

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- Skikda



## Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option: Biochimie Appliquée

Intitulé

L'activité antioxydante de *Punica granatum* (grenade)

Présenté par :

Bouabdallah Sarra

Boudinar chaima

Bouacha Dounia

Larkam Asma

Membre de jury :

Laib Imène	MCA	Président	Université 20 Août 1955 Skikda
Ouamane Souheila	MCB	Directeur de mémoire	Université 20 Août 1955 Skikda
Bouhadouda Nabila	MCB	Examineur	Université 20 Août 1955 Skikda

Année universitaire 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## *Remerciements :*

*Nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail*

*Nous exprimons notre gratitude et remerciement à notre promotrice Mm Ouamane Souhila pour avoir accepté de nous encadrer, pour orientation et ces conseil qu'elle nous a prodigué tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à présenter nos remerciements à Mm Laïb Imane , pour son aide, ces encouragements et ces conseils.*

*Nous remercions chaleureusement les membres de jury :*

*Mm Bouhadouda Nabila et Mm Laïb Imane. Pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers notre travail en acceptant de l'évaluer.*

*Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*



### *Dédicace :*

*Avant tout je remercie Dieu tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

*A mes chers parents, merci de m'avoir toujours soutenu durant tout le long de ma vie, pendant les bons moments et les plus difficiles, merci de m'avoir toujours encouragé et cru en moi et merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté.*

*A mes chères frères : Hamza, Boubekeur El Saddik, Soufiane, Youcef et aux autres membres de ma famille.*

*Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation et aux quelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.*

*Sarra*





### *Dédicace :*

*Merci ALLAH de m'avoir donné la capacité de réfléchir et d'écrire, la force et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve, et de lever mes mains vers le ciel et de dire << Ya Hayo Ya kayoum >>*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon cher papa << ALI >>, école de mon enfance, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, que j'ai toujours respectée et aimée.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de la tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère maman << ALLOUCHE SOUAD >>.*

*A mes chères sœurs.*

*A mon cher frère : MOHAMMED*

*A mes adorables neveux : ANIS ,Fasnim ,Sadjid ,Amani*

*A mes amies : FAFIMA , DOUNJA*

*A mes camarades de classe : SARRA , ASMA*

*A mes amis et mes collègues promotion Biochimie appliquée 2022*

*A tous ceux qui m'aiment, et que j'aime.*

*Chaima*





### *Dédicace :*

*Merci ALLAH de m'avoir donné la capacité de réfléchir et d'écrire, la force et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve, et de lever mes mains vers le ciel et de dire << Ya Hayo Ya kayoum >>*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon cher papa << SALAH >>, école de mon enfance, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, que j'ai toujours respectée et aimée.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de la tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère maman << AWASSSE ZAHRA >>.*

*A mes chères sœurs*

*A mes chers frères*

*A mon cher fiancé :Bousbaa yasser*

*A mes amies*

*A mes camarades de classe*

*A mes amis et mes collègues promotion Biochimie appliquée 2022*

*A tous ceux qui m'aiment, et que j'aime.*

*Dounia*





## *Dédicace :*

*Avec ALLAH, le tout puissant, ce travail est achevé ; tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect la reconnaissance, c'est tout simplement que :*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de la tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère maman <<Aldja>>.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de la tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère maman <<Essadek>>.*

*A mon cher mari*

*A mes chers frères*

*A mes cher belles sœurs*

*A tous les membres de ma famille, petite et grands*

*A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer*

*A tous ceux qui m'aiment*

*Asma*



## Résumé :

L'objectif de la présente étude est de valoriser les extraits de l'écorce, les graines et le jus de fruit de la plante médicinale *Punica granatum* L qui est très appréciée pour ses nombreuses vertus et largement utilisée pour traiter les maladies cardiovasculaires, gastro-intestinales, l'arthrite et le cancer et ceci par la réalisation d'une étude photochimique et une évaluation de son activité antioxydante.

Les extraits organiques de l'écorce et les graines de grenade ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants de polarités différentes à savoir l'eau, l'éthanol et un mélange l'hydroéthanolique. Les rendements obtenus pour les trois extraits : aqueux, éthanolique et hydroéthanolique des écorces ont été estimés à 6,66%, 9% et 7,68 % respectivement et pour les graines ont été estimés à 2%, 6% et 2,90 respectivement.

Le dosage colorimétrique des polyphénols totaux dans tous les échantillons, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, la quantification a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, la quantification des flavonoïdes totaux a été effectuée en utilisant le réactif de trichlorure d'aluminium.

Le pouvoir antioxydant a été évalué en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH. L'extrait hydroéthanolique de l'écorce a représenté l'activité antioxydante la plus importante par rapport aux autres extraits avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 1,13 mg/ml.

Par conséquent, ces résultats indiquent que l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. constitue une source efficace de composés phénoliques, qui lui confère une activité antioxydante très importante permettant son usage dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire.

**Mots clés :** *Punica granatum* L, Extraits, Polyphénols, Activité antioxydante, DPPH, écorce, graines, le jus.

### **Abstract:**

The objective of this study is to enhance the peel, seeds and the juice extracts of a medicinal plant *Punica granatum* L highly valued for its many virtues and widely used to treat cardiovascular and gastrointestinal diseases, arthritis and cancer, by phytochemical study and evaluation of its antioxidant activity.

The organic extracts of pomegranate (the peel and the seeds) were obtained by maceration using three solvents; water, methanol and hydroethanolic. The yields obtained from the three extracts; aqueous, ethanolic and the hydroethanolic were around hydroethanolic 6,66%, 9% and 7,68 % respectively of the peel and about the seeds were around 2%, 6% 2,90 % respectively.

The colorimetric determination of total polyphenols in all samples, using the reagent Folin-Ciocalteu, the quantification was carried out using a spectrophotometer UV, the quantification of total flavonoids was carried out using the aluminum dichloride reagent.

Antioxidant power was assessed using the method; the trapping of the free radical DPPH. The ethanolic extract of peel represented the most important antioxidant activity compared to ewer extracts with an IC<sub>50</sub> value of 1,13 mg/ml.

Consequently, these results indicate that the bark of *Punica granatum* L. constitutes an effective source of phenolic compounds, which confers it a very important antioxidant activity allowing its use in the pharmaceutical and food industry.

**Key words:** *Punica granatum* L, Extracts, Polyphenols, Antioxidant activity, DPPH, peel, seeds, juice.

## ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تثمين مستخلصات لحاء , بدور و عصير *Punica granatum L* نبات طبي ذو قيمة عالية لفضائلها لعديدة ومستعمل على نطاق واسع لعلاج أمراض القلب و الأوعية الدموية، أمراض الجهاز التنفسي، التهاب المفاصل و السرطان من خلال دراسة الكيمياء النباتية و تقييم نشاطه المضاد للأكسدة.

تم الحصول على المستخلصات العضوية من لحاء الرمان بواسطة النقع باستخدام ثلاث مذيبات: الماء والايثانول و الايثانول المائي العوائد التي تما لحصول عليها من المستخلصات الثلاثة المائي، الإيثانول ال و الإيثانول المائي بلغت نسبة 6,66%, 9% و 7,68% على التوالي بالنسبة للحاء و 2%, 6%, 2,90% بالنسبة للبدور على التوالي.

تم تقييم القوة المضادة للأكسدة باستخدام طريقة تثبيط الجذور الحرة DPPH اظهر مستخلص الايثانول للحاء اهم نشاط مضاد للأكسدة مقارنة ببقية المستخلصات بقيمة IC<sub>50</sub> 1,13 50 مغ/مل.

ونتيجة لذلك تشير هذه النتائج إلى أن لحاء *Punica granatum L* يشكل مصدرا فعالا للمركبات الفينولية

مما يمنحه نشاطا مضادا للأكسدة مهما للغاية يسمح باستخدامه في صناعة الأدوية و الغذاء.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L* , المستخلصات , بوليفينول, نشاط مضاد للأكسدة , DPPH , لحاء, بدور, عصير.

