dans un journal américain, le Boston Globe, annonce la pénurie de la production américaine de jus de grenade en 2007. Il semblerait en effet que les supermarchés américains n'arrivent pas à garder en stock de jus de grenade. Ce la viendrait essentiellement de la publicité faite pour ce jus dans de nombreux magazines, suite à une étude de 2002, qui démontre les puissants pouvoirs antioxydants de ce fruit, et son rôle dans la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires. Certains magazines annonceraient même le jus de grenade comme « jus de l'année 2007 ». Des producteurs américains envisageraient d'arracher leurs vignes pour planter des grenadiers. La situation en matière d'approvisionnement semble devenue tellement critique que les supermarchés parlent de faire venir du jus depuis l'Europe. (A) De même, d'après un rapport du centre de veille stratégique, la Tunisie note une forte augmentation de la demande en grenades. De 2005 à 2006, la production du fruit est passée de 65000 à 71000 tonnes, dont 2000 tonnes destinées à l'exportation. (B)



Figure12 : Répartition géographique de la grenade en Afrique

3-Période de floraison

De la fin du printemps à l'été (mai-juillet/aout selon le climat, avec la possibilité d'une légère remonte ensuite), Nectarifère, poulinière visitée par les abeilles.

Fleurs(balaustes) bisexuées solitaires ou réunies en fascicules de 2 à 5 fleurs axillaires en forme de clochette à corolle formée de 5 à 7 pétales chiffonnés, caducs, de nombreuses étamines et deux rangs de carpelles, des fleurs pourvues d'un très court pédoncule et d'un calice persistant cylindrique charnu , coriace à 5 ou 7 courts lobes , calice infère qui contient un ovaire soudé, calice que l'on retrouve à la base du fruit.(**Natacha mauric,2000**).

4-Description botanique

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant ; La grenade (en allemand 'pomme avec des grains') ; provient d'un arbre adulte à feuilles caduques ou d'un arbuste à feuilles lancéolées. Ce dernier peut atteindre entre 5 et 10 mètres de hauteur à rameaux nombreux et vivre jusqu'à 200 ans.(**WALD, 2009**).

Il est touffu, très ramifié depuis la base du tronc et plus ou moins épineux. Le tronc est tortueux, à écorce grisâtre qui se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au sommet (**Ben Yahkem et al., 2018**) .

Il est cultivé, depuis longtemps pour un but ornemental ainsi que pour ses fruits comestibles.



Fugire13 : grenade (*punicagranatum*L)

Il fleurit au printemps et en été en rouge corail. Les fruits savoureux bruns-rouges ont la forme d'une pomme qui serait dotée d'une couronne formée de sépales. Les grenades font partie des baies dans la mesure où leur chair n'est ni charnue, ni ligneuse. Leur peau durcie renferme des compartiments remplis de graines anguleuses. Les fruits ont leur place en cuisine. On peut les manger frais ou les boire sous forme de cidre

4-1 Les feuilles :

La naissance des nouvelles feuilles du grenadier se déroule assez tard vers la fin avril sur des rameaux à l'écorce beige argenté. Elles sont de forme oblongue, luisante, étroite, entière et non stipulées, de 3 à 7 centimètres de long et de 2 centimètres de large selon les cultivars. Les feuilles du grenadier sont brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre. (Alhijna et Bourich., 2017).

Caractérisées par la couleur verte foncé de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée.

La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante, donc Les feuilles sont de couleur rougeâtre au stade juvénile. Elles deviennent verdâtres et lumineuses à la maturité pour finir dorées à l'automne. (Avreinoff, 1957). La plupart des variétés de grenadier ont des feuilles en paires traversant alternativement à angle droit, alors que certaines variétés peuvent avoir trois feuilles par nœud (disposés à 120°) et même quatre feuilles par nœud (deux feuilles opposées par nœud). (Ben Yahkem et al., 2018) (Figure 14).

Notons que les feuilles du grenadier ne possèdent pas de stipule.



Figure 14 : les feuilles

4-2 Les fleurs :

Les fleurs du grenadier (ou balaustes) sont très ornementales de couleur rouge pourpre ou grenat émergent du calice, sorte de « coque » d'aspect cireux, entre les mois de mai et août. Elles ont un aspect froissé et chiffonné (**Ben Yahkem et al., 2018**) (**Figure15**).

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation. De plus, la corolle comprend 4 à 8 pétales minces alternant avec les sépales. Ces pétales sont généralement très colorés, souvent d'un rouge orangé vif, mais pouvant prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, tel que blanc, jaune pâle, crème ou saumon. Ils ont un aspect chiffonné.

Ainsi, le gynécée est formé de 8 ou 9 carpelles soudés au tube du calice, disposés sur deux verticilles. L'ovaire, infère, est surmonté d'un style conique terminé par une tête stigmatique(**Garnier et al., 1961**).

Enfin, les étamines, libres et très nombreuses, tapissent la paroi interne du réceptacle floral, à partir de la corolle (**Courchet, 1897**)



Figure 15 : Les fleurs

4-3 Les fruits :

La grenade, fruit du grenadier, en forme de pomme, passant avec le temps du vert au rouge orange, doit être considérée comme un cas limite de baie délimitée par la peau, un péricarpe épais, à l'intérieur duquel sont contenus de nombreux arilles. Chacun est constitué d'une graine (ou pépin) entourée de jus translucide contenu par une très fine membrane. Les arilles sont rencontrés dans des loges séparées par de minces membranes qui s'étendent à l'intérieur du fruit,

donnant au niveau du péricarpe et constituant ainsi une base pour l'attachement des arilles **(Dallas, 2010)(Figure)**.

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

La grenade est un fruit d'hiver. Elle est cueillie de septembre à décembre. C'est un fruit non climactérique ; il ne contient pas à mûrir après la cueillette. On la trouve d'octobre à février. Elle peut être stockée pendant 4 mois dans un local frais dont la température se maintiendra aux alentours de 5°C. Elle peut être conservée à température ambiante d'une à deux semaines et pendant un mois dans le bac du réfrigérateur. La grenade ne supporte ni congélation ni conserve **(Lansky et Newman., 2007)**.



Figure16 : les fruits

4-4 La baie :

Le fruit du grenadier, la grenade, est une baie ronde, cor tiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutines et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre **(Cazin, 1868)**

Ce fruit, très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau de teinte blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé. Cette baie est surmontée des restes du calice, formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable **(B.J., 1999)**.

Son péricarpe, coriace et épais, est non comestible. Il forme une écorce dure, d'un beau jaune à l'intérieur du fruit (**Bärtels, 1998**) (**Figure 17A**).

La grenade présente une placentation hétérogène. Après fécondation de la fleur, l'accroissement du tube du calice porte les carpelles externes au-dessus des autres, et le fruits trouve composé de deux rangées de loges superposées, de telle sorte que dans la rangée inférieure la placentation est axile, tandis qu'elle est pariétale dans la rangée supérieure(**Garnier et al., 1961**) .



Figure17: (A) la baie

4-5 Les graines :

Cette baie renferme de nombreuses graines contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. En tout, il y a à peu près 400 graines dans chaque fruit. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (**Bärtels, 1998**).

Les graines, au tégument externe pulpeux et très succulent, possèdent un tégument Interne dur et coriace. Ces multiples graines, courtement funicules, deviennent plus ou moins anguleuses par compression réciproque.

L'embryon, ex albuminé, est formé d'une courte radicule et de deux larges cotylédons auriculés, enroulés en spirale l'un sur l'autre (**Courchet, 1897**) (**Figure18 B**).



Figure18 : (B) les graines

4-6 L'écorce :

L'écorce de la grenade (oumalicorium) est la partie dure du fruit. Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtres sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient appliquées. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente (**Planchon, 1875**) (**Figure19 C**).



Figure19 : (C) l'écorce séchée

5-La composition chimique de *punicagranatum L*

Déjà au XIX^{ème} siècle, le grenadier suscite un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tels que la pelletiérine. Grâce aux relativement récents procédés d'analyse chimique, comme les techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier (**Elodie, 2009**).

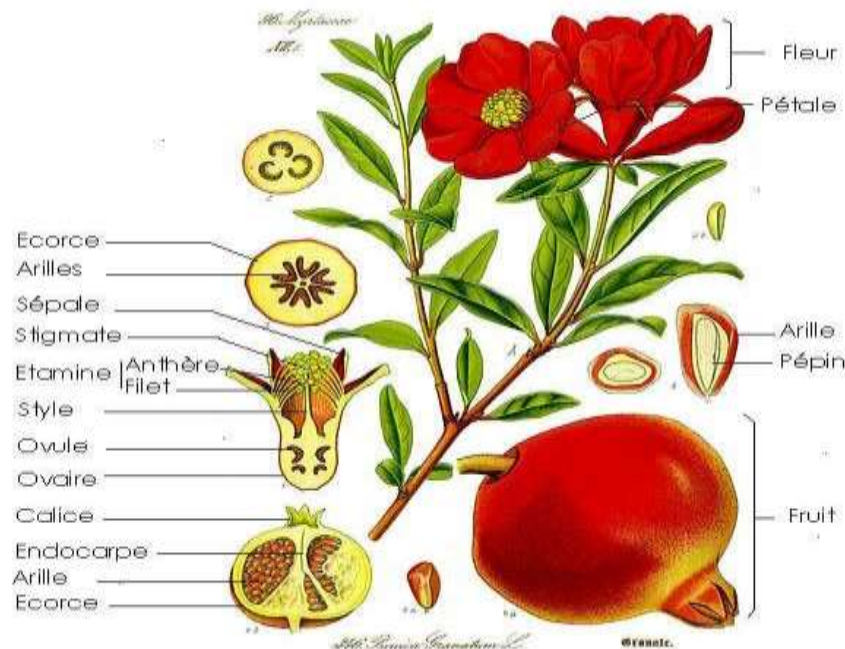


Figure 20 : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum L*) (Von Deutschland et Schweiz, 1885, in, Ilham, 2013)

√ Fleurs :

Sur le plan de la biologie florale, le grenadier est une espèce monoïque qui développe, sur le même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles en formes de "vase", et des fleurs mâles stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés (en forme de cloche). (Melgarejo Et al , 2003, in Djaziri, 2017).

La dominance revient généralement aux fleurs mâles avec un taux de 60 à 70 % selon les variétés et les saisons, les variétés de grenadiers sont auto fertile, mais peuvent être également inter-polonisés, avec cependant une dominance de la pollinisation libre. La première vague de floraison donne le meilleur taux de nouaison (90 %) avec des fruits de bonne qualité et qui sont moins susceptibles à l'éclatement (Chaudhari Et al 1993, in Djaziri ., 2017).

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des tri terpènes comme l'acide uronique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique. (Newman et al, 2007).



Figure21 : les feuilles et fleur *punicagranatum l*

√ **Les feuilles :**

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière posséderait des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine. (Newman et al,2007). Les feuilles du grenadier sont opposées ou sous-opposées, luisantes, étroites, et de forme oblongues, entières, de 3 à 7 cm de long et de 2 cm de large.

√ **Le jus de grenade :**

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. Le tableau 2 montre les valeurs minimales et maximales obtenues pour les acides organiques et les sucres selon une étude la bourée par **Melgarejo** et al. (2000). **Lansky** et al. (2007) ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans la grenade, il y a la valine, proline et méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de portion comestible selon le codex alimentaires en 2009.

Tableau4 : Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit)(Elodie wald ; 2009).

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

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

6-Utilisation en médecine traditionnelle

A de soit traditionnellement utilisée dans l'alimentation courante, les différentes parties du grenadier sont utilisées en médecine traditionnelle dans plusieurs pays dans le monde de puis des centaines d'années. Grace aux recettes de grand-mères, cet arbre représente un candidat potentiel dans le cadre du développement de nouvelles stratégies préventives de l'apparition des diverses pathologies. D'autres utilisations sont également présentes comme les teintures naturelles, la décoration et en cosmétique (Sitzia G, 2009)

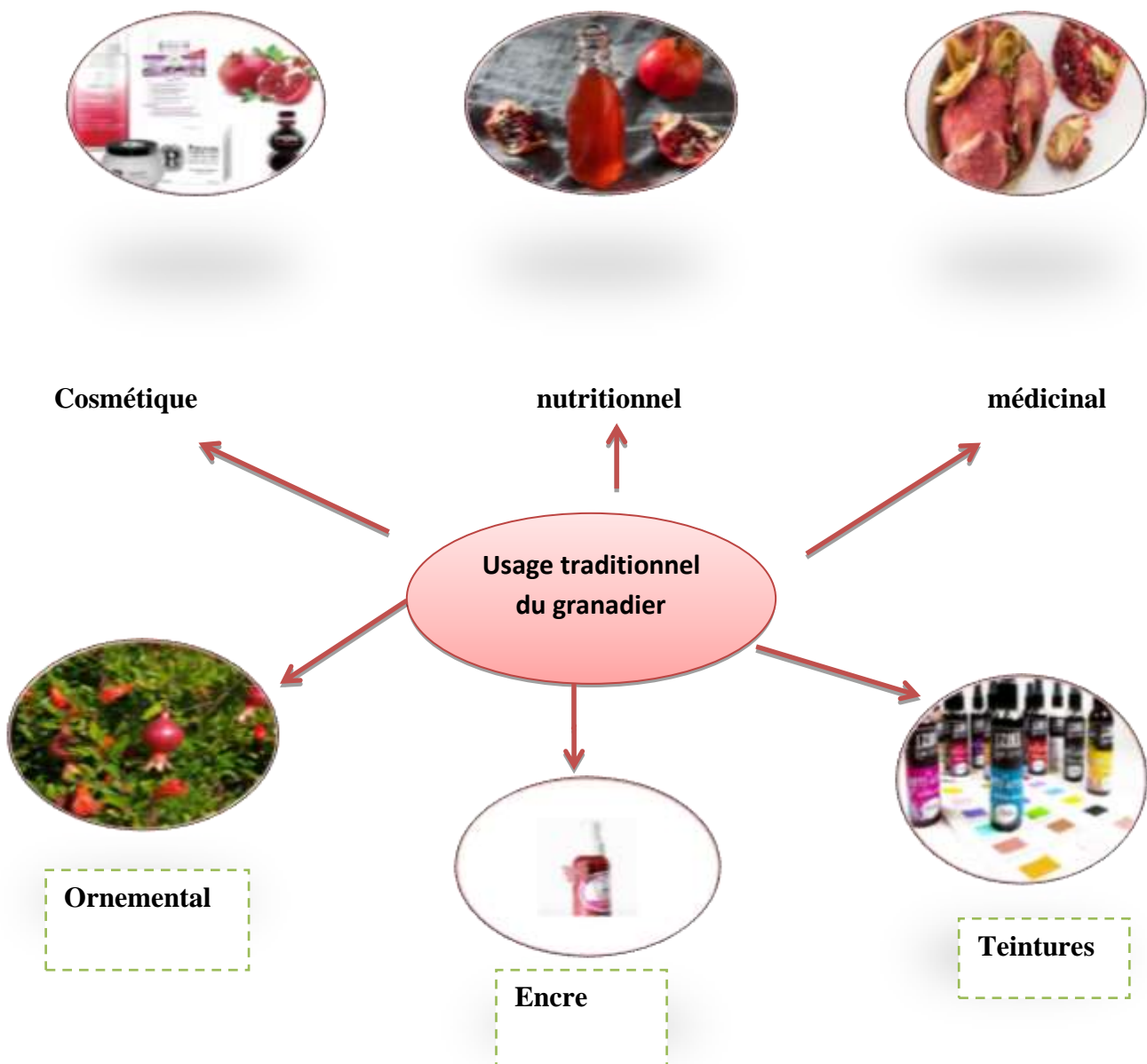


Figure22 : usages traditionnels du grenadier

7-Le grenadier en médecine traditionnelle

L'intérêt thérapeutique des différents organes du grenadier (racines, fleurs, feuilles et fruits) a été réellement reconnu par le milieu médical dans plusieurs pays dans le monde. Leurs utilisations sont différentes d'une région à l'autre selon la partie utilisée, fraîche ou séchée. Le tableau suivant récapitule quelques utilisations dans la médecine traditionnelle en fonction de la partie utilisée du grenadier (Tableau)(WALD E,2009)(SITZIA G,2009)

Tableau5 : utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle

Organe utilisé	Fins thérapeutiques	Région / Pays
Feuilles et écorce des Rameaux	-Tonique agréable. - La débilité de l'estomac, le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, la chlorose, l'anémie, la migraine.	Chine
Écorce de grenade	- Effets vermifuges. - Anthelminthique. -Toniques et astringentes - Traiter la diarrhée et la dysenterie, les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée, le gonflement atonique des amygdales et le relâchement de la luvette et des gencives	Egypte
Peau de grenade (malicorium)	- Effets astringents pour l'intestin, pour "arrêter le sang" et pour "chasser les parasites", diarrhée et dysenterie chroniques, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée, hyperménorrhée, pertes blanches, accumulation de parasites, douleurs abdominales.	Chine

Graines de grenade	- Soulager les ulcères atoniques.	Chine
Jus de grenade	- Réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité.	Afrique du Nord et Inde
Suc de grenade	- Rafraîchissant, diurétique, adoucissant.	Chine

CHAPITRE
IV : ACTIVITE
ANTIOXYDANT

1. Définition des antioxydants :

Un antioxydant est une substance qui une fois additionnée à un produit oxydable naturellement par l'air, (Satrani et al, 2015).