### **Liste des tableaux :**

<b>Tableau 1:</b> Les concentrations inhibitrices IC50 (mg/ml) du radical DPPH des extraits de grenade et de BHT et BHT .....	33
---	----

## Listes des figures :

<b>Figure 1:</b> L'arbre de grenadier.....	3
<b>Figure 2:</b> Les fleurs et fruits du Granadier ( <i>Punica granatum</i> ) .....	5
<b>Figure 3:</b> La présentation schématique des différentes parties du fruit de grenade et leur composition .....	6
<b>Figure 4:</b> Maladies traitées par <i>Punica granatum</i> .....	7
<b>Figure 5:</b> Les différentes classes des composés phénoliques .....	11
<b>Figure 6:</b> La structure de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique .....	11
<b>Figure 7:</b> La structure de base des flavonoïdes .....	12
<b>Figure 8:</b> La structure de base des principaux flavonoïdes .....	12
<b>Figure 9:</b> Les structures chimiques d'un tanin condensé (a) et d'un tanin.....	13
<b>Figure 10:</b> Le radical libre .....	14
<b>Figure 11:</b> Le mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre un radical DPPH* et un antioxydant .....	18
<b>Figure 12:</b> La grenade <i>Punica granatum</i> .....	20
<b>Figure 13:</b> La préparation des écorces de la grenade .....	21
<b>Figure 14:</b> Le protocole de préparation des extraits.....	22
<b>Figure 15:</b> Le protocole de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	24
<b>Figure 16:</b> La réaction du DPPH avec un antioxydant .....	25
<b>Figure 17:</b> Les rendements des extraits de différente partie de fruit <i>Punica granatum</i> .....	27
<b>Figure 18:</b> La courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	28
<b>Figure 19:</b> Les teneurs en polyphénols totaux des extraits des différentes parties de fruit .....	29
<b>Figure 20:</b> La courbe d'étalonnage de la quercitine. ....	31
<b>Figure 21:</b> Les teneurs en flavonoïdes des extraits des différentes parties de fruit <i>Punica granatum</i> .....	31

# Sommaire

## Lise des tableaux

## Liste des figures

## Liste des abréviations

Introduction générale : .....	1
-------------------------------	---

## Partie bibliographique

### Chapitre 1: Généralités sur le grenadier

1.1. Généralités : .....	3
1.2. Classification botanique : .....	4
1.3. Description botanique : .....	4
1.4-Composition chimique : .....	5
1.5. L'activité biologique : .....	7
1.5.1. L'activité antioxydante:.....	7
1.5.2. L'activité Anticancéreuse :.....	8
1.5.3. L'activité antimicrobienne : .....	8
1.5.4. Activité antidiabétique : .....	9
1.5.5. Pression artérielle : .....	9
1.5.6. Réduction du niveau de cholestérol : .....	9

### Chapitre 2 : les polyphénols et l'activité antioxydante

2.1. Les composés phénoliques : .....	10
2.1.1. Généralités : .....	10
2.1.2. Classification des composés phénoliques : .....	10
2.1.2.1 Polyphénols simples : .....	11
2.1.2.1.1. Acides phénoliques : .....	11
2.1.2.1.2 Les flavonoïdes : .....	12
2.1.2.2. Polyphénols complexes (tannins) : .....	13
2.2. L'Activité antioxydant : .....	14
2.2.1. Les radicaux libres : .....	14
2.2.1.1 Définition d'un radical libre : .....	14

2.2.1.2. Les sources des radicaux libres :	14
2.2.1.3. Les types des radicaux libres :	15
2.2.1.4. Le rôle des radicaux libres :	15
2.2.2. Les antioxydants :	16
2.2.2.1. Définition :	16
2.2.2.2. Les différents types d'antioxydants :	16
2.2.2.2.1. Les antioxydants endogènes :	16
2.2.2.2.2. Les antioxydants exogènes :	17
2.2.2.3. Mécanismes d'actions des antioxydants :	18
2.2.2.4. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :	18

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre 1: Matériels et Méthodes**

1. Matériel :	20
1.1. Matériel du laboratoire :	20
1.2. Matériel végétal :	20
1.2.1. Préparation des échantillons :	20
1.2. Méthodes :	21
1.2.1. Extraction du matériel végétale :	21
1.2.2. Rendement des extraits secs :	22
1.2.3. Rendement en jus :	23
1.2.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux :	23
1.2.4.1. Préparation de l'extrait pour les dosages :	23
1.2.4.2. Dosage des polyphénols totaux :	23
1.2.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux :	24
1.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :	25
1.2.5.1. Test DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl):	25

### **Chapitre 2 : Résultats et discussion**

2.1. Les rendements des extraits secs :	27
2.2. Rendement de jus :	28

2.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux :.....	28
2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :.....	28
2.3.2 Dosage des flavonoïdes :.....	30
2.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante :.....	32
2.3.3.1 Test de piégeage du radical libre DPPH : .....	32
Conclusion générale : .....	35
références bibliographique .....	36

## Liste des abréviations :

**ABTS**: 2,2'-Azinobis-3-éthyl-Benzo-Thiazoline-6-Sulfonate

**ARN** : Acide ribonucléique

**APG II** : classification phylogénétique d'angiosperme II

**CLHP** : chromatographie à haute performance en phase liquide

**DPPH** : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

**EAG** : équivalent d'acide gallique

**EQ** : équivalent de quercitine

**ERO** : espèce réactive de l'oxygène

**ES** : extrait sec

**Fe<sup>2+</sup>** : fer ferreux

**Fe<sup>3+</sup>** : fer ferrique

**FRAP** : capacité réductrice ferrique d'antioxydants

**IC50**: concentration inhibitrice 50

**NADP** : nicotinamide adénine di nucléotide phosphate

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**NH<sub>4</sub>OH**: ammoniacque

**NO**: monoxyde d'azote

**UV** : ultraviolet

# **Introduction**

### Introduction :

Ces dernières années, les scientifiques ne cessent d'affirmer qu'une consommation régulière de fruits et de légumes est un bon moyen de prévention de plusieurs maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson,..), des maladies respiratoires (asthme, mucoviscidose,...) résultant d'un phénomène appelé « stress oxydant » .

Ce phénomène se réfère à une perturbation de signalisation dégénérative provoquée par l'oxydation des composants cellulaires vitaux et un déficit en antioxydants ou une surproduction de radicaux libres. Il entraîne des altérations de multiples molécules biologiques dont les acides gras, les protéines, l'ADN et les glucides (Princemail *et al.*, 2002).

L'aptitude des différents fruits et légumes à neutraliser ces radicaux libres et à restaurer l'équilibre oxydatif *in vivo* est imputé à leurs richesses en polyphénols, antioxydants naturels aux forts potentiels antioxydants (Bouayed *et al.*, 2008).

C'est dans ce contexte actuel que nous nous sommes tournés vers l'étude de l'un des plus anciens fruits comestibles : *Punicca granatum* (grenadine) qui est cultivé dans plusieurs régions d'Algérie. Toutes les parties du fruit (racines, écorce, pépins) sont utilisées en combinaison dans la médecine traditionnelle grâce de leur effet : antioxydant, antimicrobien, anti-cancéreux et antidiabétique pour traiter des maladies comme, les infections, les blessures et les inflammations (Ahmed *et al.*, 2005)

La grenade a une grande valeur nutritionnelle. Riche en minéraux, vitamines et en composés bioactifs, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. La plupart des parties du fruit sont connues pour leur important potentiel antioxydant, il y a une liste impressionnante de cibles potentielles de maladies comme les maladies coronariennes, des cancers (peau, sein, prostate et du colon), l'inflammation, l'hyperlipidémie, le diabète, les troubles cardiaques, les troubles hormonaux, l'hypoxie, l'ischémie, le vieillissement, les troubles neurologiques et le SIDA, où les effets thérapeutiques de la grenade ont été démontrés par des études *in vitro* ou *in vivo* (Seeram *et al.*, 2006 ; Lansky & Newman, 2007).

L'analyse chimique (l'isolement, l'identification, et l'élucidation structurale) de ses composés est d'une grande importance pour l'évaluation de leurs effets potentiels sur la santé humaine (Seeram *et al.*, 2006) ; (Naveena *et al.*, 2008).

La présente étude a pour objectif principal l'évaluation de l'activité antioxydante de la grenade à travers l'analyse de trois échantillons (écorce, grain et jus).

Notre travail est scindé en deux parties : la première partie est une synthèse bibliographique donnant des généralités sur la grenade, sa composition phytochimique et sa description détaillées, ainsi qu'un aperçu sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante. La deuxième partie regroupe les différents aspects pratiques de notre étude, les résultats obtenus et leurs discussions.

**Première**

**Partie**

**Etude Bibliographique**

# **Chapitre 1**

**Généralités sur le grenadier**

### 1.1. Généralités :

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum*). Ce petit arbre buissonnant (**Figure1**) est originaire du bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « *granatum* » qui signifie «fruit à grain» (QA international collectif, 1996)

Il est Cultivé dans les jardins de Babylone depuis 4000 ans, le grenadier et son fruit tiennent une place importante dans les civilisations anciennes, par exemple, dans l'Égypte ancienne, le grenadier accompagnait les morts (Abbeyes *et al.*, 1963).

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

La popularité de la grenade a augmenté énormément surtout durant la dernière décennie en raison de ces nombreux bienfaits, parmi lesquels on peut citer son action antimicrobien et antivirale, c'est un antioxydant puissant et un anticancéreux (Negi *et al.*, 2003).

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

L'étude et l'évaluation des composés de la grenade ont été récemment un sujet intéressant pour les scientifiques, qui ont démontré leur efficacité dans la prévention et la lutte contre les maladies chroniques les plus fréquentes (Alhijna & Bourich, 2017).