Il est présent en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les ROS, ou en empêchant leur formation, ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci (Martin et al., 2015) ou en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (Favier,2003).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Cano et al, 2006).

2. Les différents types et sources d'antioxydants :

2.1. Antioxydants endogènes :

2.1.1. Antioxydants enzymatiques :

Les principaux enzymes antioxydants impliqués dans la neutralisation des ERO dans les cellules sont : le super oxydedismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase(GPX) (Matés et al., 1999).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

Le rôle majeur du super oxydedismutase (SOD) est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Lubrano& Balzan, 2015) et le rôle de la catalase, elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables (Jacques & André, 2004) et la glutathion peroxydase(GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène (Bédane, 2008).

2.1.2. Antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants endogènes non enzymatiques sont produits par le métabolisme dans le corps, comme l'acide lipoïdique, glutathion, L-arginine, coenzyme Q10, mélatonine, l'acide urique, la bilirubine, les protéines chélatrices des métaux, la transferrine (**Pham-Huy et al., 2008**), le NADPH, les dipeptides (**Boldyrev, 1993**).

Le plus important est sans doute le glutathion qui protège, non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote (**Favier, 2003**).

2. 2.Antioxydants exogènes :

Selon (**Rice-evans et al., 1995**), les antioxydants exogènes sont des antioxydants naturels apportés par l'alimentation, les plus connus sont les caroténoïdes, ainsi que les composés phénoliques, et aussi les vitamines (E, C et A) (**Djeridane et al., 2006**).

2.2.1. Les polyphénols :

Les polyphénols sont des produits regroupent plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes dans leur structure au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (**Tapiero et al., 2002**), Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe le plus important (**Beta et al., 2005**).

Les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (**Monique Gardès-Albert et al., 2003**). Ils sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations (**Stevenson & Hurst, 2007**).

2.2.2. Les Vitamines :

La vitamine E est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (**Traber & Atkinson, 2007**), sont des composés liposolubles, ils regroupent quatre substances dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E (**Wang & Quinn, 2006**).

L'implication de la vitamine E dans la prévention cardio-vasculaire semble être établie. En effet, la vitamine E prévient de l'oxydation du cholestérol LDL (low-density lipoprotein) qui provoquerait les plaques d'athérosclérose (**Pryor, 2000**). L'action bénéfique de la vitamine E est évoquée dans le cas du cancer de la prostate (**Gey, 1998**). Il neutralise les radicaux peroxyde (**Lecerf et al., 1994**), alkyle et alcoyle (**Herrera & Barbas, 2001**).

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène (Fain, 2004). La vitamine C joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman, 1999), il est aussi possède une propriété importante qui est la réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Monique Gardès-Albert et al., 2003).

3. Méthodes d'évaluation de la présence d'antioxydants dans les plantes :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante qui peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Huang et al., 2005).

3.1. Test DPPH :

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre stable qui agit en se combinant avec d'autres radicaux libres. Il s'agit d'un test largement utilisé car il est simple et relativement reproductible (Brand-Williams et al., 1995), lorsqu'il est mis en solution dans l'éthanol, le radical DPPH est caractérisé par son spectre UV avec un maximum d'absorbance à 515 nm. Le DPPH réagit avec un antioxydant par arrachement d'un hydrogène, il se forme alors la 2,2-diphénylhydrazine DPPH₂ (DPPH-H). Ce produit de la réaction ne possède plus de bande d'absorption autour de 515 nm. Ce test consiste donc à suivre la variation de l'absorbance à 515 nm, caractéristique du radical DPPH, en présence du composé étudié. (Brand-Williams et al., 1995).

Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu lors de la réaction, en particulier les conditions de la réaction (temps, type de solvant, pH). Le test s'effectue à température ambiante afin d'éviter tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Salah et al, 1995)

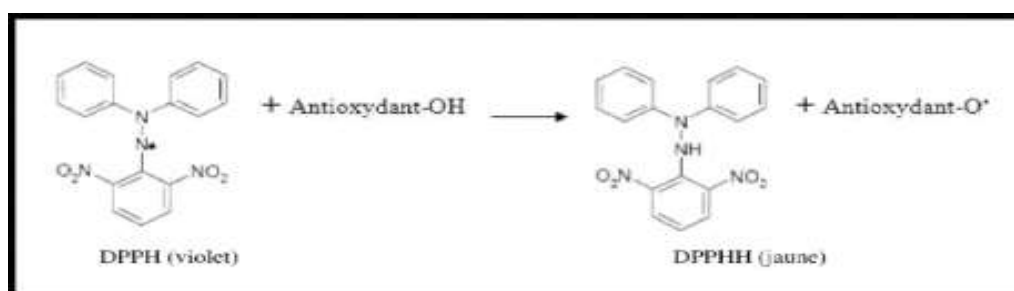


Figure 23: Réaction de test DPPH (2,2 Diphényl-1-picryl hydrazyl) (CONGO, 2012).

3.2. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power):

FRAP est une méthode simple, rapide et reproductible (Benzie & Strain, 1996), La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyani de à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Chung et al., 2002).

4. utilisation des antioxydants

4.1. Utilisation dans l'industrie agroalimentaire

Les antioxydants sont largement utilisés dans le domaine agroalimentaire afin de prolonger la durée de vie des aliments. Toutefois leur utilisation est règlementée. La liste d'additifs susceptibles d'être utilisés est précise. Les différents composés sont classés en fonction leur structure chimique

4.1.1. La vitamine C et ses dérivés

La vitamine C (ou acide ascorbique) est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière que l'on retrouve à l'état naturel.

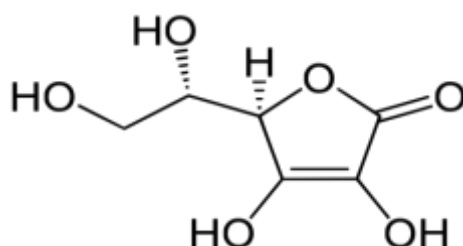


Figure24 : Structure chimique de la vitamine C

Elle est surtout utilisée en agroalimentaire pour les produits à conservation longue et non réfrigérée afin d'éviter la prolifération de bactéries à l'origine de la dégradation du produit. Elle est également utilisée pour son pouvoir réducteur dans le vin et la bière ainsi qu'à titre préventif d'oxydation pour certains fruits (e.g., mirabelle).

Un des dérivés de l'acide ascorbique est l'acrobate de sodium. Il s'agit d'un produit synthétique qui est utilisé avant tout comme antioxydant mais également en tant que fixateur de couleur et supplément vitaminique. On le retrouve dans certains aliments pour bébé ainsi que dans les poissons surgelés. Autre dérivé de l'acide ascorbique, l'ascorbate de calcium est un sel de calcium dont la principale utilisation est l'application sur les pommes avant leur commercialisation afin d'empêcher leur oxydation et ainsi leur brunissement. De la même façon, l'ascorbate de potassium est utilisé pour prévenir l'oxydation des beurres, sirops et conserves.

Le palmitate d'ascorbyle est un ester d'acide ascorbique et d'acide palmitique permettant à la vitamine C d'être liposoluble. On le retrouve dans les laits déshydratés, les matières grasses ainsi que dans les aliments diététiques pour nourrissons et/ou enfants en bas âge. (**Higdon J.,2003**)

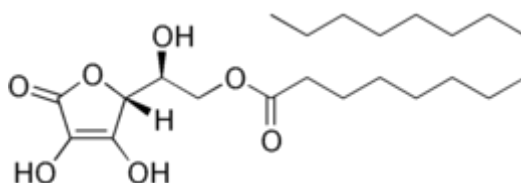


Figure25 :Structure chimique du palmitate d'ascorbyle

Le stéarate d'ascorbyle est un ester formé d'acide ascorbique et d'acide stéarique. Il est utilisé dans la conservation des margarines. Son utilisation est interdite en France mais autorisée aux Etats-Unis (**Enstrom JE.,1992**)

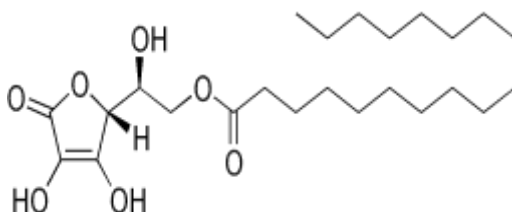


Figure26 : Structure chimique du stéarate d'ascorbyle

4.1.2. La résine de gaïac

La résine de gaïac est extraite des arbres *Guaiacum officinale* et *Guaiacum santum* originaires des régions tropicales et subtropicales des Amériques. Elle fut utilisée par le passé comme traitement contre la syphilis, comme stimulant mais également pour lutter contre le manque d'appétit. Cette résine est utilisée en agroalimentaire dans les sauces, les aïeux doux et les huiles. La gomme de gaïac est également utilisée mais n'est pas considérée comme un antioxydant, elle est décrite comme étant un conservateur.

4.2. Utilisation en cosmétologie

Un produit cosmétique se définit comme étant une substance ou un mélange destiné à être mis en contact avec une partie superficielle du corps humain (e.g., épiderme, ongles, lèvres). Son action a pour but de nettoyer, protéger, conserver, parfumer ou corriger l'aspect. Il s'agit de produits participant à l'hygiène et à l'embellissement, leur activité superficielle étant souvent localisée au niveau de l'épiderme. On les trouve sous différentes formes comme des crèmes, gels, émulsions. Les produits modifiant l'apparence ont été utilisés très tôt dans notre Histoire. Par exemple, Néron et Poppée utilisaient de la cèruse et de la craie pour éclaircir leur peau. De nos jours, entre l'industrialisation et les avancées scientifiques, la cosmétologie a pris une importance toute particulière dans notre société en raison du culte de l'apparence lié notamment au développement de la publicité.

Il faut entendre par produit cosmétique :

- les produits d'hygiène (e.g., démaquillant, dentifrice, déodorant)
- les produits de soin du visage (e.g., crème antiride, crème de jour, crème de nuit, crème hydratante, masque de beauté)
- les produits capillaires (e.g., après-shampooing, gel, teinture)
- les produits de maquillage (e.g., anti-cerne, autobronzant, fond de teint, mascara)
- les parfums
- les écrans solaires
- les produits pour le rasage et les produits dépilatoires
- les préparations pour bains et douches
- les produits de soin du corps : huile, lait, gommage, crème pour les mains.

Actuellement, les produits cosmétiques peuvent contenir jusqu'à 50 ingrédients, parmi les 8000 ingrédients cosmétiques référencés. Ils sont généralement constitués d'un ou plusieurs principes actifs, d'excipient(s) et d'additifs (e.g., adjuvants, conservateurs, colorants).

En cosmétologie, les additifs ont pour but d'améliorer la conservation, la couleur, la texture ou le parfum des produits fabriqués. Les antioxydants sont très largement utilisés en cosmétologie, que ce soit comme principes actifs ou comme additifs. Ils sont même gage d'efficacité pour le consommateur et sont souvent mis en avant dans les campagnes de marketing. La notion d'antioxydant peut parfois être floue en cosmétologie.

Les antioxydants conservateurs que l'on trouve dans les produits cosmétiques peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Quoi qu'il en soit, ils se doivent de répondre à plusieurs critères : ils doivent protéger le produit cosmétique des dégradations photo-induites ou de l'oxydation due à l'air, tout en n'en modifiant ni l'odeur, ni l'aspect ni la couleur.

Leur intérêt repose sur la capacité à interrompre activement la réaction de peroxydation. Ils vont être utilisés dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés mais également dans celles contenant des extraits végétaux riches en oxydases. De plus, les antioxydants vont permettre limiter le phénomène de rancissement dont peuvent être victimes les produits cosmétiques. En tant qu'additifs, les antioxydants sont présents dans les produits cosmétiques à une concentration d'environ 0,02 à 0,05%.

4.2.1. Les antioxydants naturels

Parmi tous les antioxydants naturels, il existe deux molécules particulièrement utilisées, à savoir l' α -tocophérol et le palmitate d'ascorbyle.

- L' α -tocophérol est une forme de la vitamine E. La peau peut absorber la vitamine E selon 2 voies : l'une passe au travers de la couche cornée, de l'épiderme et de la jonction démo-épidermique; la seconde passe par le canal pilo-sébacé et l'intérieur des follicules pileux.

Elle possède plusieurs activités intéressantes dans le domaine de la cosmétologie. Son action sur le cuir chevelu permet une protection vis à vis des phénomènes d'irritation en limitant la peroxydation des lipides du sébum. De plus, en raison de son stockage dans la paroi cellulaire, elle forme le premier barrage protecteur de la peau contre les rayons UV. Sa présence permet de réduire l'érythème cutané induit par une surexposition solaire.

Une application répétée sur la peau permet d'améliorer la fonction de barrière: la perte d'eau est moindre, l'aspect de la peau s'améliore en surface (gain en souplesse et en sensation de douceur). En parallèle, l'action antioxydante contre le vieillissement permet d'observer une diminution des rides.

- Comme vu précédemment, le palmitate d'ascorbyle est un ester liposoluble. Il est utilisé dans les rouges à lèvres, les crèmes pour les mains et dans les crèmes dé pigmentaires.

4.2.2. Les antioxydants de synthèse

- Le BHA ou hydroxyanisolebutylé est un mélange de 2-tertiobutyl-4-hydroxyanisole(2-BHA) et de 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (3-BHA). Outre son utilisation comme antioxydant ayant pour but d'éviter aux produits lipophiles de rancir, il est également employé comme agent masquant afin de réduire ou masquer l'odeur de base d'un produit. Il est largement utilisé dans les rouges à lèvres, dans les crèmes hydratantes ou pour les fonds de teint. Le BHA est actuellement suspecté de provoquer des réactions allergiques cutanées, d'être un potentiel cancérigène voire de rentrer en compétition avec certaines fonctions hormonales. Son utilisation a donc été interdite en Europe dans la composition des parfums mais autorisée dans d'autres produits.

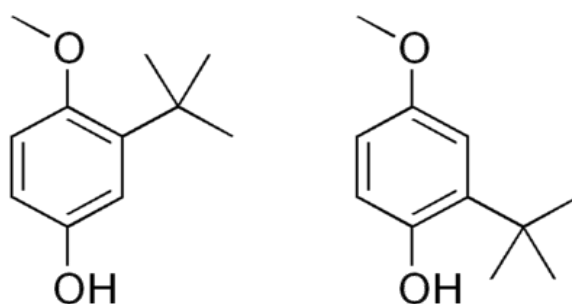


Figure27 :Structure chimique de la 2-BHA et de la 3-BHA

- Le BHT ou 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol présente les mêmes propriétés que le BHA avec les mêmes risques pour la santé. Malgré cela, ces deux molécules sont préférées à l' α -tocophérol notamment en raison d'un coût de production moindre.

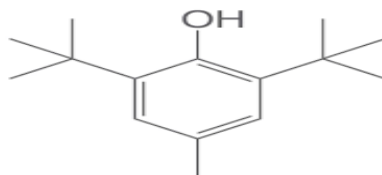


Figure28 : Structure chimique de la BHT

- Enfin, le TBHQ ou butylhydroquinone tertiaire. Il est principalement utilisé avec le BHA.

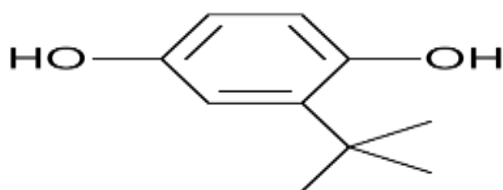


Figure29 : Structure chimique de la TBHQ

4.3. Utilisation en médecine humaine

4.3.1. La Puvathérapie

La Puvathérapie est un procédé thérapeutique utilisé depuis plusieurs années dans le traitement de nombreuses affections de la peau et des muqueuses (notamment le psoriasis). Ce traitement, nécessitant un examen cutané préalable, consiste en l'irradiation du corps par des rayons Ultra-Violets A (UVA) après la prise d'un médicament photo sensibilisant la Méladinine.