**Figure 1:** L'arbre de grenadier

### 1.2. Classification botanique :

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

Cette classification est la suivante :

<b>Embranchement</b>	: Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	: Angiospermes
<b>Classe</b>	: Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	: Myrtales
<b>Famille</b>	: Punicaceae
<b>Genre</b>	: <i>Punica</i>
<b>Espèce</b>	: <i>Punica granatum</i>

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

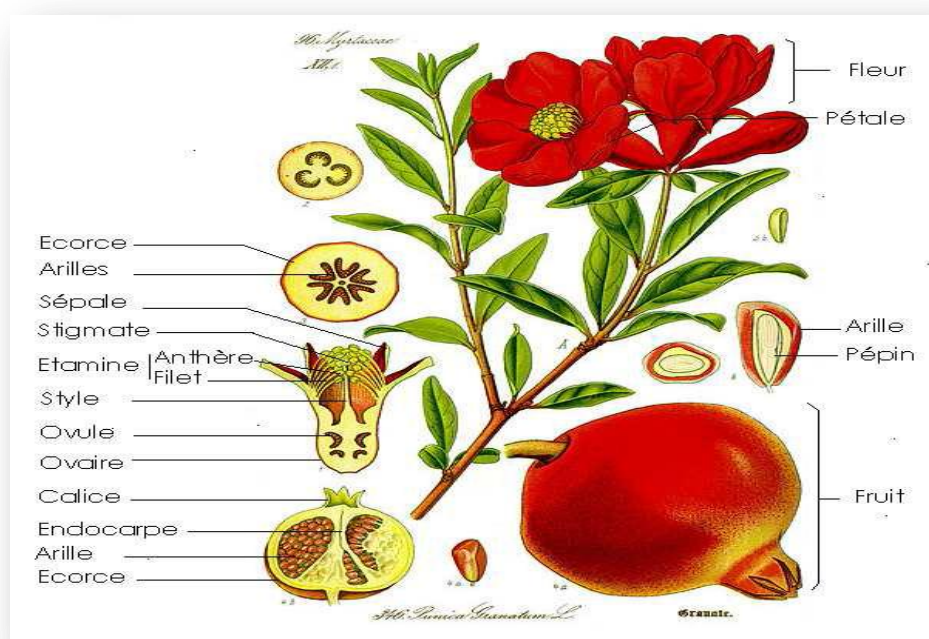
<b>Embranchement</b>	: Angiospermes
<b>Sous-embranchement</b>	: Dicotylédones vraies
<b>Classe</b>	: Rosidées
<b>Ordre</b>	: Myrtales
<b>Famille</b>	: Lythraceae
<b>Genre</b>	: <i>Punica</i>
<b>Espèce</b>	: <i>Punica granatum</i>

On retient dans cette nouvelle classification que la famille des Punicacées n'existe plus et le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées, famille comportant 30 genres et 600 espèces (Wald, 2009) .

### 1.3. Description botanique :

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge

transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre (Figure 2) (Benoit Bock, 2013)



**Figure 2:** Les fleurs et fruits du Granadier (*Punica granatum*)

(Flora von Deutschland & Schweiz, 1885)

### 1.4-Composition chimique :

En général, le fruit de la grenade se compose de 52% de parties comestibles (graines), comprenant 78% de jus et 22% de pépins, les 48% restants sont constitués de 38% d'écorce externe et 10% de cloisonnement interne (en poids).

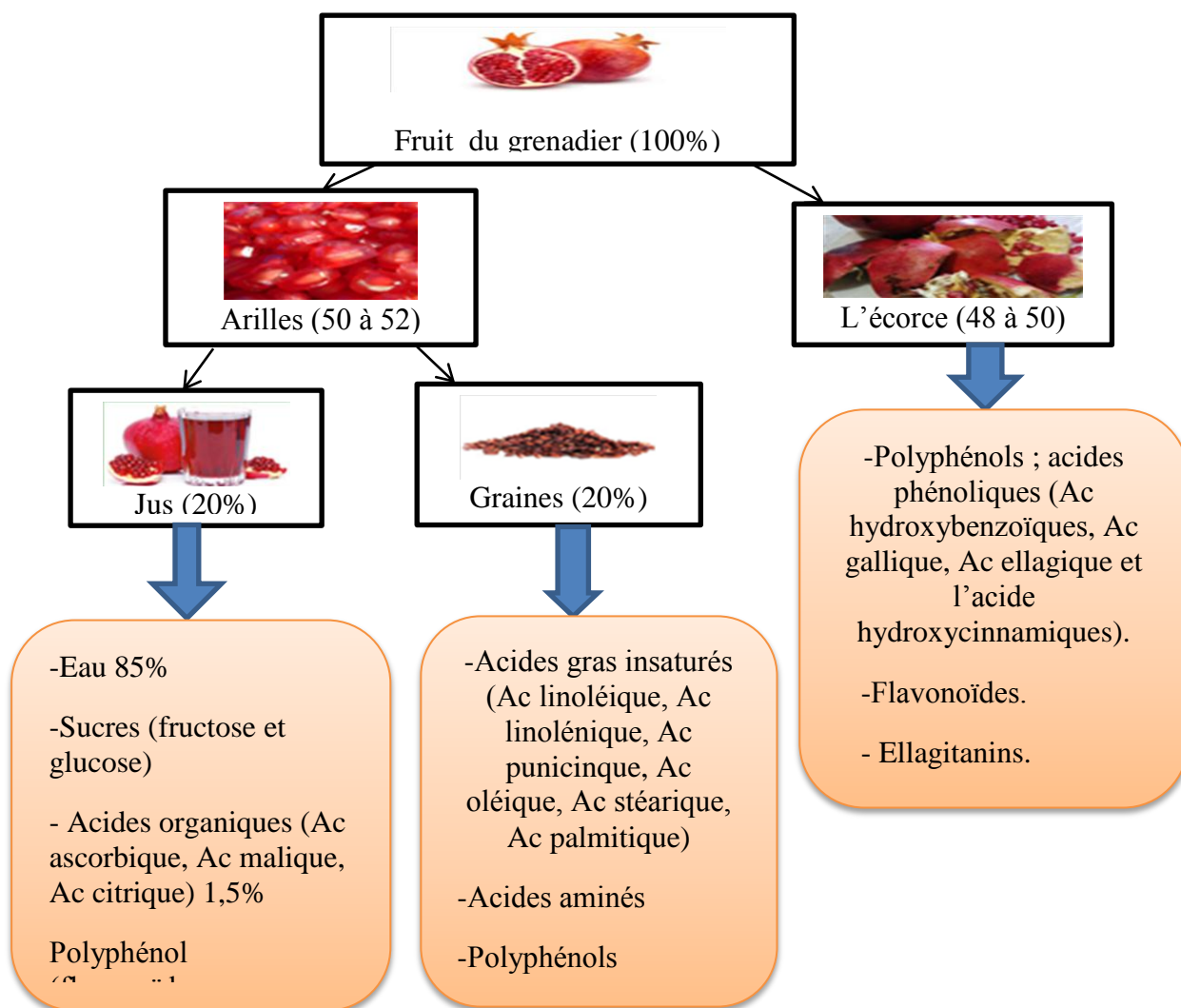
Les arilles (jus) contiennent 85% eau, 10% sucres totaux, principalement fructose et glucose et 1,5% pectine, acides organiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique, et l'acide malique et les composés phénoliques et les anthocyanines, du potassium, du phosphore et de minéraux, ainsi que diverses vitamines dont une forte teneur en vitamine C : 20 mg pour 100 g (ViudaMartos *et al.*, 2010)

L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, acides gras présentant au moins une double liaison, essentiellement représentée par l'acide punique, acide cis-9,trans-11,cis-15,octadécatriénoïque, mais également par les acides oléiques et linoléiques . Cette huile se compose (Huang *et al.*, 2005) aussi d'acides gras saturés, qui ne présentent aucune double liaison, comme les acides palmitiques et stéariques (Lansky *et al.*, 2007).

## Chapitre 1 : Généralités sur le grenadier

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (Lansky *et al.*, 2007). Ces tanins représentent jusqu'à 28% de l'épiderme du fruit (Fournir, 1948).