Le principe actif de cette spécialité est le méthoxsalène qui est un dérivé des furano coumarines. Il s'agit d'une molécule possédant des propriétés antioxydantes mais dans son utilisation dans la PUVA thérapie, ce sont ses propriétés photosensibles qui sont exploitées. Après son ingestion per os, la molécule va diffuser dans l'organisme de façon non spécifique

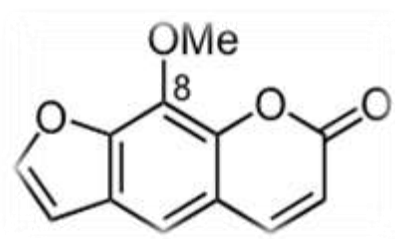


Figure30 : Structure chimique du méthoxsalène

Les zones présentant la dermatose vont être exposées aux rayonnements UVA qui activent le méthoxsalène. Ce dernier va se lier aux deux brins d'une même paire chromosomique en formant un pont covalent, entraînant la mort cellulaire par apoptose.

Ce traitement est contraignant à plusieurs niveaux. En effet pour qu'il soit efficace, il nécessite en moyenne deux à trois séances par semaine pour un total maximum de 30 séances avec une exposition croissante aux UVA. De plus, dans les 8h suivant la prise du médicament, il est obligatoire de porter des lunettes de soleil afin de protéger les yeux des UVA et UVB. Il est important durant toute la période de la cure de faire attention aux interactions avec la prise d'autres médicaments et aux possibles manifestations cutanée sin désirables. Toutefois, il peut être observé une sécheresse cutanée qui pourra être soulagée par l'utilisation d'un pain sur gras pour la toilette et d'une émulsion corporelle hydratante (de préférence le soir). Le traitement peut également provoquer un prurit, des douleurs cutanées, une hypertrichose. La Puvathérapie est formellement contre-indiquée chez la femme enceinte.

Il est primordial, et il en va de la réussite du traitement, de respecter scrupuleusement les séances et ne pas interrompre prématurément le traitement.

4.3.2. Les suppléments vitaminiques

Les médicaments utilisés comme suppléments vitaminiques vont être prescrits en cas de déficit ou à titre préventif afin d'éviter tout risque de développement d'une carence.

- A 313 ® (Retinol) : Traitement curatif de la carence en vitamine A
- Elevit ® : Prévention ou correction des troubles en rapport avec un régime alimentaire carencé ou déséquilibré au cours de la grossesse et de l'allaitement.
- Toco ® (α -tocophérol acétate) : Traitement des carences en vitamine E.
- Uvestero® (Ergocalciférol) : Indiqué chez le nouveau-né (en particulier lenouveau-né prématuré) et le nourrisson présentant un risque de déficit ou de malabsorption en vitamines liposolubles A, D et E, et vitamine C.

5. les maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par les tress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de

radicaux (Solal R.S et al ,2002)

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires(Motagnier L et al ,1998).

Dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses. Les stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs pro oxydants (pro stacycline, cytokine, facteur de fibrinolyse, super oxyde, NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses. Un facteur de risque découvert récemment, l'homocystéine, voit son action liée en partie à la génération de radicaux libres au cours de son métabolisme. Les causes essentielles de ce stress oxydant sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de sur charges en facteurs pro oxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques pro oxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène.

La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de la CuZn super oxydedismutase ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la scléroselatérale amyotrophique (SLA). Le transfert du gène de malade chez la souris recrée d'ailleurs une maladie analogue à la maladie humaine. La dégénérescence maculaire liée à l'âge est fortement associée avec la forme valine/alanine du polymorphisme du gène de la superoxyde dismutase

6. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés de plusieurs façons :

6.1. En fonction de leur activité

Ils peuvent être classés comme enzymatiques et non enzymatiques :

- **Les antioxydants enzymatiques**

Cela fonctionne en brisant les radicaux libres et en les éliminant. Les enzymes antioxydant est transforment les produits d'oxydation dangereux en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) puis en eau, selon un procédé en plusieurs étapes en présence de catalyseurs tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer .

- **Les antioxydants non enzymatiques**

Agissent en interrompant les réactions en chaîne des radicaux libres. Parmi ces antioxydants, la vitamine C, la vitamine E, le polyphénol végétal, caroténoïdes et glutathion.

6.2. En fonction de leur solubilité dans l'eau ou les lipides

Les antioxydants peuvent être classés en tant qu'antioxydants solubles dans l'eau et liposolubles. Les antioxydants solubles dans l'eau (vitamine C) se trouvent dans les acides cellulaires tels que le cytosol ou la matrice cytoplasmique. Les antioxydants liposolubles (tels que la vitamine E, les caroténoïdes et l'acide lipoïque) se trouvent principalement dans les cellules de la membrane

6.3. En fonction de leur taille

Les antioxydants peuvent être également classés en petites molécules et en grosses molécules. Les antioxydants à petites molécules neutralisent les ERO dans un processus appelé nettoyage radical et les emporter. Les principaux antioxydants de cette catégorie sont la vitamine C, la vitamine E, caroténoïdes et glutathion (GSH).

Les antioxydants à grandes molécules sont des enzymes (SOD, CAT et GSHPx) et des protéines sacrificielles (albumine) qui absorbent les ERO et les empêchent d'attaquer d'autres protéines essentielles.

DEUXIEME
PARTIE :
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I :
MATERIELS
METHODES

1-Matériel végétal :

Dans cette étude, les échantillons de matériel végétal utilisés comprenaient les parties aériennes des plantes récoltées. *PunicaGranatum L* a été collecté début octobre 2021 dans l'état d'Oum El bouaghi.



Figure31 : *PunicaGaanatum L*

2-Préparation des échantillons de plantes**2-1séchage :**

les parties aériennes de la plante (feuilles et écorces) ont été séchées pendant deux mois à l'abri de la lumière et à température ambiante .

2-2Broyage :

La plante est broyée en poudre par un broyeur électrique pour augmenter la surface de contact avec le solvant.

2-3 Conservation :

La poudre végétale a été conservée dans flacons en plastique , à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2-4 Matériel biologique :

-Tableau 6: matériel biologique.

Appareils	Réactifs et produits Chimiques	Verreries et petits matériels
Balance analytique	Hexane	Tubes à assai
Bain marie	2_Butanol	Entonnoirs
Rota vape	Chloroforme	Ampoules à décanter
Etuve	Acide gallique	Erlenmeyers
Agitateur magnétique	Acide acétique	Micropipettes
	Méthanol	Cuve en verre
	DPPH	Papier filtre
	Acétate d'éthyle	Béchers
	Eau distillé	Fioles
	AlCl ₃	
	Na ₂ CO ₃	
	Réactif folin-Ciocalteu	

3-Méthodologie de travail :

Les tests ont été réalisés au niveau du laboratoire des ressources naturelles et aménagement des milieux sensibles, bloc E .

3-1 Récolte de la matière végétale :

(*PunicaGranatum* L) a été collecté dans la wilaya d'Oum El Bouaghi.

3-2 Technique de séchage :

Après la cueillette, le matériel végétal est nettoyé pour assurer la bonne conservation de notre plante, et les échantillons sont séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante pendant deux mois.



Figure32 : Matériel végétal séché.

3-3 Préparation de l'extrait brut :

3-3-1 Extraction des composés phénolique et des flavonoïdes :

Les poly phénols et les flavonoïdes ont été extraits à partir de ce plante par la méthode extraction par macération dans le méthanol.

3-3-2 Extraction par macération dans le méthanol (extraction solide-liquide) :

La macération est un procédé qui consiste à laisser la matière végétale dans du méthanol pour en extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïde).

Le protocole de la macération est le suivant :

- ❖ Pesez 100 grammes de la matière végétale.
- ❖ Préparez 1 litre de solvant dans un bûcher (20% de l' eau distillé et 80% méthanol) et mélange bien dans erlenmeyer .
- ❖ Mettez la matière végétale (100 g) sur le méthanol (600 ml) le reste de solvant et conserver
- ❖ Laissez macérer pendant 72 h



Figure33: les étapes de la macération.

3-3-3 La filtration :

La filtration consiste à retenir à l'aide d'un réseau poreux, d'une substance ou d'un filtre, des particules solides en suspension dans un liquide.

La filtration est passée par les étapes suivantes :

- ❖ Filtrer la macéra dans des flacons à l'aide de papier poreux.
- ❖ Récupérer le filtrat dans un flacon.
- ❖ Répéter la procédure deux fois (fraction retenue par le filtre dans 200 ml méthanol) le solvant qui conserve.

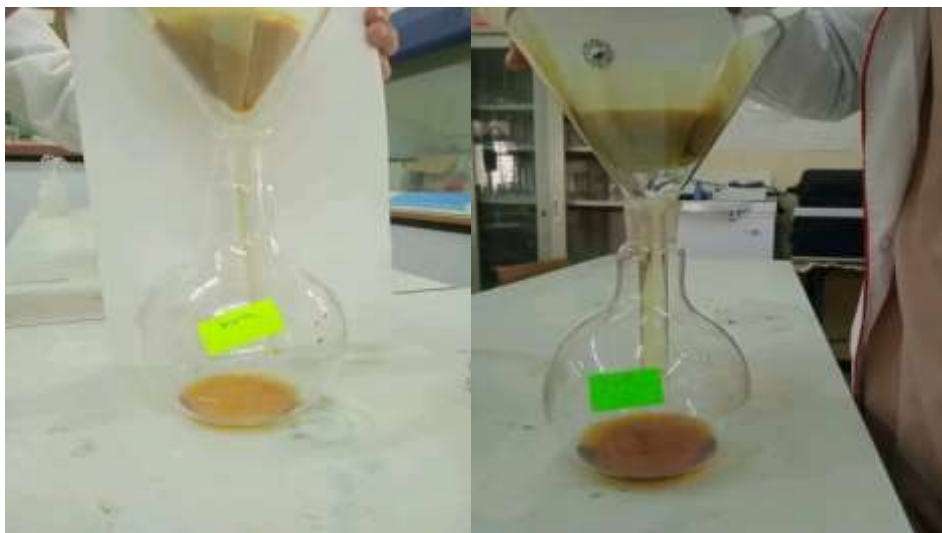


Figure34: les étapes de la filtration .

3-3-4 Evaporation :

A l'aide d'un évaporateur rotatif , ou rotavap (Rota Vapeur Heidolph Laborota 4002),qui permet a éliminé le solvant

L'évaporation est passé par les étapes suivantes :

- ❖ 1- Pesez le ballon vide avant de versez la solution .
- ❖ 2-Placez la solution dans le ballon d'évaporation .
- ❖ 3- Mettez le ballon dans un rotavap , et laisser s'évaporer jusqu'à la dispartion complète du solvant (à= 72° et vitesse de rotation =3).
- ❖ 4-l'opération se déroul pendant une heure et demi , puis retirer le ballon du rotavap et attendre qu'il soit froid .
- ❖ 5- Peser la ballon afin de calculer le rendement d'extraction .
- ❖ 6- Recueillir l'extait dans de l'eau choud (l'eau distillée Bouillante) c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation .



Figure35: les étapes de l'évaporation.

3-3-5 Fractionnement de l'extrait brut (Extraction liquide –liquide) :

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération successive par quatre solvants organique de polarité croissante, il s'agit de l'Hexane, Chloroforme, une Acétate d'éthyle et N 2-Butanol.

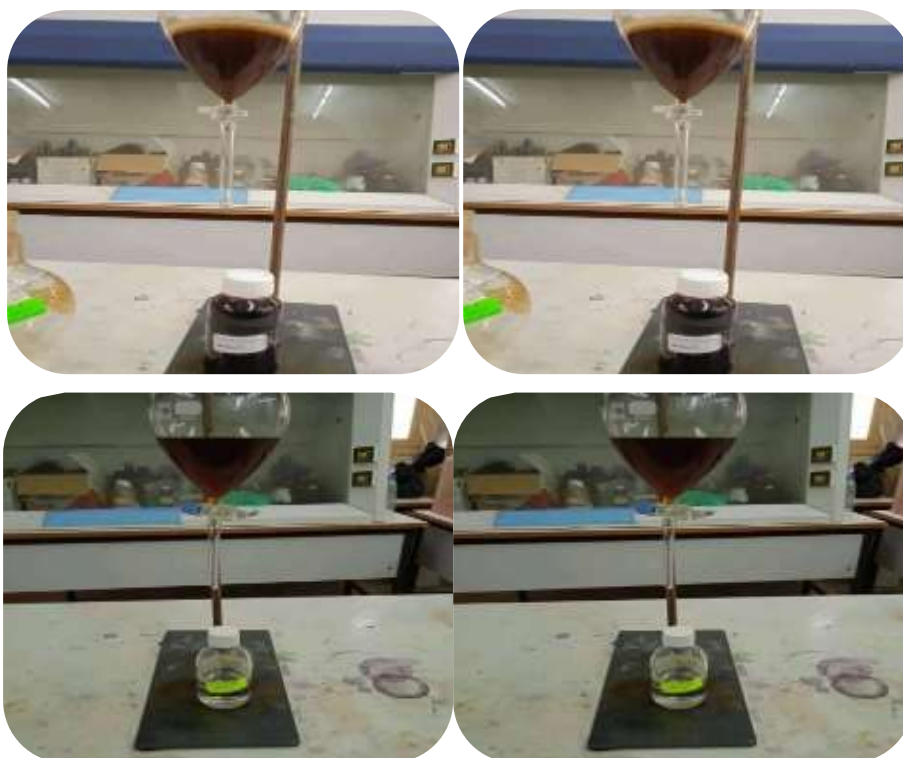
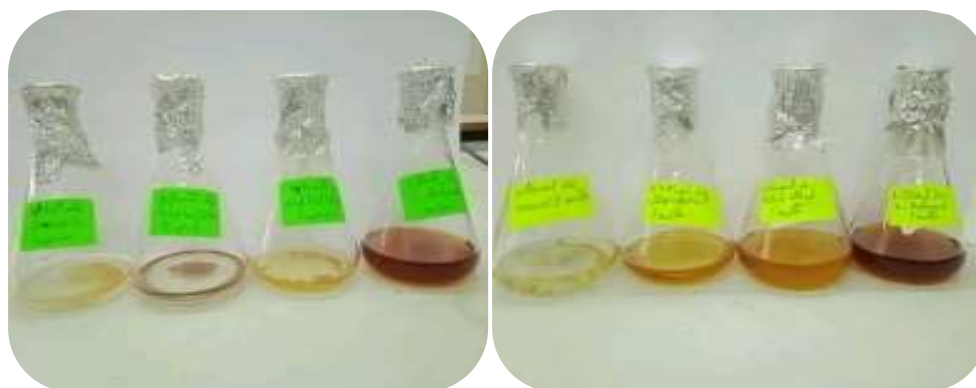


Figure 36 : Etape de séparation des extraits macérer dans des solvants à polarité croissante



Écorce

Feuille

Figure 37: l' extrait obtenue après séparation



Écorce



Feuille

Figure38 : extrait sec

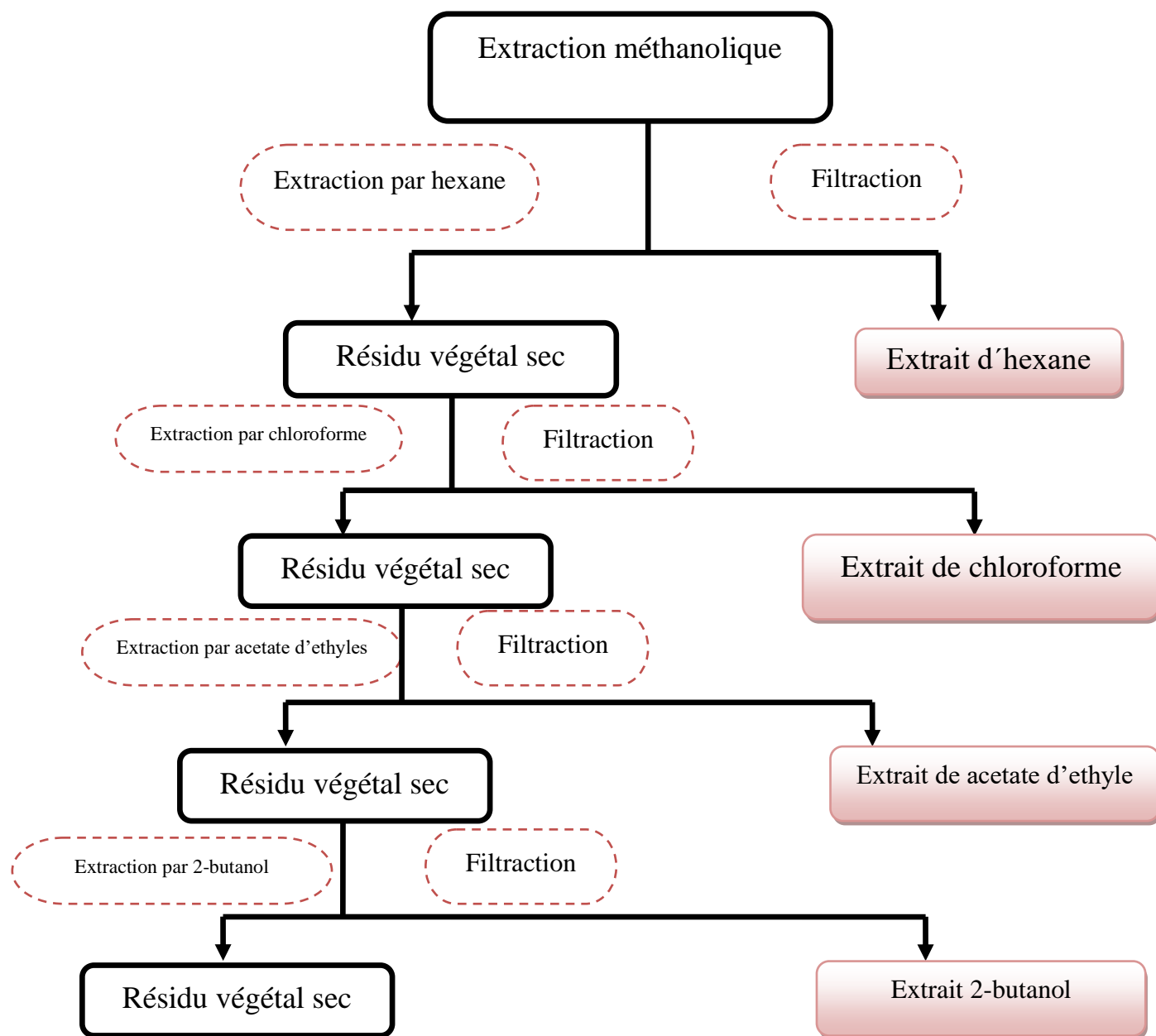


Figure39 : Protocole pour extraits les poly phénols

4-Analyses qualitatives (screening phytochimique)

Dans cette étude, la présence de certains groupes de métabolites secondaires dans les plantes a été démontrée.