La Figure 3 regroupe quelques constituants chimiques de différentes parties de la grenade :

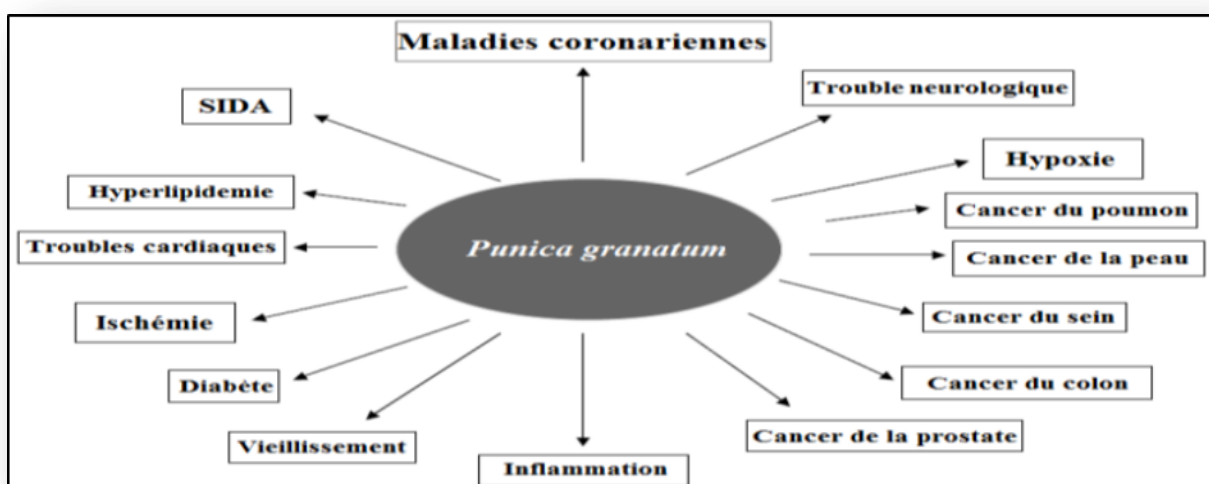


**Figure 3:** La présentation schématique des différentes parties du fruit de grenade et leur composition

### 1.5. L'activité biologique :

Les grenades ont des antécédents médicaux importants et elles détiennent des propriétés médicinales remarquables (Longtin, 2003) telles que l'anti-inflammation, l'anti-diabète, anti diarrhéiques, le traitement de la plaque dentaire et des aphtes et la lutte contre les infections intestinales et les parasites paludéens (Ismail *et al.* , 2012). Des études récentes ont également révélées l'efficacité du fruit de la grenade contre le cancer, l'athérosclérose, les maladies cardiaques infectieuses et coronariennes (**Figure 4**) (Fischer *et al.*, 2011)

En plus, ils possèdent des effets antioxydants très élevés, ainsi que plusieurs propriétés thérapeutiques, et ceci grâce à sa composition chimique riche en polyphénols et notamment en tanins (Alhijna & Bourich, 2017)



**Figure 4:** Maladies traitées par *Punica granatum* (Heber *et al.*, 2006)

#### 1.5.1. L'activité antioxydante:

Des analyses ont été réalisées afin de déterminer la teneur en principes actifs antioxydants au sein des différents organes du grenadier. Des extraits éthanoïques de ces différents organes ont été examinés afin d'extraire les polyphénols. La concentration totale en polyphénols serait la plus importante dans l'écorce du grenadier, un peu plus faible dans la tige et dans le jus de fruits entiers, et la plus faible dans les feuilles (Heber *et al.*, 2006).

L'activité antioxydant des jus de grenade a été évaluée par quatre méthodes différentes (ABTS, DPPH, DMPD et FRAP) et comparées à celle du vin rouge et à une infusion de thé vert. Les jus de grenade commerciaux ont montré une activité antioxydant trois fois supérieure à celle du vin rouge et du thé vert (Jardini & Mancini Filhi, 2007).

La protection antioxydant chez l'homme s'améliore de 9% après une cure d'une semaine de consommation journalière de 250 ml de jus de grenade (Aviram *et al.*, 2000), Une autre étude a montré une augmentation du statut antioxydant total (SAT) dans le sang de 130% après une cure d'un an d'une consommation journalière d'un verre de jus de grenade (Aviram *et al.*, 2004). Evidemment, d'autres organes peuvent aussi profiter de l'effet protecteur antioxydant des polyphénols de grenade : par exemple, une importante action protectrice a été constatée sur la muqueuse de l'estomac contre les ravages de l'alcool et de l'acide acétylsalicylique (Ajaikumar *et al.*, 2005), Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (seeram *et al.*, 2004).

### 1.5.2. L'activité Anticancéreuse :

Des études *in vitro* utilisant trois lignées cellulaires de cancer de la prostate (DU-145, LNCaP et PC-3) ont démontré le pouvoir inhibiteur des extraits du jus et d'écorces de grenade, ainsi que de l'huile de graines, sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate. Ces extraits ont provoqué une perturbation du cycle cellulaire, ont induit l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires de cancer de la prostate, ont supprimé le potentiel invasif des cellules PC-3 et ont diminué la prolifération du DU-145. D'autres études ont également démontré que des combinaisons d'extraits de grenade de différentes parties du fruit étaient plus efficaces que n'importe quel autre extrait (Jurenka, 2008 ; Mohammad & Kashani, 2012).

### 1.5.3. L'activité antimicrobienne :

Prashanth *et al.* (2001) ont étudié, *in vitro*, l'action de différents extraits d'écorces de grenades obtenus à partir de différents solvants pour isoler divers composés actifs et ceci sur six souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*. Les résultats ont démontré l'efficacité antibactérienne de tous les extraits sur les souches testées. Cependant, l'extrait méthanolique a eu le plus fort pouvoir inhibiteur par rapport aux autres extraits essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis* (Hmid, 2013).

Les polyphénols de grenade ont également des effets antiviraux, la punicalagine a un effet antigrippal, elle inhibe la réplication de la grippe humaine A/Hong Kong (H3N2) en bloquant la réplication de l'ARN (Kumar *et al.*, 2018).

D'autres recherches, ont mis en évidence l'activité antifongique de l'extrait d'écorces du fruit de *P. granatum* contre *C. albicans*. L'activité antifongique a été associée principalement à la présence de punicalagine, considérée comme le principal composant de cette plante. De plus, cet

extrait a fortement altéré la structure cellulaire de la levure, gênant la croissance et le développement de cette dernière et empêchant ainsi l'invasion tissulaire (Almeida *et al.* , 2018).

### **I.5.4. Activité antidiabétique :**

Les travaux réalisés par Banihani *et al.* (2014) encouragent les patients atteints de diabète type 2 à consommer le jus de grenade qui favorise le contrôle des taux de glucose, car il améliore la résistance à l'insuline, la fonction des cellules  $\beta$  et permet la diminution de la glycémie à jeun. De plus, les extraits éthanoliques des fleurs du grenadier ont démontré une bonne capacité à faire baisser la glycémie (Wald, 2009).

### **1.5.5. Pression artérielle :**

Des études ont démontré le pouvoir du jus de la grenade à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine sérique (ECA) et à réduire la pression artérielle systolique chez les patients hypertendus. Un protocole a été suivi sur dix sujets hypertendus auxquels on a administré 50 ml/jour de jus de grenade contenant 1.5 m mol de polyphénols totaux pendant deux semaines. Une diminution moyenne de 36% de l'activité de ECA sérique et une diminution faible mais significative de 5% de la pression artérielle systolique ont été enregistrés chez 7 sujets (70%) (Mohammad & Kashani, 2012).

### **1.5.6. Réduction du niveau de cholestérol :**

La richesse de la grenade en antioxydants comme les anthocyanes et les tanins aident à bloquer l'accumulation de cholestérol dans les artères, ce qui permet de protéger contre les attaques cardiaques. Le jus de ce fruit permet la protection contre les attaques cérébrales et ceci en diminuant la concentration de lipoprotéines de basse densité du corps. L'extrait de feuilles de grenade a été testé pour sa capacité de réduction du cholestérol sérique chez des souris nourries avec un régime riche en graisse. L'administration de cet extrait a permis de réduire le taux de cholestérol total et de triglycérides du corps. Le poids des souris a été réduit et l'absorption intestinale des graisses ainsi que les niveaux d'énergie et de HDL corporels ont diminué (Qamar *et al.* , 2018).

# **Chapitre 2**

**Les polyphénols et l'activité antioxydante**

### 2.1. Les composés phénoliques :

#### 2.1.1. Généralités :

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Ils représentent les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation et les principales sources sont les fruits, légumes, céréales, olives, légumineuses sèches, chocolat et les boissons (café, thé, vin) (D'Archivio *et al.* , 2007 ; Benhammou, 2011).

Selon leurs caractéristiques structurales, les polyphénols se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). Selon les chercheurs, l'effet protecteur des fruits, légumes et plantes médicinales vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de polyphénols, flavonoïdes et acides phénoliques, dans ces aliments (Edeas, 2006) .

Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, en effet une accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones avoisinantes a été observée dans le cas des blessures et de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre. De plus, les phénols auraient également un rôle dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la floraison, la tubérisation et la dormance des bourgeons. D'autres propriétés leurs sont attribuées tels que leurs effets protecteurs contre les rayonnements UV, les insectes, leur rôle dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur et enfin leur pouvoir antifongique et antibactérien (Benhammou, 2011 ; Shehu *et al.* , 2016).

#### 2.1.2. Classification des composés phénoliques :

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (D'Archivio *et al.* , 2007). On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Long *et al.* , 2010) (**Figure 5**).

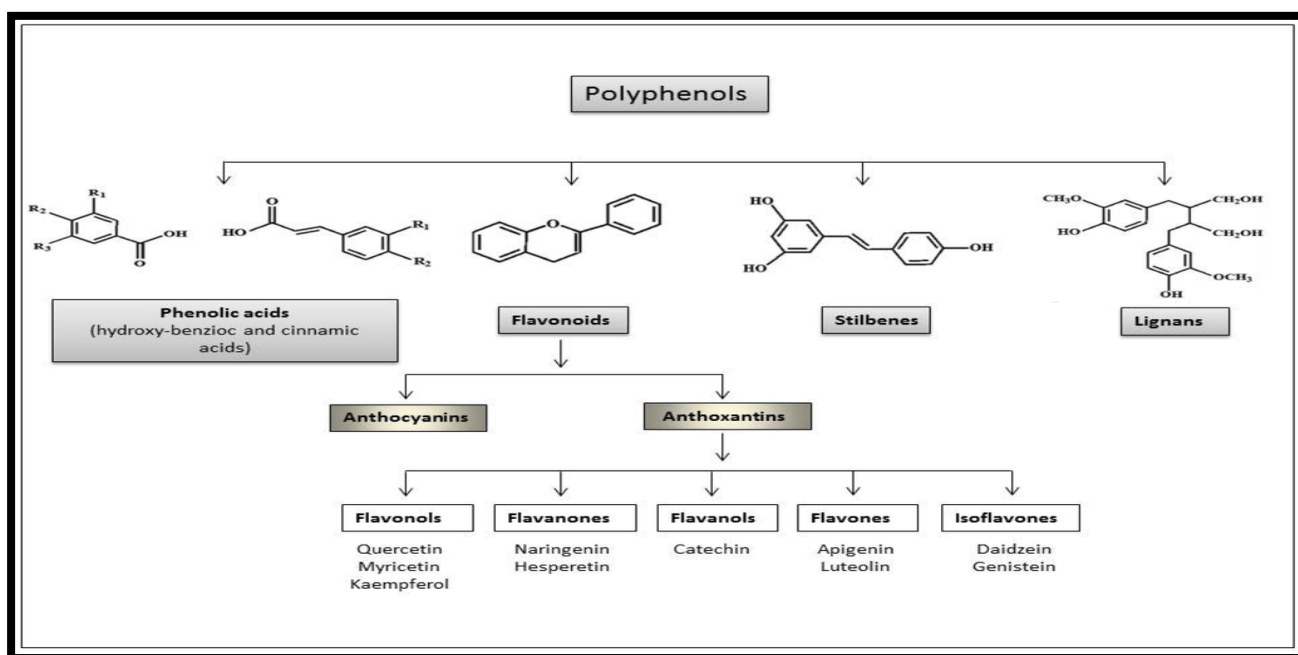


Figure 5: Les différentes classes des composés phénoliques (Salunkhe *et al.*, 1990)

### 2.1.2.1 Polyphénols simples :

#### 2.1.2.1.1. Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces acides phénoliques sont solubles dans les solvants polaires (Wichtl & Anton, 2009). Ils se divisent en deux classes : ceux qui dérivent de l'acide benzoïque avec une structure (C6-C3 où C6- C1) et ceux qui dérivent de l'acide cinnamique (C6-C3) (Figure 6) (Hollman, 2001).

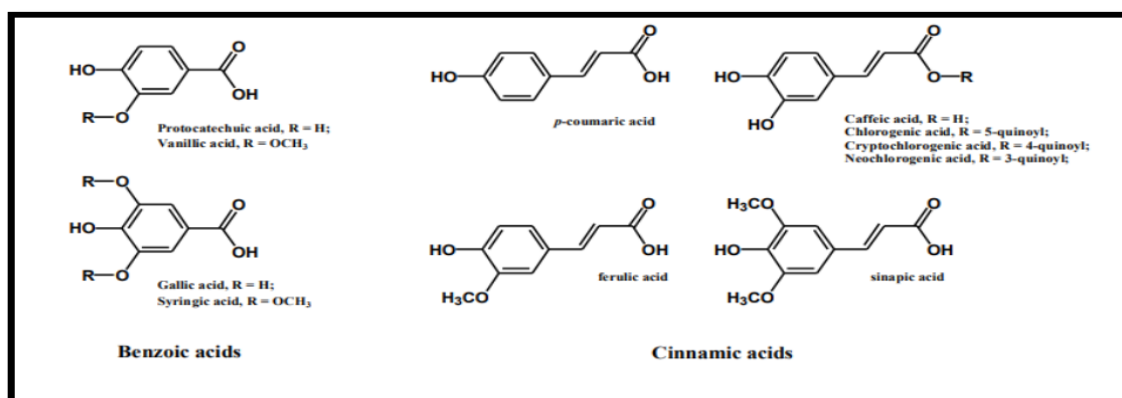
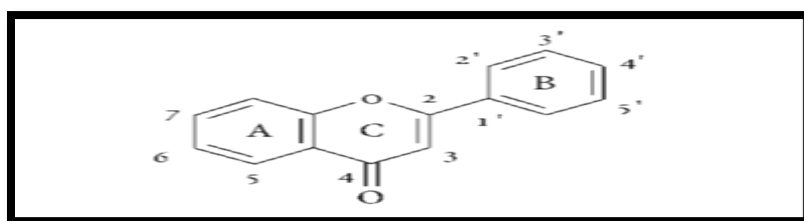


Figure 6: La structure de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Tsao, 2010)

### 2.1.2.1.2 Les flavonoïdes :

Le nom flavonoïde provient du terme flavus c'est-à-dire jaune (Malesev & Kuntic, 2007). Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus abondants. Ils forment un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universelles chez les végétaux, et qui sont considérés comme des pigments responsables de couleur jaune (Ghedira, 2005) .

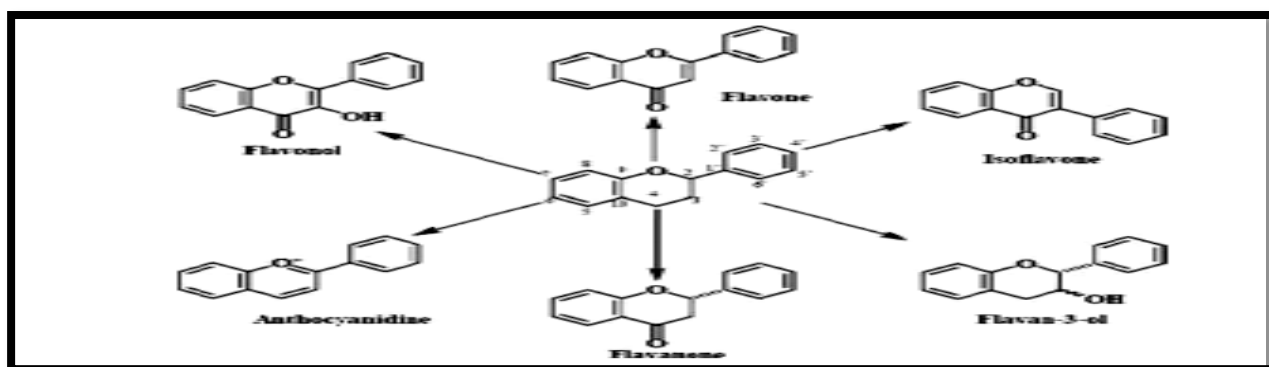
Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyrane. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre c (**Figure 7**) (Dacosta, 2003).



**Figure 7:** La structure de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005)

Les classes des flavonoïdes diffèrent par le niveau d'oxydation et le modèle de substitution du cycle C, tandis que les différents composés au sein de chaque classe diffèrent par les modèles de substitution des cycles A et B (Pietta, 2000). Ces substitutions peuvent inclure : la glycosylation, la méthylation, l'hydroxylation et la sulfatation (Bendjabeur, 2012).

Existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (**Figure8**) (Afanas'eva *et al.*, 2001).



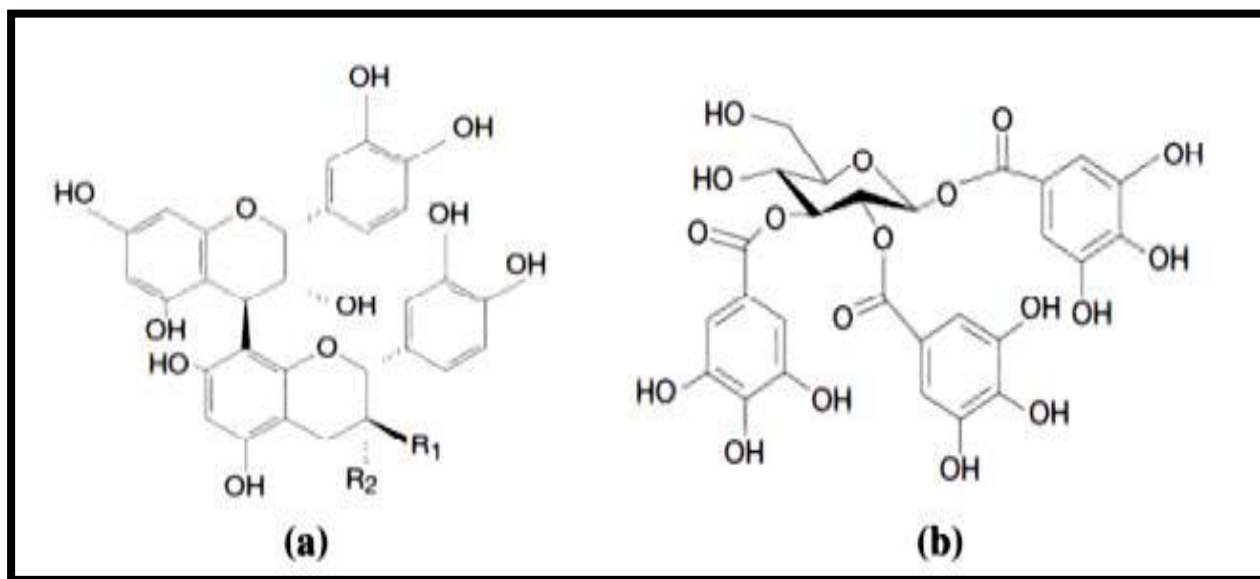
**Figure 8:** La structure de base des principaux flavonoïdes (Bendjabeur, 2012).