4-1 Réactions de caractérisation :

L'analyse photochimique a été réalisée sur l'extrait obtenu par broyage des feuille et des écorce en utilisant des méthodes chimiques pour déterminer les différents composants. (Aiyegoro., et OKoh.2010) (Tamilselvi et al,2012)

Certaines familles chimiques de la plante on été révélées grâce à des tests de détectoin chimique telle que : les composes phénoliques et les tanins (réaction au chlorure ferique) , les flavonoïdes (réaction cyanidine).

4-2 Criblage des métabolites secondaires

-Criblage des poly phénols

❖ **Le criblage** : C'est un opération d'identification qui consiste à retenir , sur le réseau poreux les praticules dont la taille est supérieure à celle des pores filtrants (Wherle, 2007).

❖ **Les polyphénols** : sont une catégorie de molécules organiques largement répandues dans nos aliments, réputés pur leurs propriétés antioxydantes .il sont constitués d'unassemblage complexe de molécules plus petites, les phénols, comportant un noyau benzénique et des fonctions hydroxyle. (Boubekour, 2019).

L'extrait (50 mg) a été dissous dans 5 ml d'eau distillée. A ceci 3 ml d'acétate de plomb à 10% ont été ajoutés. Un précipité blanc indique la présence des polyphénols.

-criblage des flavonoïdes : La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par la réaction à la cyanidine. Cette réaction utilise en effet le pouvoir réducteur de métaux en milieu acide pour réduire spécifiquement le noyau flavonoïdique(Boubekour, 2019).

On met 10 g de produit dans un 150 ml de Hcl à 1% pendant une nuit, puis on filtre et procéder au test. On prend 10 ml de filtrat, le rendre basique par un (NH₄OH) . l'apparition de la couleur jaune clair indique la présence des flavonoïdes (Kharchi ,2017).

5-Analyses quantitatives

L'étude quantitative d'extraits phénoliques, préparés à partir de la plante étudiée par des Dosages spectrophotométriques visent à déterminer les teneurs en polyphénols totaux et en Flavonoïdes.

5-1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC)

(Zellagui et Arab, 2014).

5-1-1 Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide se composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PM_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PW_{12}O_{40}$). est réduite, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), la couleur produite, ou l'absorption maximale à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans les extraits végétaux.

5-1-2 Mode opératoire

La détermination des polyphénols a été effectuée à l'aide d'un test photométrique modifié

Pour Folin-Ciocalteu

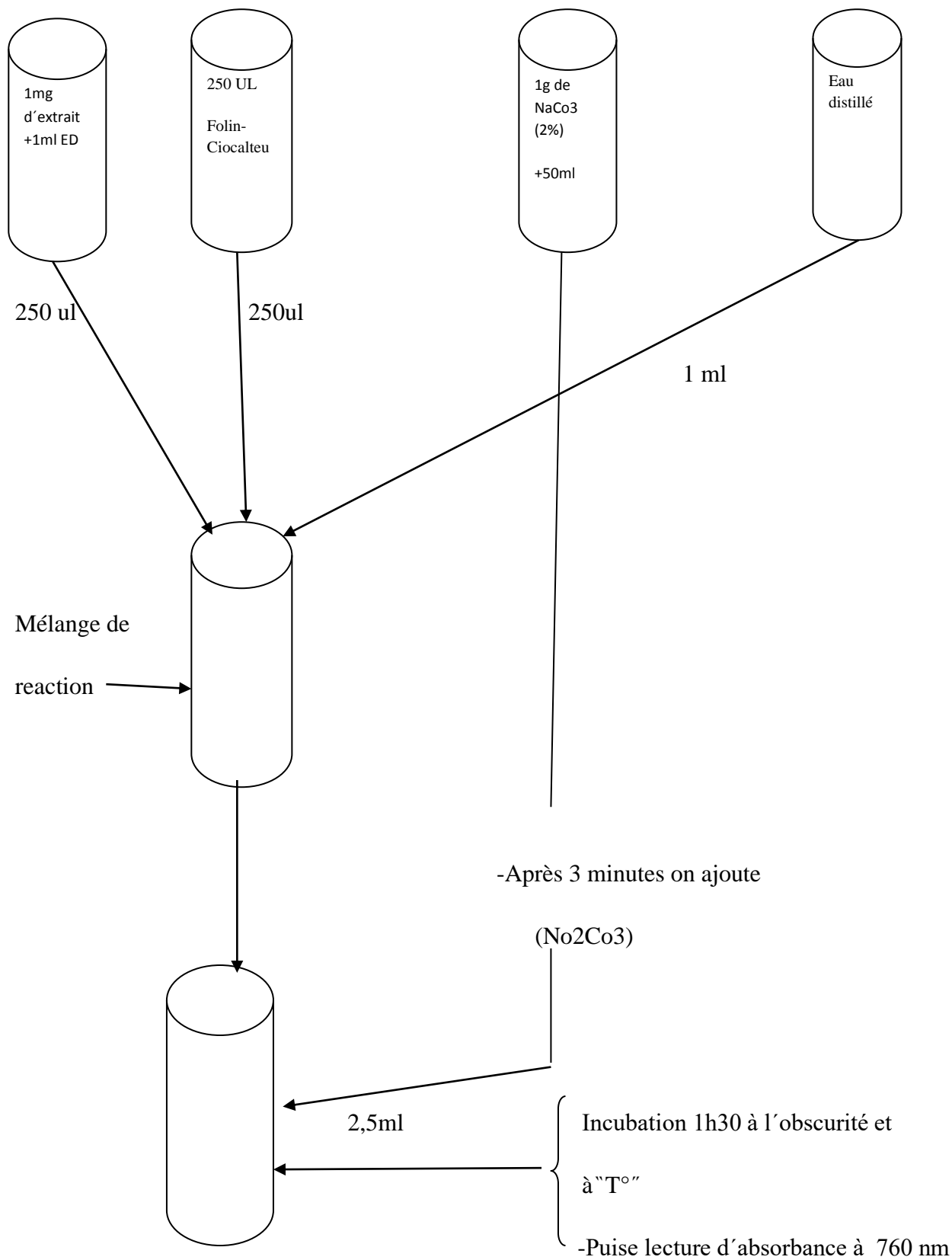
• Le protocole

- 1mg de chaque extrait méthanolique plus 1ml de l'eau distillée ont été mélangés avec 250 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (IN), (1g Na_2CO_3 +50ml l'eau distillée) de carbonate de sodium (2%).
- Les solutions ont été homogénéisées, couvertes et protégées de la lumière et conservées à température ambiante pendant 30 minutes.
- L'obtention de La courbe standard, des solutions standard sont utilisées d'acide Gallique, en Utilisant l'eau à blanc À la même concentration que l'échantillon.

L'absorbance est mesurée à 760 nm (Madanet *al.*,2010). (Figure39).



Figure40 : protocole du dosage des polyphénols.



Figur41 : les étapes du dosage des polyphénols totaux (Madan et al.,2010).

Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g E d'acide gallique / mg d'extrait}$) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée d'acide gallique.

5-2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3)

5-2-1 Principe

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 430 nm.

5-2-2 Mode opératoire

La méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium a été utilisée pour les flavonoïdes.

- Chaque extrait de plante (2 ml) a été mélangé séparément avec 2 ml d'une solution de chlorure d'aluminium dans le méthanol (2%)
- . - Les solutions ont été homogénéisées, couvertes et protégées de la lumière et maintenues à la température ambiante.
- L'absorbance a été mesurée à 430 nm. Aussi En utilisant le méthanol à blanc.
- La courbe standard il a été reçu en utilisant une concentration en série de solutions de quercétine.

☞ La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

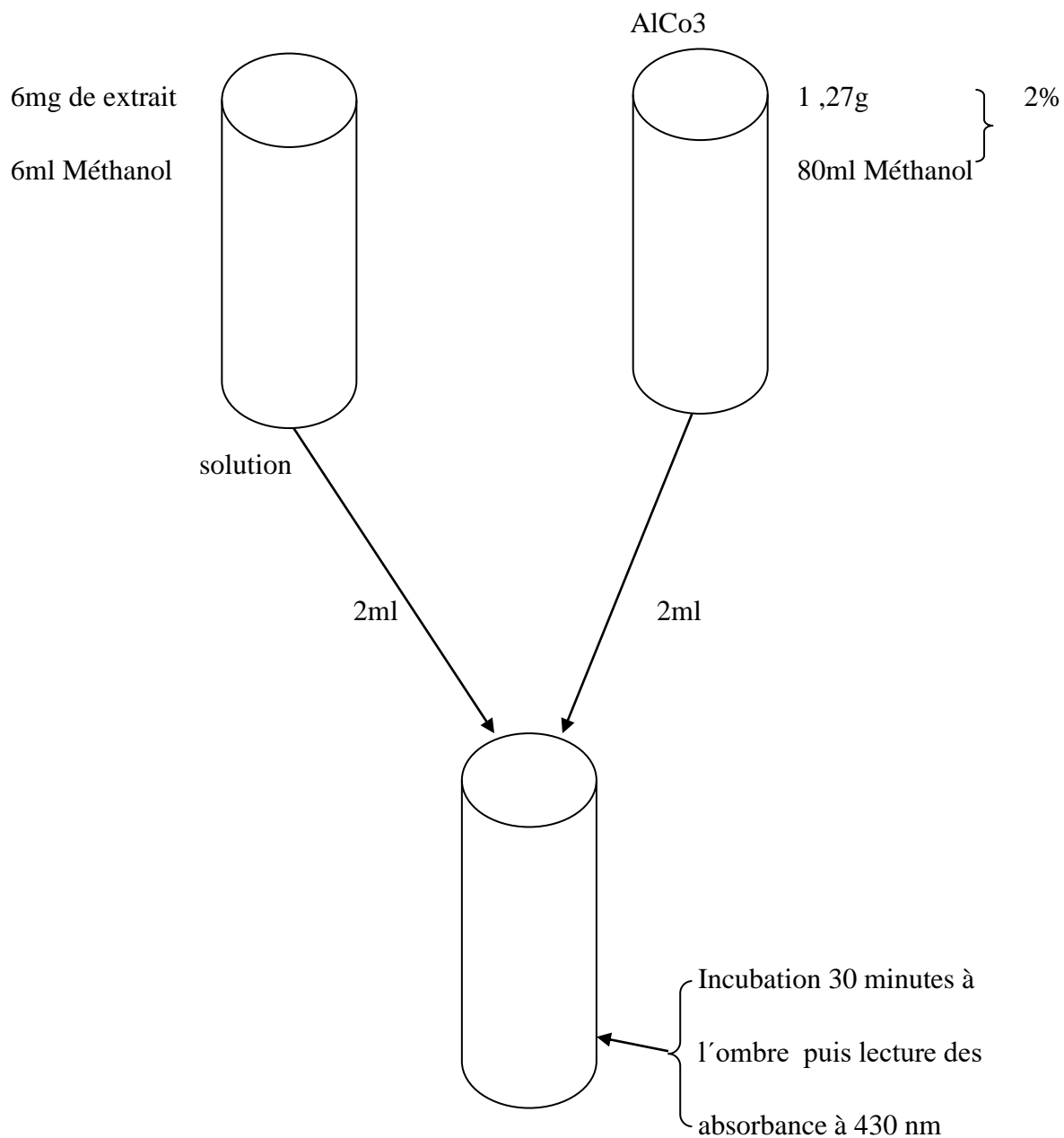
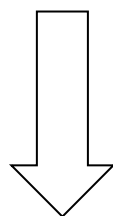
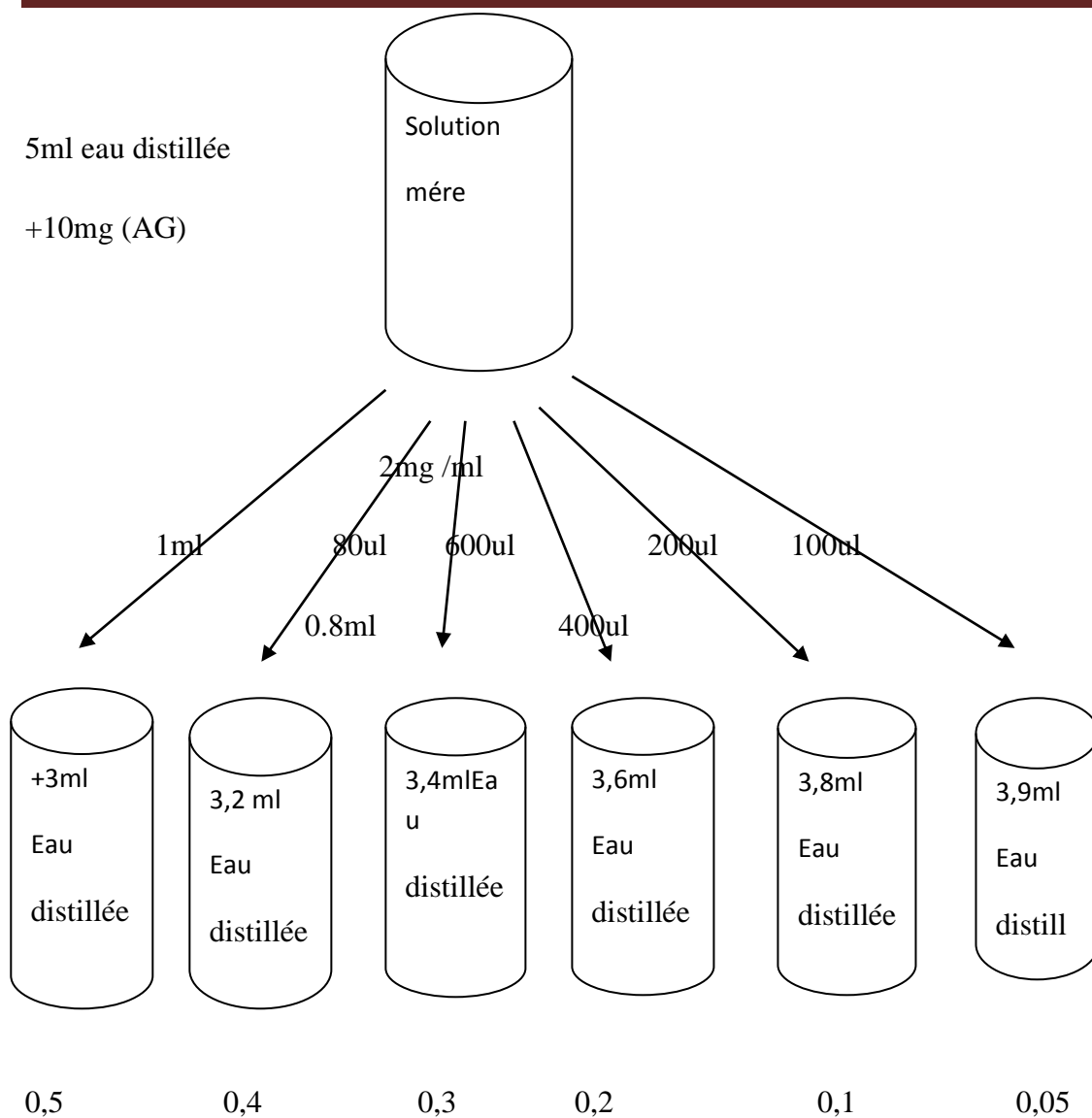


Figure42 : les étapes du dosage des flavonoïde (Madan et al.,2010)



La même chose pour la courbe d'étalonnage de la quercétine

Figure43 : les étapes courbe d'étalonnage de l'acide Gallique .