### 2.1.2.2. Polyphénols complexes (tannins) :

Les tanins, les composés de poids moléculaire relativement élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques (Porter, 1989). Ils sont solubles dans l'eau, et ont la capacité de se lier aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former des complexes stables (Moufida, 2006).

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi (**Figure 9**) :

- ✓ Les tanins hydrolysables : qui sont constitués d'une molécule glucidique sur laquelle est estérifiée l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide ellagique, acide m-digallique) (Sereme *et al.*, 2008).
- ✓ Les tanins condensés ou proanthocyanidols: sont des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols (Brington, 2009).



**Figure 9:** Les structures chimiques d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b) (Favier, 2003).

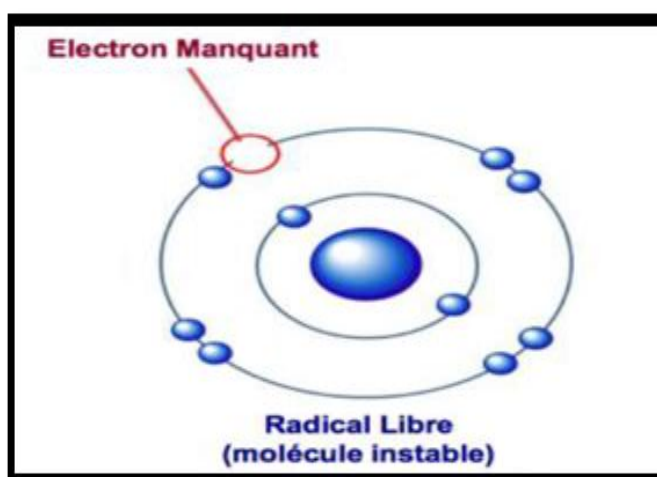
### 2.2. L'Activité antioxydant :

#### 2.2.1. Les radicaux libres :

##### 2.2.1.1 Définition d'un radical libre :

Les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire (**Figure 10**). Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réapparier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules (Bendif, 2017).

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (Rahman, 2002).



**Figure 10:** Le radical libre

##### 2.2.1.2. Les sources des radicaux libres :

Il existe deux sources de radicaux libres. Les sources exogènes qui sont d'origine physique et chimique, par exemple les radiations X ou gamma, les réactions photochimiques et UV. Ainsi que les sources endogènes qui sont produits naturellement par des systèmes enzymatiques, tel que le NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (Belkheiri, 2019).

### 2.2.1.3. Les types des radicaux libres :

Parmi toutes les espèces susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Ils dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le radical hydroxyle  $OH\cdot$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO\cdot$  (Favier, 2003)

**-Le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  :** l'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire (M. Gardès-Albert & Jore, 2005).

**-Le radical hydroxyle  $OH\cdot$  :** Se forme principalement à partir de l' $O_2^{\cdot-}$  et de  $H_2O_2$  au cours de la réaction de Haber-Weiss en présence des ions ferriques (Von Sonntag, 2008).

**-Le monoxyde d'azote :** le  $NO\cdot$  est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par de nombreux types cellulaires. La synthèse se produit à travers des synthèses d'oxyde nitrique (NOS) de trois types principaux: NOS neuronal ( $NOS_1$ ), la ( $NOS_2$ ) produite dans des conditions inflammatoires et la ( $NOS_3$ ) endothéliale (Powers & Jackson, 2008).

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde (ONOOH), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003).

### 2.2.1.4. Le rôle des radicaux libres :

Leur rôle physiologique est impliqué dans la régulation des cascades de signalisation intracellulaire dans divers types de cellules. En bref, les ERO et les ERN à des niveaux faibles ou modérés sont vitales pour la santé humaine (Pham-Huy *et al.*, 2008), et jouent un rôle dans la transduction du signal intracellulaire (Serteyn *et al.*, 2002).

Les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (Harman, 2002). D'autre part, elles sont impliquées, en étiologie, dans divers maladies humaines (Halliwell & Gutteridge, 2015).

### 2.2.2. Les antioxydants :

#### 2.2.2.1. Définition :

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres (Bartosz, 2003).

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 ERO, 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).

#### 2.2.2.2. Les différents types d'antioxydants :

##### 2.2.2.2.1. Les antioxydants endogènes :

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika, Minibayeva, Beckett, & Luthje, 2004).

-Les superoxydes dismutases (SOD) : sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène.

-Les catalases (CAT) : Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène.

-Les peroxydases (POX): Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons.

-Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases : sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

-Glutathion peroxydase (GPX) : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  (Arora, Sairam, & Srivastasa, 2002).

### 2.2.2.2. Les antioxydants exogènes :

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).

#### 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  $\text{OH}\cdot$  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).

#### Les vitamines :

**Vitamine C ou l'acide ascorbique** : est l'antioxydant hydrosoluble majeur, elle réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Pourrut, 2008).

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)

**Vitamine E** : Le principal antioxydant nutritionnel est la vitamine E (essentiellement l' $\alpha$ -tocophérol), liposoluble, puissant antioxydant mais qui peut avoir des effets délétères à forte dose. Elle agit principalement par le transfert direct d'atomes d'hydrogène et permet d'inhiber la lipoperoxydation dans les cellules (Njus & Kelley, 1991). L'action bénéfique de la vitamine E est évoquée dans le cas du cancer de la prostate (Gey, 1998). Il neutralise les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\circ$ ) (Lecerf *et al.*, 1994), alkyles ( $\text{RO}^\circ$ ) et alcoyles (Herrera & Barbas, 2001).

### 2.2.2.3. Mécanismes d'actions des antioxydants :

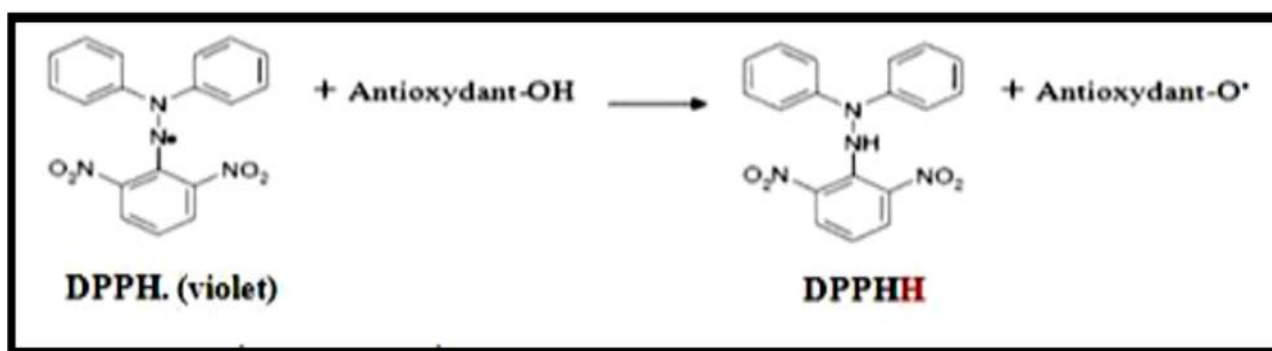
Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Diallo, 2005) .

### 2.2.2.4. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

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 (Hong *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.4.1. La méthode de réduction des radicaux libres DPPH :

Le diphenyl-1-picrylhydrazyl est un radical libre de couleur bleue qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Le transfert de l'atome H sur le DPPH• permet de mesurer l'efficacité d'un antioxydant en mesurant la diminution de coloration bleue par spectrophotométrie à 515 – 518 nm (Figure 11) Popovici *et al.*, 2009)



**Figure 11:**Le mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre un radical DPPH\* et un antioxydant (Popovici *et al.*, 2009)

#### 2.2.2.4.2. La méthode de réduction des ions ferriques FRAP :

Cette méthode est simple, rapide, reproductible et universelle, basée sur la réduction d'ion ferrique  $Fe^{3+}$  en ion ferreux  $Fe^{2+}$  en présence d'antioxydants (Bougandoura & Bendimerad, 2012) . L'absorbance est mesurée à 700 nm.

#### 2.2.2.4.3. La méthode de réduction des radicaux cations ABTS :

La génération du radical  $ABTS^+$  se fait grâce au contact direct entre ABTS et le persulfate de potassium qui conduit à la formation d'un chromophore bleu vert qui se décolore en présence d'antioxydant (Erel, 2004) .

### 2.2.2.4.4. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène :

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui entraîne une décoloration du  $\beta$ -carotène. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du  $\beta$  carotène (Kubola & Siriamornpun, 2008).

**Deuxième**

**Partie**

**Etude expérimentale**

# **Chapitre 1**

**Matériel et méthodes**

### Objectifs :

Notre travail vise à étudier les différentes parties du fruit grenadier « *Punica granatum* » (étude quantitative et activité antioxydante pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- Extraction des différentes parties du fruit grenadier : les écorces et les graines (pour le jus ont utilisé fraîche).
- Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.
- Étude de l'activité antioxydante par le test DPPH.

### 1. Matériel :

#### 1.1. Matériel du laboratoire :

##### a) Appareillage :

UV spectrophotomètre, Etuve, Balance analytique

Verrerie : béchers, pipettes, ballons, éprouvettes graduées, tubes à essais, pipete et micro pipete.

##### b) Les produits chimiques :

Acide gallique 99% ( $C_7H_6O_5$ ), Quercétine ( $C_{15}H_{10}O_7$ ), DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), Trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) Acétate de sodium ( $CH_3COONa$ ), Réactif de Folin Ciocalteu ( $CH_3-CH_2-OH$ ), l'eau distillée.

#### 1.2. Matériel végétal :

##### 1.2.1. Préparation des échantillons :

Les grenades (*Punica granatum*) ont été achetées du marché local de El Harouche de la wilaya de Skikda à la fin du mois de Janvier 2022. Seuls les fruits murs et intacts ont été sélectionnés pour cette étude (**figure 12**). Nous avons travaillé sur trois échantillons qui sont : le jus du grenadier, leurs écorces et les graines.



**Figure 12:** La grenade *Punica granatum* (originale)

Une fois les fruits lavés et pelés les graines sont séparés manuellement de l'écorce. Ensuite le jus est extrait à partir des graines à l'aide d'un tissu en mousseline pour être pressées et extraire la totalité du jus, d'éliminer la pulpe et enfin stocké à 4°C jusqu'à son utilisation.

Les écorces récupérées après extraction du jus isolées, séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant quelques jours, pulvérisées à l'aide d'un broyeur Moulinex puis passé à traverses un tamis jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre obtenu est conservée et stockée à l'abri de lumière et l'humidité jusqu'à l'extraction.



**Figure 13:** La préparation des écorces de la grenade (originale)

### 1.2. Méthodes :

#### 1.2.1. Extraction du matériel végétale :

Une quantité de 30g de chaque matière à extraire (la poudre d'écorce et les graines) a été macérée dans 150ml de chaque solvants à polarité croissante ont été ainsi testés : l'eau distillée, l'éthanol et l'éthanol aqueux 50% (v/v). Les mélanges ont ensuite été agités pendant 24h à température ambiante. Après cela, les solutions ont été filtrées par un papier filtre de chaque extrait ont été évaporées à sec dans une étuve à une température de 45°C. Les extraits bruts résultants ont été stockés à 4°C à l'abri de la lumière.

Les extraits obtenus sont préservés pour l'étape suivante qui est l'étape d'analyse, la figure 14 montre le protocole d'extraction.

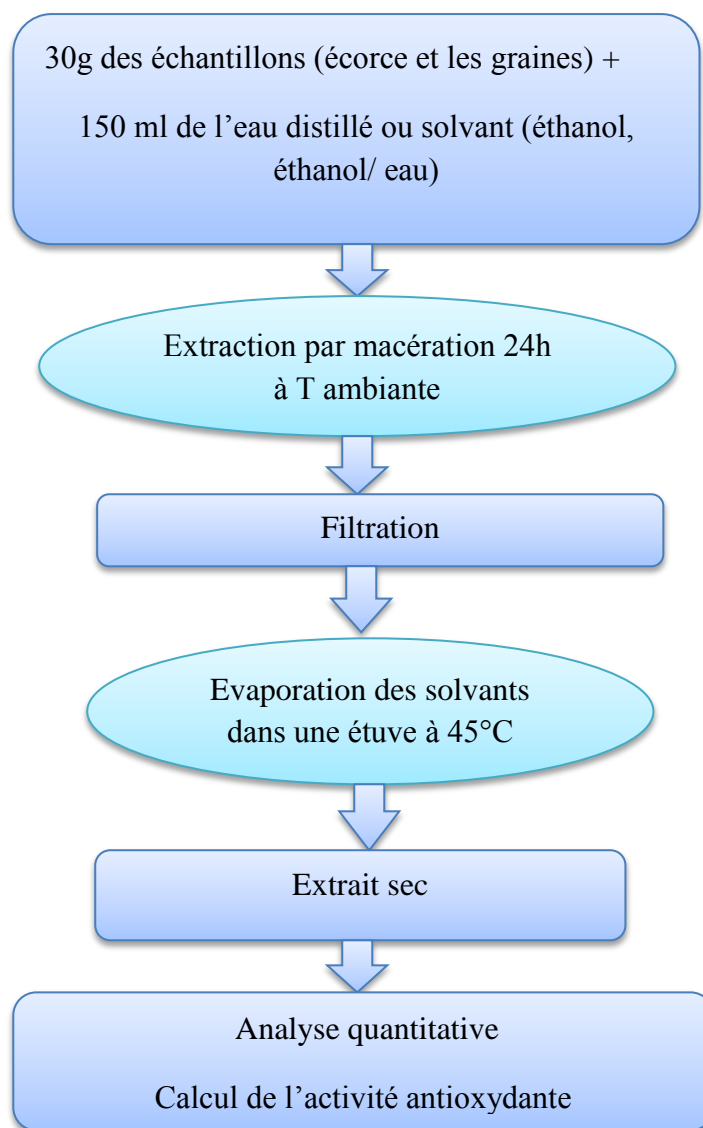


Figure 14: Le protocole de préparation des extraits

### 1.2.2. Rendement des extraits secs :

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre d'écorce et les graines) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante :

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

Avec : PES = poids de l'extrait sec en gramme.

PE= poids de l'échantillon en gramme (= 30g).

### 1.2.3 Rendement en jus :

Le rendement en jus est calculé par la relation suivante :

$$R \text{ jus (\%)} = \text{poids jus pressé d'une grenade} / \text{poids arilles d'une grenade.}$$

Avec : Poids jus pressé = poids en (g) de jus extrait à partir de l'ensemble des arilles d'une grenade.

Poids arilles = poids des arilles d'une grenade soumise à l'extraction.

### 1.2.4 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux :

#### 1.2.4.1 .Préparation de l'extrait pour les dosages :

Les trois extraits bruts : aqueux, hydroéthanolique et éthanolique de différentes parties de fruit grenadier (l'écorce et les graines) sont solubilisés dans l'éthanol à une concentration de 1mg/ml pour le dosage des flavonoïdes totaux e des polyphénols.

#### 1.2.4.2. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu selon la technique décrite par Yap *et al.* (2009) avec une légère modification.

##### ✓ Principe :

La méthode celle utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu. Ce dernier est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (Bessas, 2008).

##### ✓ Mode opératoire :

Mettre 1ml de chaque extrait dans des tubes à essais ; ajouter 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu puis ajouter 1ml de carbonate de sodium à 2%. Après 2h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV- visible à 760nm cotre un blanc (éthanol).

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalentes d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

**1.2.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux :**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de *Punica granatum* a été estimée par un dosage colorimétrique basée sur la méthode de Mimica-Dukic (1992) in Abdou Bouba (2010) avec quelques modifications.

✓ **Principe :**

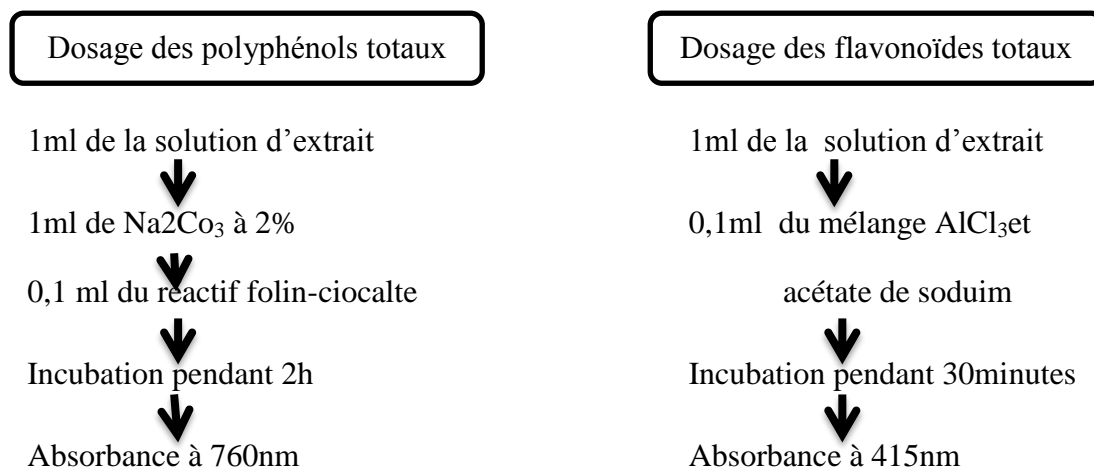
Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium) (Sang *et al.*, 2002). L' $AlCl_3$  forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols, ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm (Belguidoum, 2012).