CHAPITRE II :
RESULTATS ET
DISCUSSIONS

II-Screening phytochimique

Des tests phytochimiques ont été réalisés sur *punicagranatum L* et en utilisant des réactifs de détection spécifiques basés sur des réactions spécifiques de précipitation et de décoloration.

Les résultats expérimentaux de l'examen phytochimique sont rapportés dans le tableau N°6

Tableau 7 : Les résultats expérimentaux de l'examen phytochimique

Presance :

L'examen phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires dans les feuille et écorce : polyphénols, flavonoïde et tanins galiques

Travaux antérieurs sur le test chimique de *punicagranatum* :

Concernant les feuilles, elles ont été étudiées dans la région de Khemis Miliana par ACHOUCHE Mohammed et AZOUZ Ahmed (2019), où ils ont constaté que les Tanins et polyphénols sot présents en grande quantité, contrairement aux flavonoïdes, ce qui se rapproche de nos résultats.

Métabolites secondaires	<i>Punicagranatum L</i> (feuille)	<i>Punicagranatum L</i> (écorce)
poly phénols	+	+
Tanins galiques	+	+
Flavonoïdes	+	+

Quant aux écorce, ils ont étudié la région de Biskra par Miloud et Roumaïsa (2019), où ils ont constaté que les flavonoïdes et tanins sont grande quantité, contrairement aux polyphénols ,ce qui rapproche de no résultats.

1-Rendement d'extraction : Le rendement de l'extrait est calculé par le rapport entre la masse des polyphénols extraits et lamasse de la matière première végétale transformée. Le rendement exprimé en pourcentage estcalculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1: poids du ballon avant évaporation.

P2 : poids du ballon après évaporation

P3 : poids de la matière végétale de départ

2-Rendement d'extrait punicagranatum :

❖ -Les feuilles

-La masse du ballon vide =145,88g

-Ballon vide+masse de l'extrait sec= 166g

-Masse de l'extrait sec= 20,12g

❖ l'écorce :

-La masse du ballon vide =98,8g

-Ballon vide+masse de l'extrait sec= 135,58g

-Masse de l'extrait sec= 36,78g

Nous avons calculé le rendement de l'extraction, le résultat obtenu est présente dans la figure suivante :

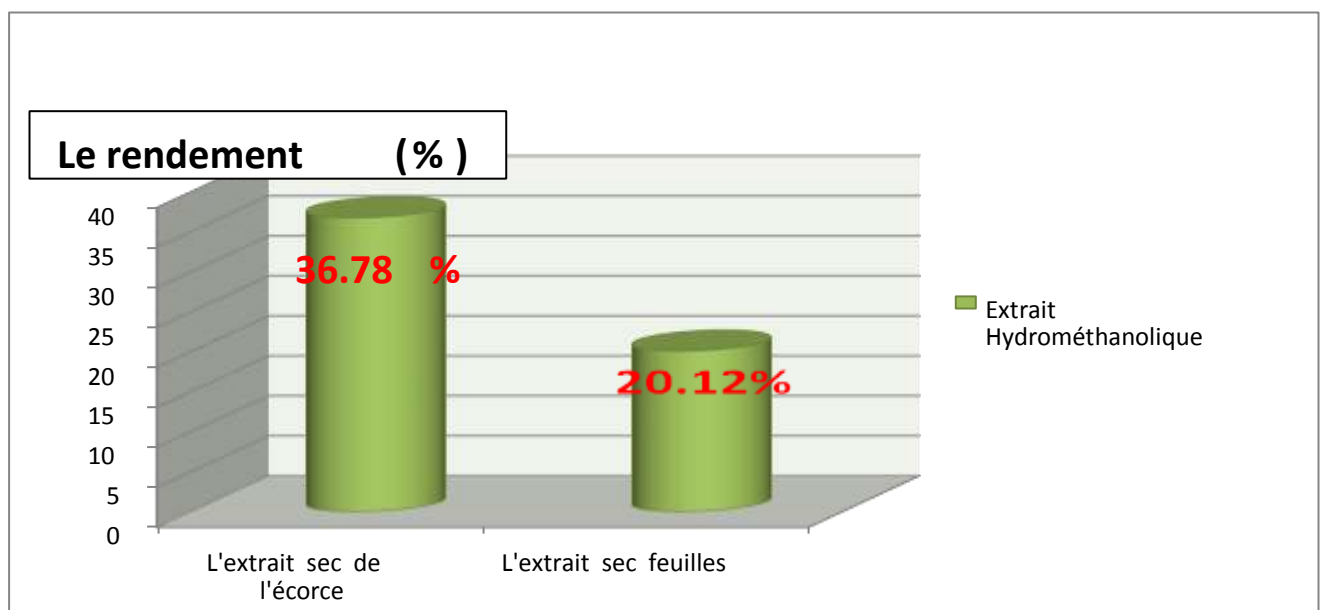


Figure44 : Rendement d'extraction de les feuilles et l'écorce de plante punica granatum l

D'après les résultats obtenus, on remarque une différence dans le rendement en extrait de *punicagranatum l*, puisque l'on constate que l'extrait d'écorce estimé à 36,78% est supérieur à l'extrait de feuilles estimé à 20,12%.

3-Rendements des extraits :

A partir de l'extrait méthanolique brut de la plante, un quart des extraits a été préparé avec des solvants de polarité croissante à savoir l'Hexane, le Chloroforme, l'Acétate d'éthyle et le N2-butanol. Les rendements ont été calculés dans le tableau , et la figure sur la base de l'extrait méthanolique brut, et d'autres études favorisent le rapport de masse sèche.REF

Ces rendements sont moyen par rapport à d'autres études cela est peut-être dû à la longue durée de conservation des extraits méthanolique

Tableau6 : rendement des extractions méthanolique par solvants à polarité croissante de feuilles et de l'écorce (*punicagranatum l*).

extrait	Rendement % (feuille)	Rendement % (écorce)
Hexane	0,76%	0,11%
Cloroforme	0,16%	0,96%
Acétate d'éthyle	0,41%	1,41%
N2-butanol	10,63%	4,92%

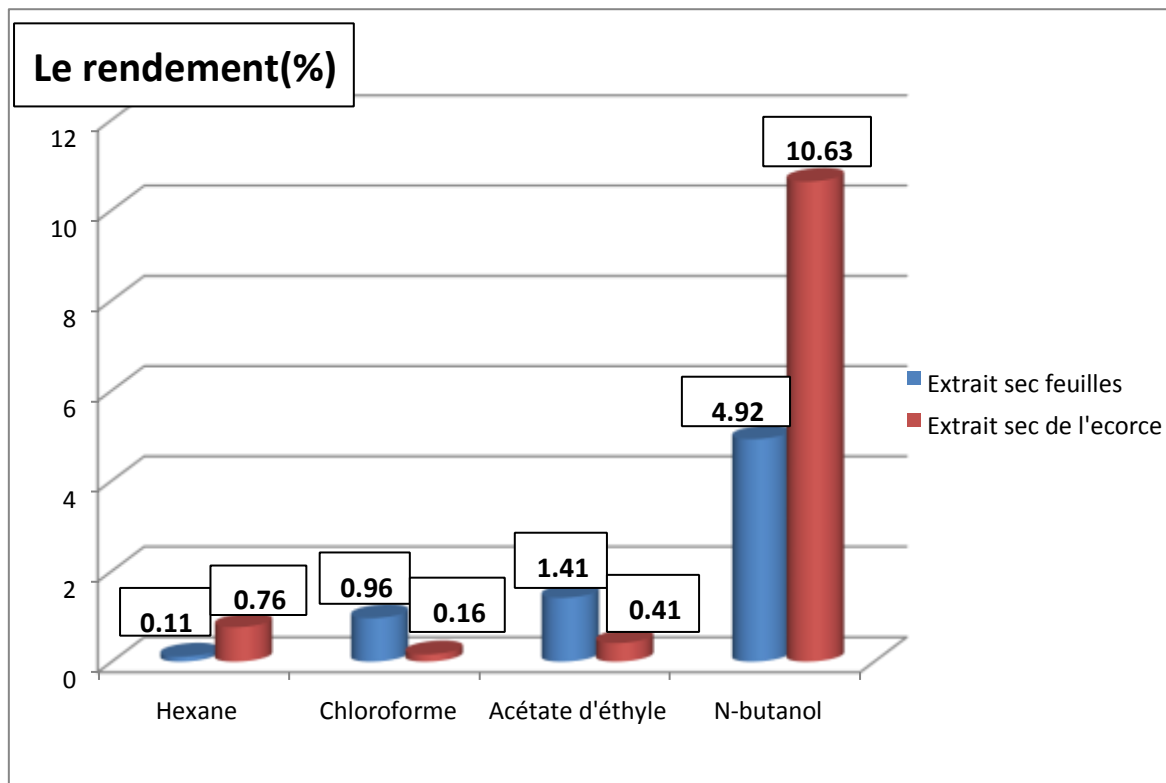


Figure45 : rendements des extraits de feuilles et écorce de *punicagranatum L*

4-Quantification des composés phénoliques

Dans cette étape en va d'avoir une estimation sur la teneur en poly phénol totaux et en Flavonoides de l'échantillon

4-1 .La teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le dosage des polyphénols totaux nous donne une estimation globale de la teneur des différentes classes de composés phénoliques présents dans l'extrait.

Des méthodes colorimétriques ont été utilisées pour évaluer la quantité de composés phénoliques dans les matières végétales. Le trempage et le choix du solvant utilisé sont les principaux critères à considérer pour une extraction rentable. Avant de procéder à la détermination de la teneur en composés phénoliques ; Nous avons généré une courbe de l'étalonnage à l'aide d'acide gallique.

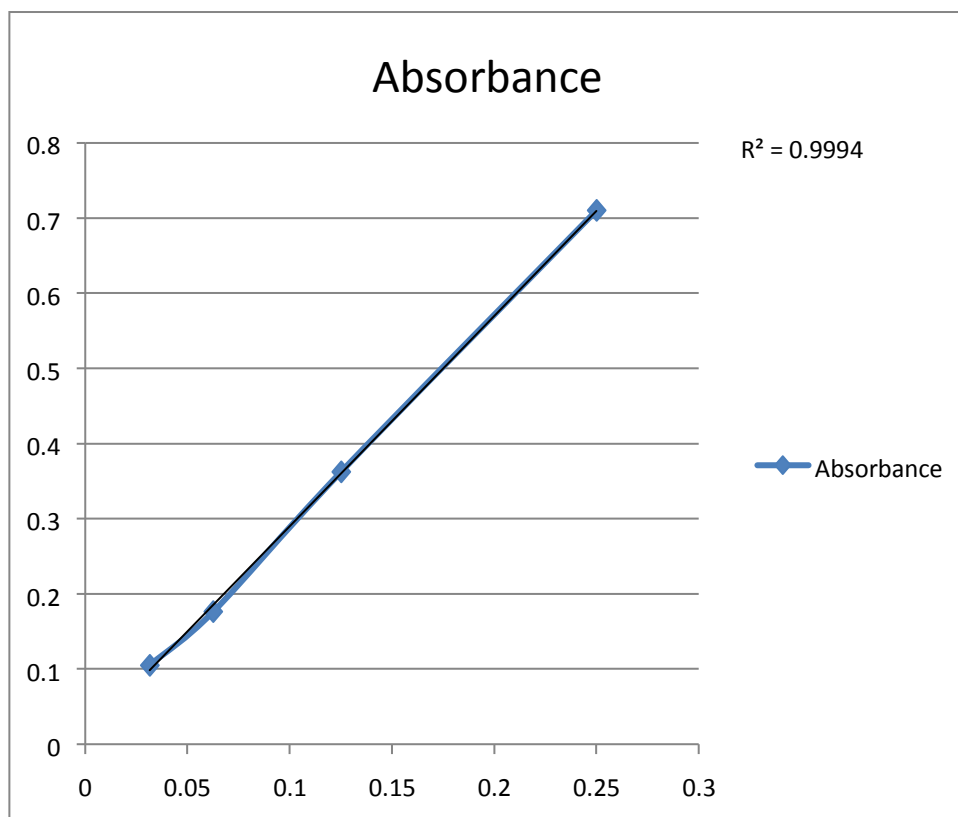


Tableau8 : courbe détalonnage de l'acide gallique

Concentration d'acide gallique Mg /ml	Absorbance
1	0,058
0,5	0,067
0,25	0,744
0,12	0,075
0,06	0,057
0,03	0,067

Figure46 : courbe détalonnage de l'acide gallique.

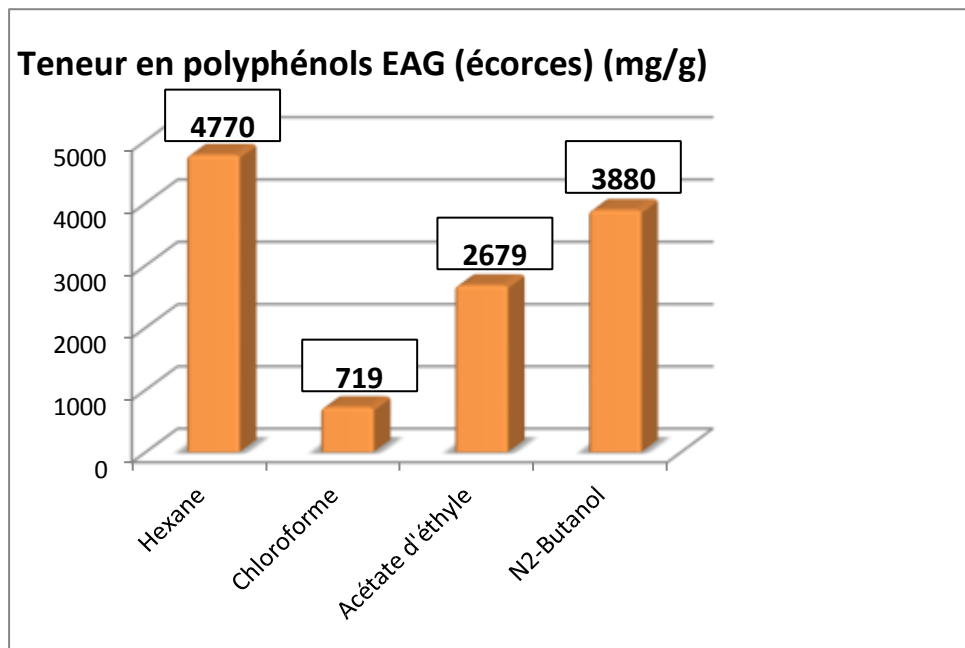


Figure47 : Histogramme de teneurs des polyphénols des extrait de écorce.

Les résultats obtenus durant cette étude, montre que les teneurs en phénols totaux de pinicagranatum (écorce) de l'extrait méthanoliques de Hexane (4770 EAG mg/g).

Sont supérieure à ceux de N2-butanol (3880 EAG mg/g) et Acétate d'éthyle (2679 EAG mg/g) et Chloroforme (719 EAG mg/g). Ceci indique que l'extrait Hexnique sont très riche en polyphénols par rapport aux autres extraits.

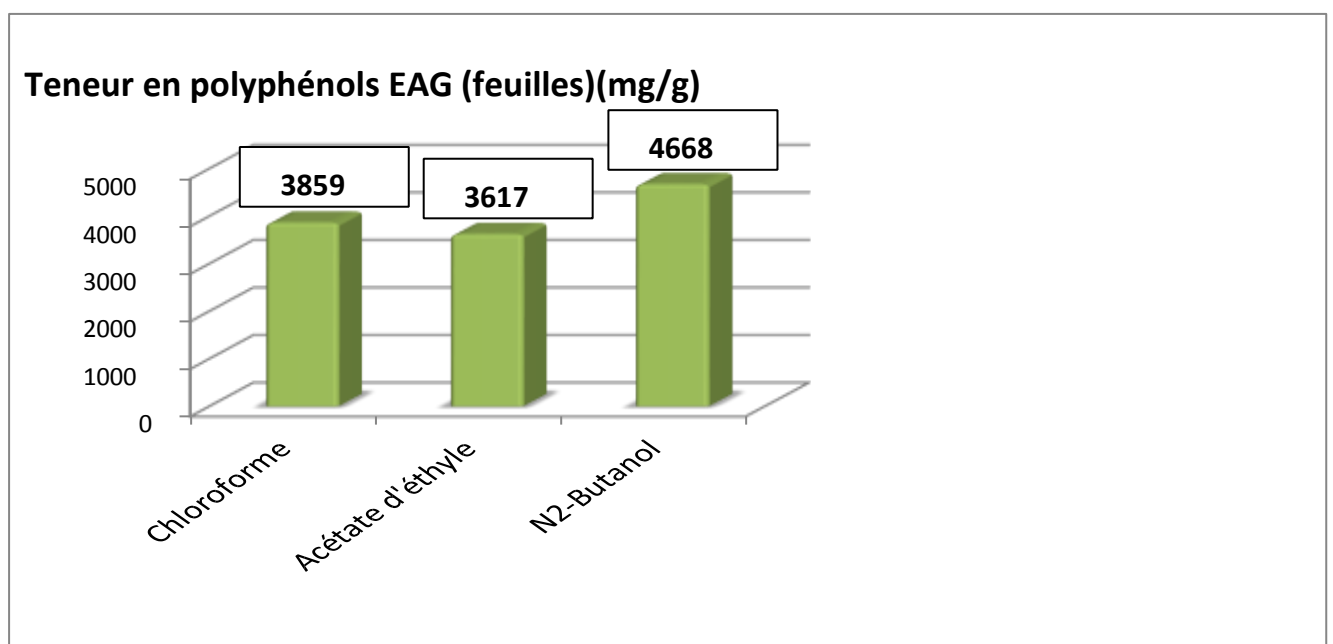


Figure48 : Histogramme de teneurs des polyphénols de l'extrait de feuille

Les résultats obtenus durant cette étude, montre que les teneurs en phénols totaux de pinicagranatum (feuilles) de l'extrait méthanoliques de N2-Butanol (4668 EAG mg/g)

sont supérieure à ceux de Chloroforme (3859 EAG mg/g) et Acétate d'éthyle (3617EAG) . Ce ci indique que l'extrait Butanolique sont très riche enpolyphénols par rapport aux autres extraits.

A travers les résultats obtenus, nous avons remarqué que l'extraitméthanolique(d'Acétate d'éthyle , N2-butanol et Chloroforme) de feuille est supérieur d'extraitméthanolique (d'Acétate d'éthyle , N2-butanol et Chloroforme) de écorce.

4-2 Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). à partir de la courbe d'étalonnage du quercétine.

Le tableau ci-dessous représente les résultats du dosage des flavanol

Tableau9: courbe d'étalonnage de la quercétine

Concentration de quercétin	Absorbance
0,5	2,53
0,4	2,405
0,3	2,393
0,2	2,322
0,1	2,251
0,05	1,227

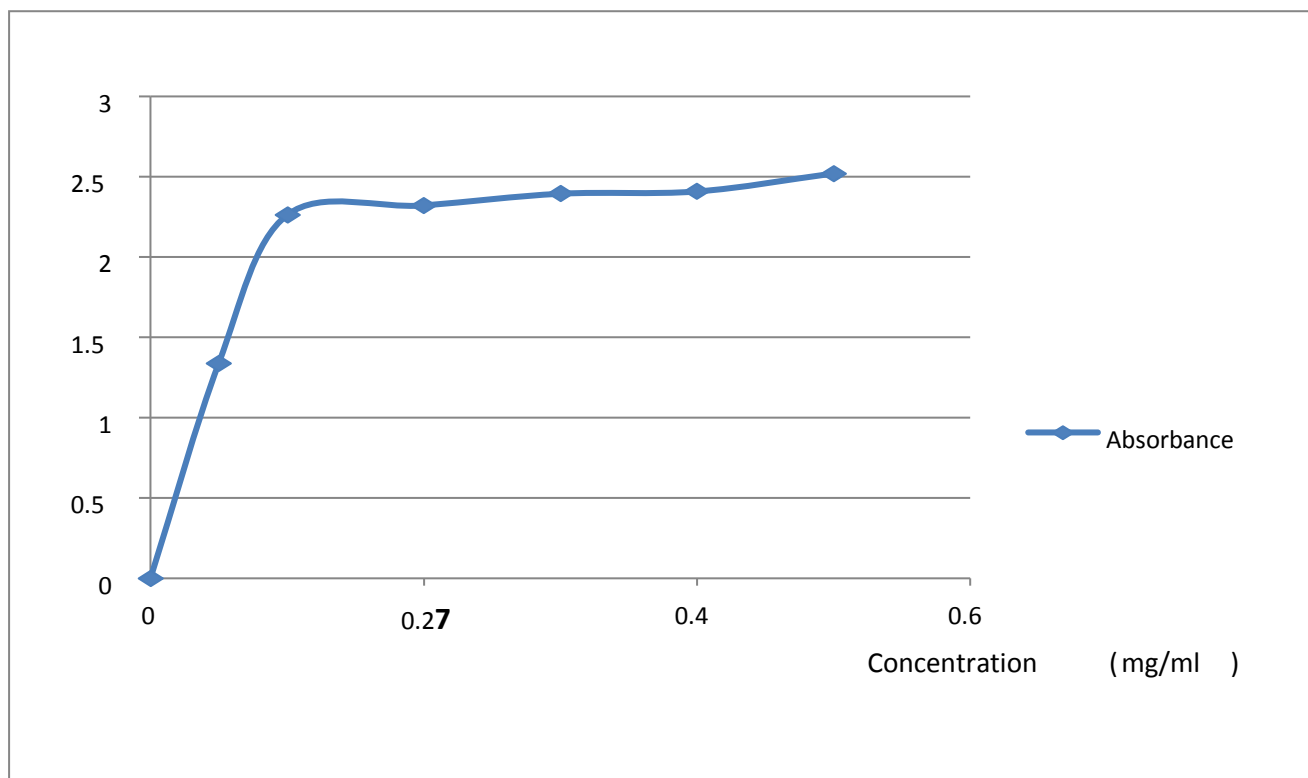


Figure49 : Courbe d'étalonnage de quercetine

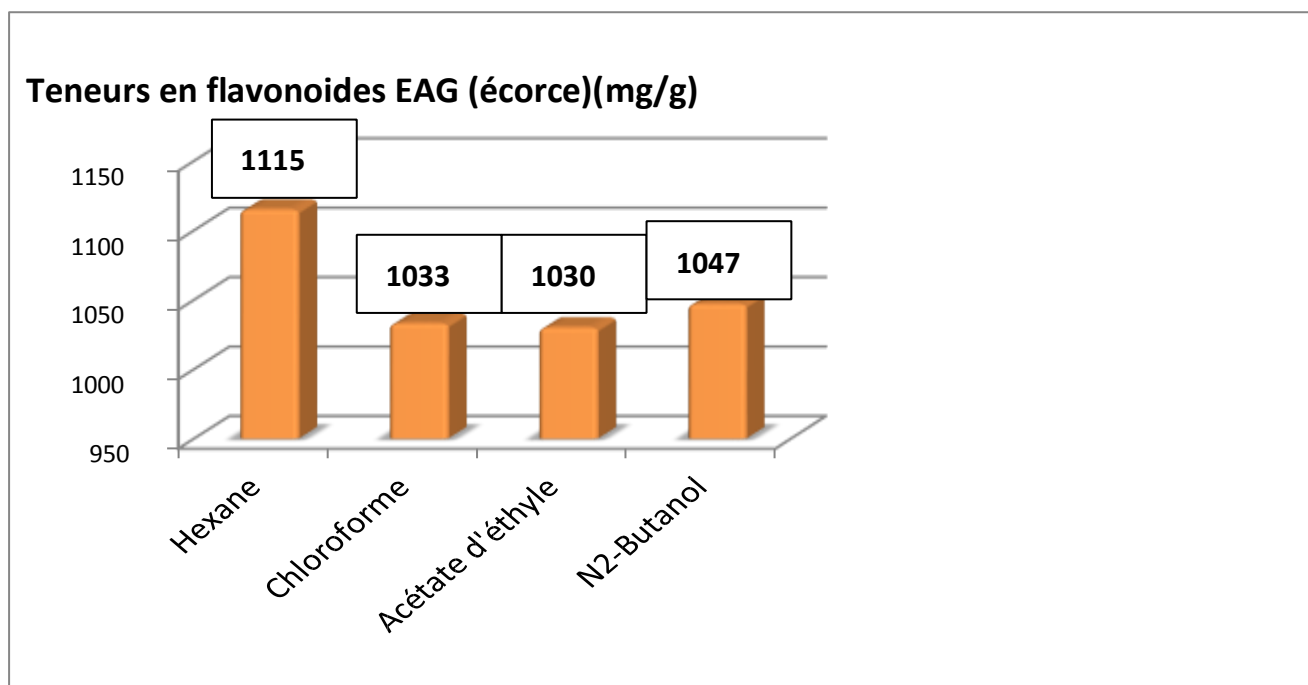


Figure50 : Histogramme de teneurs des flavonoïdes des extraits d'écorce.

Les résultats obtenus durant cette étude, montre que les teneurs en flavonoïde totaux de *pinicagranatum* (écorce) de l'extrait méthanoliques de Hexane (1115 EAG mg/g)

sont supérieure à ceux de N2-butanol (1047 EAG mg/g) et Chloroforme (1033 EAG mg/g) et Acétate d'éthyle (1030 EAG mg/g) . Ceci indique que l'extrait Hexnique sont très riche en flavonoïde par rapport aux autres extraits.

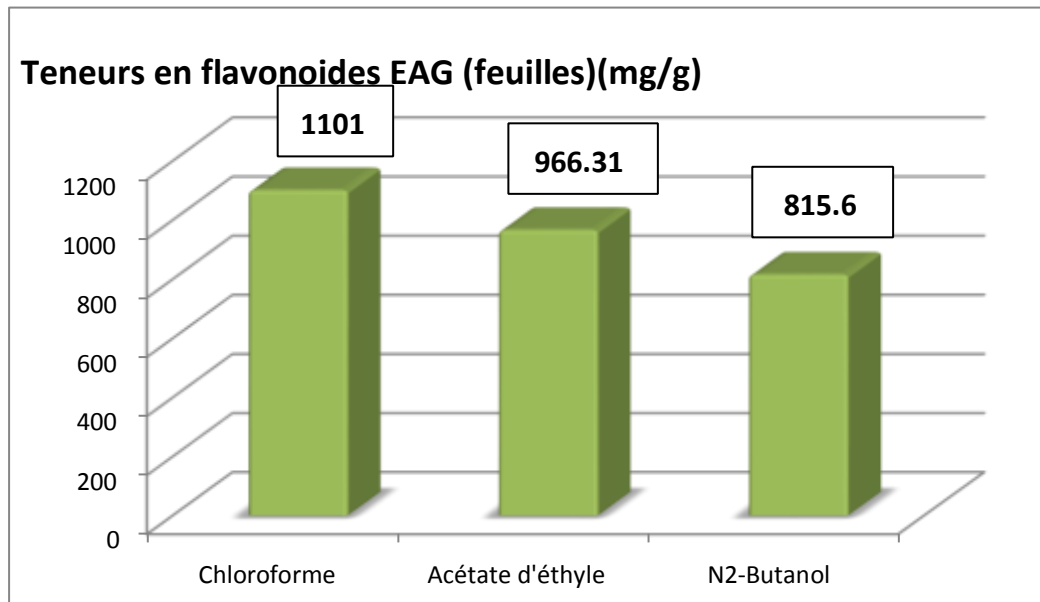


Figure51 : Histogramme de teneurs du flavonoïde de l'extrait de feuille

Les résultats obtenus durant cette étude, montre que les teneurs en phénols totaux de *pinicagranatum* (feuilles) de l'extrait méthanoliques de Chloroforme (1101 EAG mg/g)

sont supérieure à ceux de Acétate d'éthyle (966,31 EAG mg/g) et N2-butanol (815,6EAG mg/g) . Ce ci indique que l'extrait Chloroformlique sont très riche en flavonoïde par rapport aux autres extraits.

-Comparaisant :

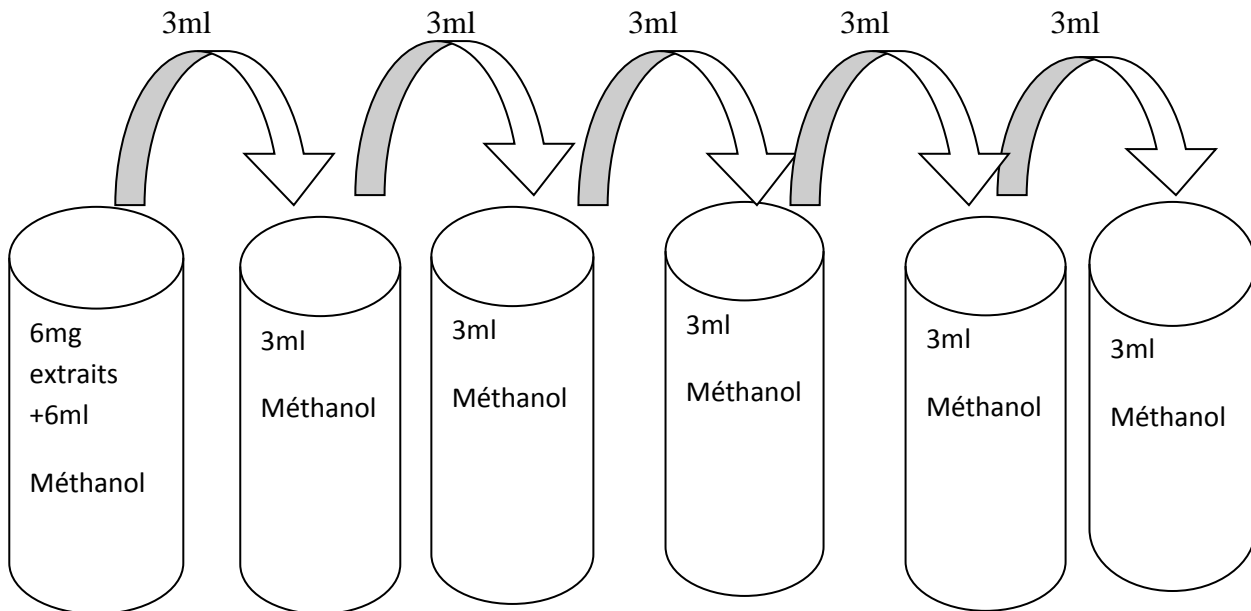
Les résultats obtenus durant cette étude, montre que les teneurs en flavonoïde totaux de *pinicagranatum* de l'extrait méthanoliques de chloroforme (1101 EAG mg/g) de feuilles supérieure à Chloroforme (1033 EAG mg/g) d'écorce, contrairement les autres extrait (Acétate d'éthyle et N2-butanol) d'écorce à supérieure d'extrait des feuilles (Acétate d'éthyle et N2-butanol).

5-Test de reduction de radicale stable DPPH:

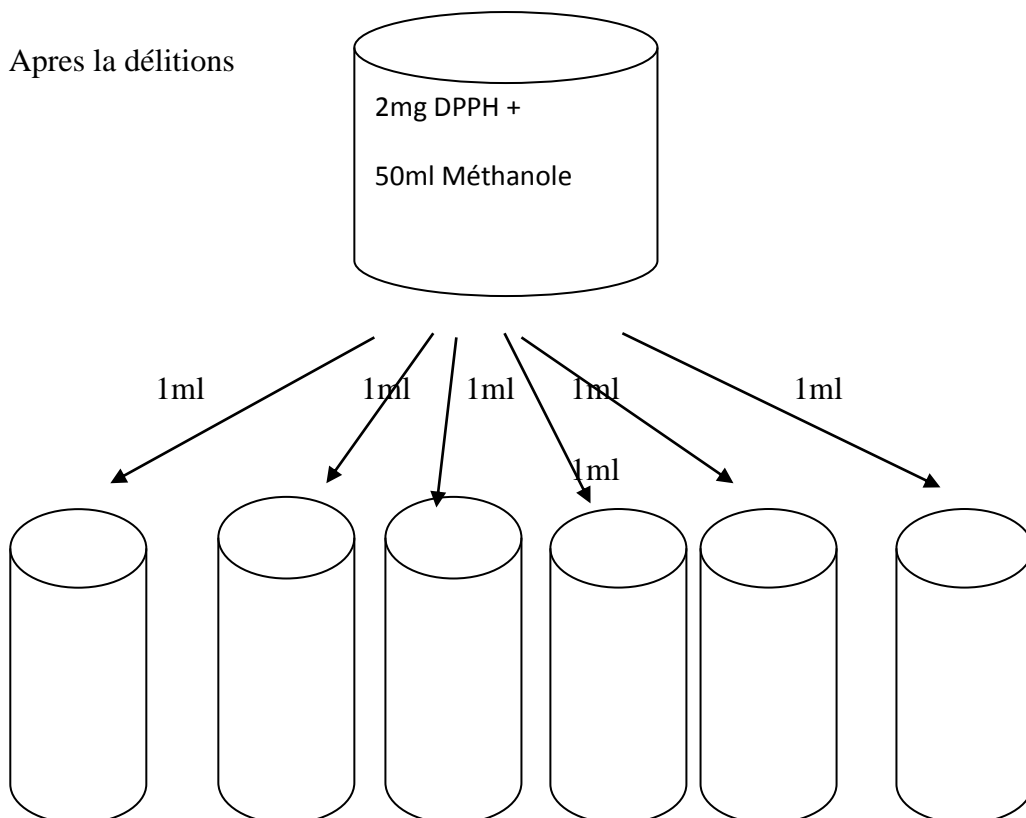
Objectif: permet de mesure le pouvoire anti raducalaire de molucule pure ou d'extrait vegetaux dan un système model (sovant organique et la tamperture ambiante)

La reduction de DPPH et facilement mesure par spectrophotmetrie 517 nm

❖ Principe :



Après la délitons



Incubation 30 minute a l'obscurité T° puis lecture d'absorbance à 517nm

- Calculs de pourcentage de l'inhibition :

Loi:

$$(INB\%) = \frac{Ac - At}{Ac} * 100$$

On a :

- INB %: Pourcentage d'inhibition
- At : Absorbance du test effectuée
- Ac : Absorbance de contrôle

Dans le test DPPH, ces radicaux libres sont réduits par des composés antioxydants, et leur couleur passe du violet foncé au jaune pâle, réduisant son absorbance à 517 nm.

Les résultats présentés sur la figure représentent les concentrations des extraits qui piègent 50% de la racine DPPH (IC50). Plus cette concentration est faible, plus la puissance est élevée. Forte teneur en antioxydants.

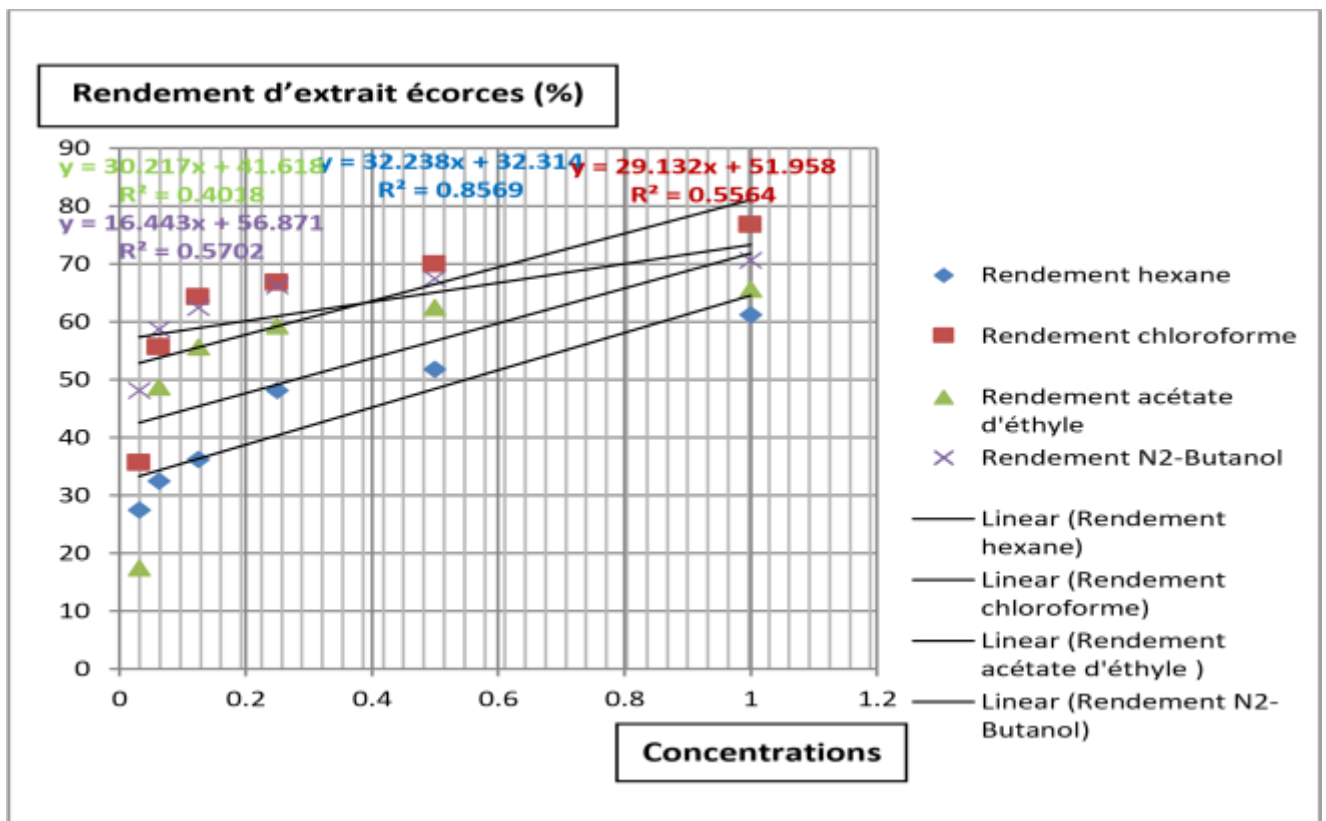


Figure 52 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH, en fonction de concentrations utilisées pour les extraits de chloroforme, d'Hexane, d'acétate d'éthyle et de n- butanol de plante *punicagranatum L* (écorce)

A travers les résultats de la courbe ci-dessus nous remarquons que le Chloroforme ($y=29,132x+51,958$) le rendement ($R^2=0,5564$) le pourcentage d'inhibition de radicale est important pour les extraits n-butanol et acétate d'éthyle et Hexane.

-Détermination d'IC50

L'IC50 est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Cette activité est mesurée comparativement à l'acide ascorbique (antioxydant standard).

Les concentrations effectives d'échantillons nécessaires pour piéger le radical DPPH de 50 % (0.05059mg /L) ont été calculées à partir de l'équation de régression, entre 50% d'inhibition et la concentration. Il existe une relation inverse entre le pourcentage de potentiel d'inhibitions de l'échantillon et les valeurs de IC50

Tableau10 : Valeurs d'IC50 des extraits écorce *punicagranatum*L.

Extrait	IC50 mg/l
Hexane	0,3139
Chloroforme	0,2320
Acétate d'éthyle	0,2730
N2-butanol	0,2421

D'après le tableau, la fraction Chloroforme représente l'extrait le plus actif avec une IC50 =0.2320 mg/l suivi par la fraction N-Butanol(0.2421mg/l), puis par l'extrait Acétate d'éthyle (0.2730 mg/l) et enfin l'extrait de Hexane, avec une IC50 (0.3139mg/l).

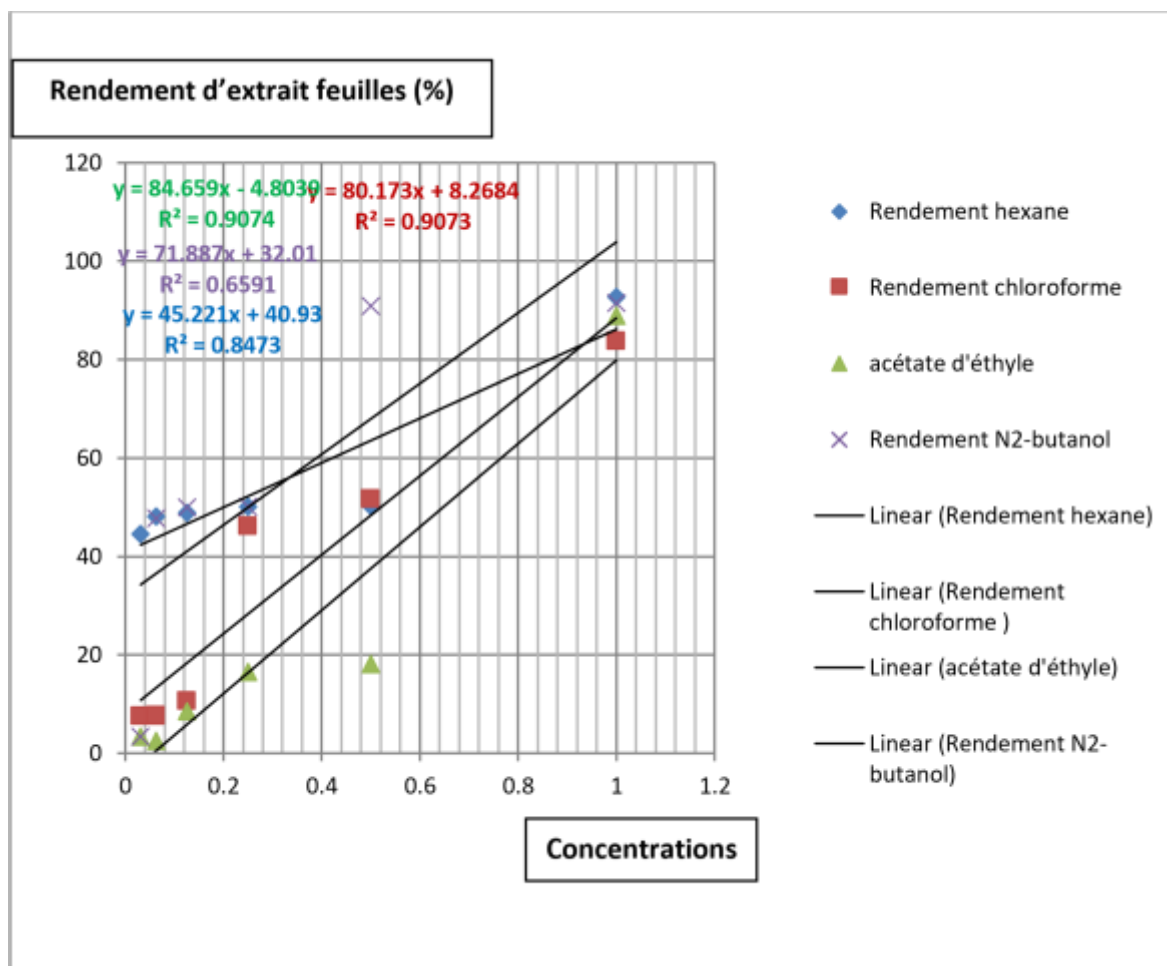


Figure53 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH, en fonction de concentrations utilisées pour les extraits de chloroforme, d'Hexane, d'acétate d'éthyle et de n-butanol de plante *punicagranatum L* (feuille)

Tableau11 : Valeurs d'IC50 des extraits feuilles *punicagranatumL*.

Extrait	IC50 mg/l
Hexane	0,2522
Chloroforme	0,4253
Acétate d'éthyle	0,7196
N2-butanol	0,2873

D'après le tableau, la fraction Hexane représente l'extrait le plus actif avec une $IC_{50}=0.2522\text{mg/l}$ suivi par la fraction N-Butanol IC_{50} (0.2873mg/l), puis par l'extrait Chloroforme IC_{50} (0.4253 mg/l) et enfin l'extrait d' Acétate d'éthyle , avec une IC_{50} (0.7196mg/l).

-Comparaison :

D'après les résultats obtenus, Chloroforme représente l'extrait le plus actif avec $IC_{50} =0.2320\text{ mg/l}$ dans l'écorce, et l' de Hexane est extrait, actif le plus faible avec une IC_{50} (0.3139mg/l), contrairement dans les feuilles la fraction Hexane représente l'extrait le plus actif avec une $IC_{50} =0.2522\text{ mg/l}$, d' Acétate d'éthyle est extrait, actif le plus faible avec une IC_{50} (0.7196mg/l).

CONCLUSION

Conclusion

Conclusion :

Les plantes médicinales de la nature présentent une source indéfinie de molécules bio puissantes , ces molécules résultant de métabolites secondaires produits à partir de métabolisme des nutriments, que sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicinales (médecine traditionnelle), pharmacologiques, cosmétiques et alimentaires.

Au cours de ce travail, nous avons extrait de polyphénols et les flavonoïde du punicagranatum de deux manières (trempage et par Soxhlet) ensuite nous avons testé l 'effet antioxydant du punicagranatum en laboratoire, des métabolites secondaires ont été détectés dans une plante ou nous avons trouvé des poly phénol et des les flavonoïde, le l 'activité antioxydant des extraits de plantes a été évaluée a travers une étude, les résultats ont montré que l 'activité antioxydant dépend de la famille des plante et de la méthode d 'extraction, de plus, la meilleure activité anti-radicalaire a été observée pour les extraits de la famille des lythracées en utilisant le méthode de Soxhletlythraceae qui contient un puissant pouvoir antioxydant IC50.

Et enfin on conclut que cette espèce végétale n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études, pour cette raison, il sera intéressant de se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique en tenant compte a de la période et du lieu de récolte, etc.Ceci va permettre d'observer les différents changements sur les plans qualitatifs et quantitatifs de la composition chimique afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période cette composition chimique pourrait avoir une activité intéressante.

REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUE

Les références bibliographiques

- **Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD et Mukhtar H.2005.** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Jan 2005;113(3):423-
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2ème Ed. Lavoisier, Paris
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier, Paris. 1120 p
- **Decaux I.(2002).** Phytothérapie: Mode d'emploi. Ed: le bien public. P: 6.
- **GarnierG,Bezanger-BeauquesneL, DebranxG .,(1961):**Ressources médicinales de la flore française.
- **Iserin, 2001.**
- **Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E., 2002.** Chemo preventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 71, 203–217
- **Storey, T. (2007).** La grenade, le fruit médicament, Magazine NEXUS. Santé, France, 54p.
- **Wald Elodie. 2009.** Le grenadier *Punicagranatum* : Plante historique et evolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincaré. Thèse. 158p.
- .-**Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999).**Antioxydant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595–603
- .-**Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007).**Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine*, 43(1), 4–15
- Koolman, J. (1999).** Atlas de poche de biochimie
978-0-87893-407-2.
- A b c Graham, SA,RF Thorne, et JL Reveal (1998).**« Validation des noms de sous-famille dans Lythraceae ». *Taxon*. 47 (2) : 435-436. doi : 10.2307/1223775.JSTOR 1223775.CS1 maint : plusieurs noms : liste des auteurs (lien)
- A b c Graham, Shirley; Cavalcanti, Taciana B.** "Lythracées néotropicales". *Jardine botanique royales, Kew*. Récupéré le 28 mars 2011.
- A b c d e f g h i j k l Judd, Walter S; Christopher S; Campbell; Elizabeth A. Kellogg; Peter F. Stevens;Michael J. Donoghue (2008).**Systématique des plantes : une approche phylogénétique (3e éd.). Sunderland , MA : Sinauer Associates.p. 412-414.ISBN
- A b c d e Stevens, PF (2001-2011).**"Site Web sur la phylogénie des angiospermes". Consulté le 15 février 2011.

Les références bibliographiques

- A b c Mabberley, David J. (2008).**Mabberley's plantes, leur classification et leurs utilisation (3 e éd).Cambridge : Cambridge University Press.p.508.ISBN. 978-0-521-82071-4.
- Adouane S., 2016,** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès, diplôme de magistère , Université Mohamed Khider - Biskra-P195
- Afaq F, Mukhtar H.** Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol.* sept 2006;15(9):678-84.
- AFAQ F., MALIK A., et al.** - Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology.* 2005. N°81. Pages 38-45.
- **Aiyegoro O. A., Okoh A.I. (2010).**Preliminary photochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC.*BMC Complementary and Alternative Medicine.* 10(1), 10-21.
- AlhijnaD.,Bourich E ., (2017):**Grenade de Beni Snous: étude et caractérisation chimique des extraits de pépins, évaluation de l'activité.
- AMOURETTI M.C., COMET G.** - Cahier d'histoire des techniques - Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81.
- Artik, N., Murakami, H., Mori, T., 1998.** Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC.*Fruit Processing.* 12, 492-499.
- Avreinoff V. A. (1957).**Contribution à l'Etude du Grenadier. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée* [en ligne]. Vol. 4, n° 3-4, pp. 124-138. Disponible sur :https://www.persee.fr/issue/jatba_0021-7662_1957_num_4_3?sectionId=jatba_00217662_1957_num_4_3_2380 (consulté le : 21.08.2020).
- B.J.,(1999)** :Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Revue et Augmentée, Tec & Doc, Paris.
- Bärtels A., 1998:**Guide des plantes du bassin méditerranéen, E. Ulmer
- Bédane, C. (2008).**Photodermatologie. Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie.
- BenYahkem M.L, HadjadjS, Others.,(2018):**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des trois espèces: *Punicagranatum*L.(Grenadier); *Zeamays* L.(Maïs) et *Lawsoniainermis* L.(Henné)., Thèse de doctorat.

Les références bibliographiques

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” : The FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70–76
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, 82(4), 390–393
- Bezanger, Beauquesne et al., 1986**
- Boldyrev, A. A. (1993).** Does carnosine possess direct antioxidant activity? *The International journal of biochemistry*, 25(8), 1101–1107
- Boubekour H. (2019).** Activités biologiques d’*Helichrysum stoechas*. Thèse de Doctorat
- BOULLARD B.** - Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Editions Estem. 2001. 636 pages. Pages 437-438.
- Bounatirou S. et al., 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoffm. & Link. *Food Chem.*, 105, 146-155.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25–30
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3eme ed. Lavoisier, Paris. 1120 p
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3eme ed. Lavoisier, Paris
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M., & Lerverve, X. (2006).** *Traité de nutrition artificielle de l’adulte*. Springer Science & Business Medi
- Cazin F.J., (1868)** : *Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes*, P. Asselin.
- Cerdá, B., Cerón, J.J., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2003.** Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J. Agric. Food Chem.* vol. 51, no 11
- Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, et al.** Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 sept 2004;9:2618-31
- Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., 2006.** Structures phénoliques et goût. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier : 398
- Christenhusz, MJM ; Byng, JW (2016).** “ Le nombre d’espèces végétales connus dans le monde et son augmentation annuelle ”. *Phytotaxes* . 261 (3) :201-217-.doi : 10.11646/phytotaxes.261.3.1.

Les références bibliographiques

- Chung, Y.-C., Chang, C.-T., Chao, W.-W., Lin, C.-F., & Chou, S.-T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454–2458
- Cochon, Ko ; DoVore, ML(2005).** *Shirleyagrahamaegen. etsp.nov.* (Lythraceae), fruit de type *Lagerstroemia* de la flore du Miocène moyen Yakima Canyon, centre de États de Washington, Etats-Unis. *Journal américain de botanique*. 92 (2) : 242-251.doi : 10.3732/ajb. 92.2.242. PMID 21652401.
- CourchetL., (1897):**Traité de botanique comprenant l’anatomie et la physiologie végétales et les familles naturelles a l’usage des candidats au certificat d’études physiques, chimiques et naturelles des étudiants en médecine et en pharmacie, Baillière
- Curtay, J.P., Jacob, L., Jung, R.R., & Kaplan, M. (2008).**Jus de grenade fermenté, la grenade, “aliment-plus” un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l’arsenal de la nutrithérapie. *Macro pietteur (EDS)*, Paris, 73p.
- Dallas,S.L L.F.,(2010):**Bonewald, Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1192,437
- Dean, F.M., 1963.**Naturaloccurring Oxygen Ring Compounds. Butterworth's . Lenders.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654–660.
- Elodie W., 2009,** Le grenadier (*Punicagranatum*) plante historique et évolution thérapeutiques récentes, le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Université Henri Poincare Nancy 1 ,P149
- Fain, O. (2004).** Carences en vitamine C. *La Revue de médecine interne*, 25(12), 872–880.
- Fatope, M.O., Al Burtomani, S.K., Takeda, Y., 2002.** Monoacylglycerol from *Punica granatum* seed oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 357–360.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L’actualité chimique*, 108
- Fleuriet, A., Jay-Allemand. C.. Macheix. J.J., 2005.** Composésphénoliques des vegetaux un exemple des metabolites secondaires d’importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- Fleuriet, A., Jay-Allemand. C.. Macheix. J.J., 2005.** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d’importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.

Les références bibliographiques

- Gey, K. F. (1998).** Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. *Biofactors*, 7(1, 2), 113–174
- Ghabrier J. Y., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): P165.
- Ghadirian, P., Ekoe, J.M., Thouez, J.P., 1992.** Food habits and esophageal cancer: an overview. *Cancer Detect. Prev.* 16, 163–168.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000.** Antioxidant capacity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48 (10), 4581-4589
- Gori Z., Tebbale H., 2014,** Impact de différents modes de conservation sur les caractéristiques biochimiques de quelques plantes spontanées médicinales, P72.
- Guignard, J.L., 1996.** Abrège de biochimie vegetale. Ed. Masson. Paris. 160
- Harbone, J.B., Grayer, R.J., 1988.** The flavonoids, *Advances in research since 1980.* Harborne J B, Chapman and Hall, London, 1-20
- Harman D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* juill 1956;11(3):298-300.
- McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem.* 25 nov 1969;244(22):6049-55
- Haslam, E., 1998.** Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge, pp 422
- Hegde, V.L., Mahesh, P.A., Venkatesh, Y.P., 2002.** Anaphylaxis caused by mannitol in pomegranate (*Punica granatum*). *Allergy Clin. Immunol. Int.* 14, 37–39
- Hemingway, R.W., 1992.** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance.* Hemingway R W, Laks P. E. New York
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, et al.** The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med.* 22 nov 2004;164(21):2335-42
- Herrera, E., & Barbas, Cjj. (2001).** Vitamin E : Action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*, 57(1), 43–56.

Les références bibliographiques

- Hong, J.-H., Kim, M.-J., Park, M.-R., Kwag, O.-G., Lee, I.-S., Byun, B. H., Lee, S.-C., Lee, K.-B., & Rhee, S.-J. (2004).** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica chimica acta*, 340(1-2), 107–115.
- Huang, T. H.-W., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., & Li, Y. (2005).** Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model : Role of lowering circulating lipids. *British journal of pharmacology*, 145(6), 767–774
- Jacques, B., & André, R. (2004).** *Biochimie métabolique* Ed ellipses. Paris. pp, 217219220
- KEssous C., 2006.** *Biochimie structurale: protéines, glucides, lipides, acides nucléiques.* Office de publications universitaires. Alger. Pp: 3-23.
- Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C.,**
- Lansky E.P., Ephraim P, Newman R.A., 2007 ,** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, vol 109, no 2, P206
- Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007.** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. ethnopharm.* N°109. Pages 177-206
- Lecerf, J. M., Luc, G., & Fruchart, J. C. (1994).** Vitamine E, antioxydants et athéroscléros
- LEMOINE E. -** Guide des fruits du monde - Les fruits de nos régions, les variétés exotiques. Collection les compagnons du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 1998. 192 pages. Page 151
- Lubrano, V., & Balzan, S. (2015).** Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World journal of experimental medicine*, 5(4), 218.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p
- Madan S., Singh G.N., Kumar Y., Kohli K. (2010).** Phytochemical analysis and free-radical scavenging activity of *Flemingia strobilifera* [Linn] R. Br. *Research J Pharma Biol and ChemSci.* 1(4), 183-190
- Malagas, D., 1992.** Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala. p. 232.

Les références bibliographiques

- Marfak, A. (2003)**. Radiolyse gamma des flavonoïdes : Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides [PhD Thesis]. thèse de doctorat, Limog
- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Marais, J. P., Bravo-Clemente, L., Khoo, C., & Goya, L. (2015)**. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food research international*, 71, 68–82
- Martinez J, Melgarejo P, Hernández F, Salazar D, martinez R., (2006)** :Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties, *Scientia Horticulturae*. 110 ,241–246 .
- Meddleton, E., Kardasami, J.C., 1993**. The flavonoids Advances. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652p.
- Medic-Sanic, M., Jasprica, I., Smolic-Bubalo, A., Mornar, A., 2004**. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatian chemical acta*. 361-366 p
- Merghem R. 2009**. Élément de biochimie végétale, 1ère édition. Edition Bahaeddine, pp 149-158
- Merghem R. 2009**. Élément de biochimie végétale, 1ère édition. Edition Bahaeddine, pp 149-158
- Momtaz K, Fitzpatrick TB**. The benefits and risks of long-term PUVA photochemotherapy. *Dermatol Clin*. avr 1998;16(2):227-34.
- Monique, G.A., Dominique ,B.R., Zohreh, A., & Daniel, J. (2003)**. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. Laboratoire de chimie-physique, UMR 8601 CNRS, UFR Biomédicale des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06 l'actualité chimique - novembre-décembre 2003.
- Montagnier L., Olivier R., Pasquier C.**, Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, Marcel Dekker, New York, 1998.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al**. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*. sept 2003;133(9):2812-9.
- Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux J-L**. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chem*. août 2006;97(4):679-88
- Moreau B., (2003)** maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie

Les références bibliographiques

- Moualkia .,HGourmati .,M ,2015**, Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti- inflammatoire de plantes *Punicagranatum L* et Lawsoniainermis , Mémoire de master, Université Abderrahmane Mira Bejaia, P125
- Mousnier A., 2013** Enquête ethnobotanique autour de la ville de la sou terrainne(crusse) ,P266.
- MOUSSARD C., 2006**. Biochimie structurale et métabolique .3eme édition De Bock &larcier.Bruxelles. Pp: 69-100
- Napoli, C.A., Fahy, D., Wang, H.Y., Taylor, L.P., 1999**. White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiology*.120 (2), 615-622
- Naumann, R.A., 2007** .,1000 Plantes aromatiques et médicinales, P 336.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008)**. Free radicals, antioxidants in disease andhealth.*International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89
- Planchon G., (1875)** :Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale, F. Savy.
- Profile de plantes pour Lythrum calicaria** (la calicaria pourpre).Base de données PLANTES. Département de l'Agriculture des états-Unis. Consulté le 6 juin 2016.
- Pryor, W. A. (2000)**. Vitamin E and heart disease : Basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 141–164
- Ribereau-Gayon, J., 1968**. Les composes phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie. Edition Dunod. Paris. 254 p
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., &Pridham, J. B. (1995)**.The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375–383
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., &Riceevans, C. (1995)**. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322(2), 339–346
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990**. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990**. Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146
- Sanago, 2006** , Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université du bamako.

Les références bibliographiques

-**Satrani, B., Ghanmi, M., Mansouri, N., & Amusant, N. (2015).**Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of moroccan junipers.

-**Sitzia G., 2009:** La Grenade, une bombe de jeunes

-**Sofowara, A., (2010).**Plante médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique (traduit par felicitascepleanu) Karthala Edition

-**Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C.,** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.*, 2002, 33(5), p. 575.

-**Squillaci, G., Di Maggio, G., 1946.** Acute morbidity and mortality from decoctions of the bark of *Punica granatum*. *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1946, 1095–1096

-**Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007).** Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900–2916.

Tamilselvi N., Krishnamoorthy P., Dhamotharan R., Sagadevan E. (2012). Analysis of total phenols, total tannins and screening of phytocomponents in *Indigofera aspalathoides* (Shivanar Vembu) Vahl EX DC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(6), 3259-3262

-**Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G. (2002).** Polyphenols : Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(4), 200–207

-**TOUITOU PR.Y., 2005.** Biochimie: structure des glucide et lipides PCEM 12005-2006. université paris -VI faculté de médecine Pierre et Marie Curie.

-**Vendrell, M., 2003.** Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene. IOS Press: 235-236

-**Wald E. (2009).** **Le grenadier (*Punicagranatum*)** : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy 1 : université HENRI POINCARÉ-Nancy 1, 158 pages

-**Wang, X., & Quinn, P. J. (2006).** The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie*, 88(12), 1883–1888.

-**WEIL J-H., 2005.** Biochimie générale, cours et exercices corrigés. Dunod Paris .pp:271- 281.

-**Wherle P. (2007).** Pharmacie galénique. Edition Maloine

https://www.google.fr/url?esrc=s&q=&rct=j&sa=U&url=http://nature.jardin.free.fr/arbuste/ft_punica_nana.html&ved=2ahUKEwjgeOZmbX4AhX7m_0HHd_zAeYQFnoECAYQAg&usq=AOvVaw1iX4dGOI37WB7ovHdSfLp2

Les références bibliographiques

-A - <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/pomegranate.html>

-B - <http://www.insecula.com/salle/MS03861.html>

Résumé :

Aujourd'hui, les chercheurs ont été intéressés par l'avance technologique dans le domaine thérapeutique. Dans ce cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des plantes

Médicinales, nous sommes étudiées (l'écorce et feuille) de *Punicagranatum L*, récolté de la région d'Oum El Bouaghi.

L'objectif de cette étude est pour estimer leurs contenus en composés phénoliques (les polyphénols et flavonoïdes) et évaluer leurs activités antioxydants ; extraite de la partie aérienne. Les composés phénoliques et activité antioxydants (DPPH) de fractions préparées avec des solvants de polarisation accrue ; Le hexane, chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Le rendement obtenu de la partie aérienne et de *punicagranatum L* est (**écorce=36.7%** et **feuille=20,12%**), les résultats ont montré la richesse de la fraction Hexane (**4770EAG mg/g**) en teneur en polyphénol et aussi en teneur en flavonoïdes (**1115EAG mg/g**) dans l'écorce, comme pour les feuilles, en retrouve la richesse de la fraction N2-butanol (**4668EAG mg/g**) en teneur en polyphénol et en fraction Chloroforme (**1101EAG mg/g**) en teneur de flavonoïdes.

De là, nous concluons que la quantité de polyphénol et flavonoïdes présents dans l'écorce est supérieure à celle des feuilles.

Mots clés : *Punicagranatum L*, Polyphénol, flavonoïdes, Activité antioxydant, Métabolite secondaire.

الملخص

اليومالباحثونمهتمون بالتقدم التكنولوجي في المجال العلاجي، وفي هذا السياقمناجلاكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة منالنباتاتالطبية،قمنا بدراسة (الأوراق والقشور) الرمان Punica granatum L، المحصول من منطقة أم البواقي.

الهدف من هذه الدراسة الإختبارية هو تقدير محتواها في المركبات الفينولية (البوليفينول و الفلافونويد) وتقييم أنشطتها المضادة للأكسدة، المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة(DPPH)من الأجزاء المحضرة بمذيبات الاستقطاب المتزايد،الهكسان، الكلوروفورم اسيتات الايثيل، ن-بيتانول. العائد الذي تم الحصول عليه من الجزء الهوائي Punica granatum L (القشور 36.7% والأوراق = 20.12%) أظهرت النتائج ثراء جزء الهكسان(4770EAG mg/g) في محتوى البوليفينول وأيضا في محتوى الفلافونويد(1115EAG mg/g) في القشور اما بالنسبة للأوراق نجد ثراء جزء ن-بيتانول(4668EAG mg/g) في محتوى البوليفينول وفي جزء الكلوروفورم (1101EAG mg/g) في محتوى الفلافونويد.

من هنا نستنتج ان كمية البوليفينولوالفلافونويد الموجودة في القشور أكبر منها في الأوراق .
الكلمات المفتاحية: Punica granatum L، أنشطة مضادات الأكسدة،البوليفينول، الفلافونويد،المستقلبات الثانوية.

Résumé :

Aujourd'hui, les chercheurs ont été intéressés par l'avance technologique dans le domaine thérapeutique. Dans ce cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des plantes

Médicinales, nous sommes étudiées (l'écorce et feuille) de *Punicagranatum L*, récolté de la région d'Oum El Bouaghi.

L'objectif de cette étude est pour estimer leurs contenus en composés phénoliques (les polyphénols et flavonoïdes) et évaluer leurs activités antioxydants ; extraite de la partie aérienne. Les composés phénoliques et activité antioxydants (DPPH) de fractions préparées avec des solvants de polarisation accrue ; Le hexane, chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Le rendement obtenu de la partie aérienne et de *punicagranatum L* est (écorce=36.7% et feuille=20,12%), les résultats ont montré la richesse de la fraction Hexane (4770EAG mg/g) en teneur en polyphénol et aussi en teneur en flavonoïdes (1115EAG mg/g) dans l'écorce, comme pour les feuilles, en retrouve la richesse de la fraction N2-butanol (4668EAG mg/g) en teneur en polyphénol et en fraction Chloroforme (1101EAG mg/g) en teneur de flavonoïdes.

De là, nous concluons que la quantité de polyphénol et flavonoïdes présents dans l'écorce est supérieure à celle des feuilles.

Mots clés : *Punicagranatum L*, Polyphénol, flavonoïdes, Activité antioxydant, Métabolite secondaire.

المخلص

اليوم الباحثون مهتمون بالتقدم التكنولوجي في المجال العلاجي، وفي هذا السياق منا جلاكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من النباتات الطبية، قمنا بدراسة (الأوراق والقشور) الرمان *punicagranatum L*، المحصول من منطقة أم البواقي.

الهدف من هذه الدراسة الإختبارية هو تقدير محتواها في المركبات الفينولية (البوليفينول و الفلافونويد) وتقييم أنشطتها المضادة للأكسدة، المركبات الفينولية والنشاط المضاد للاكسدة (DPPH) من الأجزاء المحضرة بمذيبات الاستقطاب المتزايد، الهكسان، الكلوروفورم اسيتات الايثيل، ن-بيتانول.

العائد الذي تم الحصول عليه من الجزء الهوائي *Punicagranatum L* (القشور 36.7% والأوراق = 20.12%) أظهرت النتائج ثراء جزء الهكسان (4770EAG mg/g) في محتوى البوليفينول وأيضا في محتوى الفلافونويد (1115EAG mg/g) في القشور اما بالنسبة للأوراق نجد ثراء جزء ن-بيتانول (4668EAG mg/g) في محتوى البوليفينول وفي جزء الكلوروفورم (1101EAG mg/g) في محتوى الفلافونويد.

من هنا نستنتج ان كمية البوليفينول والفلافونويد الموجودة في القشور أكبر منها في الأوراق .
الكلمات المفتاحية: *Punicagranatum L* أنشطة مضادات الأكسدة، البوليفينول، الفلافونويد، المستقلبات الثانوية.