✓ **Mode opération :**

Mettre 1ml d'extrait dans un tube à essai ; Ajouter 0,1 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium( $AlCl_3$ ) avec 0,1ml d'acétate de sodium ( $C_2H_3NaO_2$ ); Laisser incuber 30min à température ambiante. Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 415nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercitine, elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercitine par gramme d'extrait (mg EQ/ g d'extrait sec).

Le protocole de dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes sont illustrés dans la figure 15 :



**Figure 15:** Le protocole de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

1.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :

1.2.5.1 Test DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl):

✓ Principe

Le composé chimique DPPH est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur l'atome du pont formé par les deux azotes (Popovici *et al.*, 2009).

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH\* est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH., qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2003).

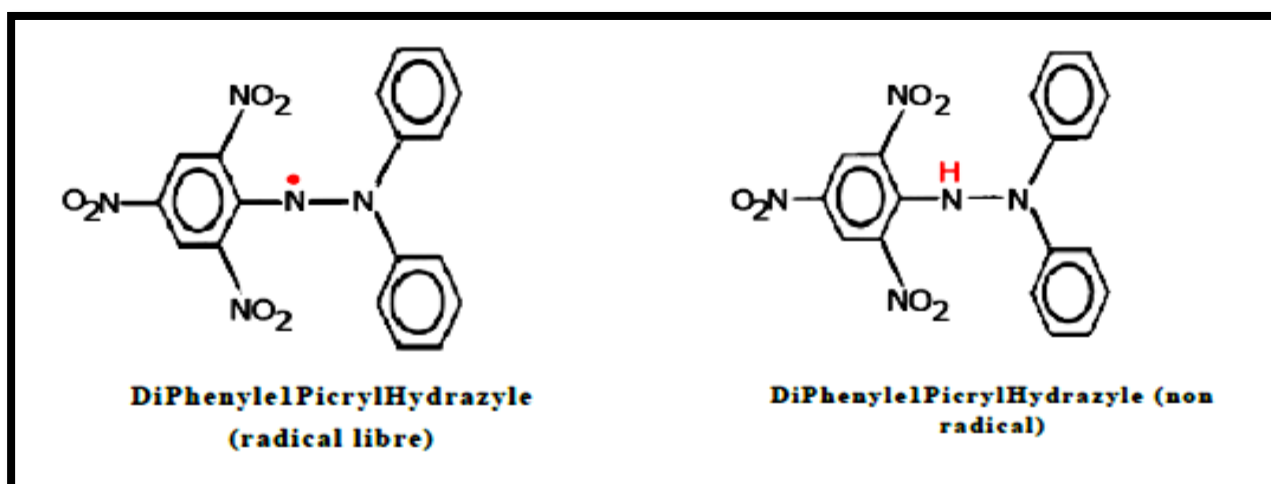


Figure 16: La réaction du DPPH avec un antioxydant (Molyueux, 2004)

✓ Protocole expérimental :

La détermination de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH a été effectuée en utilisant la méthode décrite par (Molyueux, 2004) légèrement modifiée. Une solution éthanolique de DPPH a été préparée en dissolvant 4 mg de ce produit dans 100 ml d'éthanol. Ensuite, à 1ml d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés 0,1ml de la solution DPPH. Les extraits sont testés à différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/ml) ; puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés avec les antioxydants de référence BHT et BHA. L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) à l'aide de la formule suivante :

$$AA\% = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

A0 : absorbance DPPH      A1 : absorbance échantillon

### **Détermination de la concentration inhibitrice des radicaux (IC50) :**

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

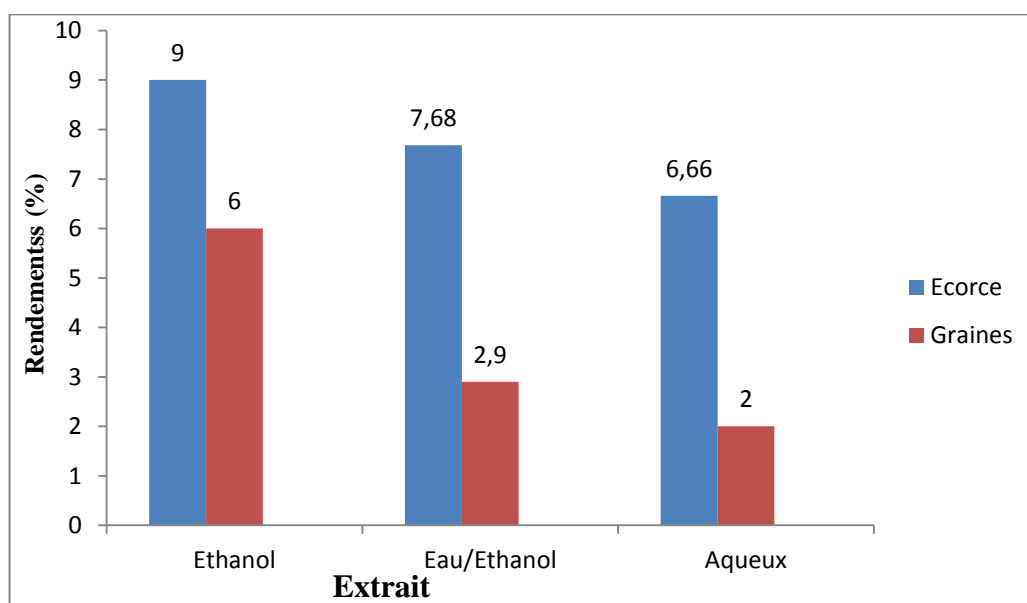
# **Chapitre 2 :**

**Résultats et discussions**

**2.1. Les rendements des extraits secs :**

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité (Hesni & Moumine, 2020).

Les écorces et les graines de grenade ont été soumis à une extraction en utilisant différents solvants à polarité croissante, de l'eau, du l'éthanol et du mélange entre éthanol et l'eau. Les résultats des rendements d'extraction sont présentés dans la **figure17**.



**Figure 17:** Les rendements des extraits de différente partie de fruit Punica granatum

La lecture des rendements d'extraction montre que l'extrait éthanolique de l'écorce a donné le rendement le plus élevé (9 %) suivi par l'extrait hydroéthanolique d'écorce avec (7,68 %), l'extrait aqueux d'écorce avec (6,66%), l'extrait éthanolique des graines avec (6%) et l'extrait hydroéthanolique des graines (2,90%). Tandis que le rendement de l'extrait aqueux des graines a été le plus faible dont le taux est égal à 2%. Cette variation du rendement entre les extraits bruts dans notre étude s'explique par le fait que la fixation Hesni & Moumine( 2020) des composés chimiques par un solvant donné peut dépendre de sa polarité. On constate que l'éthanol est le solvant le plus approprié pour cette extraction.

L'étude réalisée par Iqbal *et al.* ( 2008) ont donné des résultats supérieurs à ceux que nous avons obtenus dans notre étude. Par contre, Les résultats obtenus par Li *et al.* (2006) indiquent que le mélange de différents solvants est plus puissant dans la récupération des antioxydants que les

solvants individuels. Cette divergence dans les rendements peut s'expliquer par l'influence de plusieurs paramètres tels que la méthode d'extraction utilisée (Bourgou *et al.*, 2016). Il est important de souligner que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée affectent le rendement et par conséquent les activités biologiques (Cheurfa *et al.*, 2017).

La composition chimique des composés phénoliques, du point de vue qualitatif et quantitatif, peut varier. Ces variations sont en rapport avec certains facteurs écologiques, la partie de la plante utilisée et l'âge de la plante ou même les facteurs génétiques.

### 2.2. Rendement de jus :

Le rendement de l'extrait naturel de jus égale à 30 %.

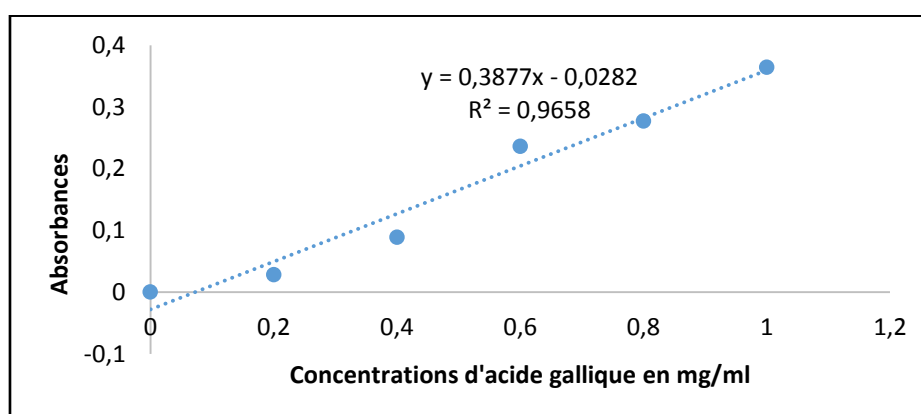
### 2.3. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux :

#### 2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

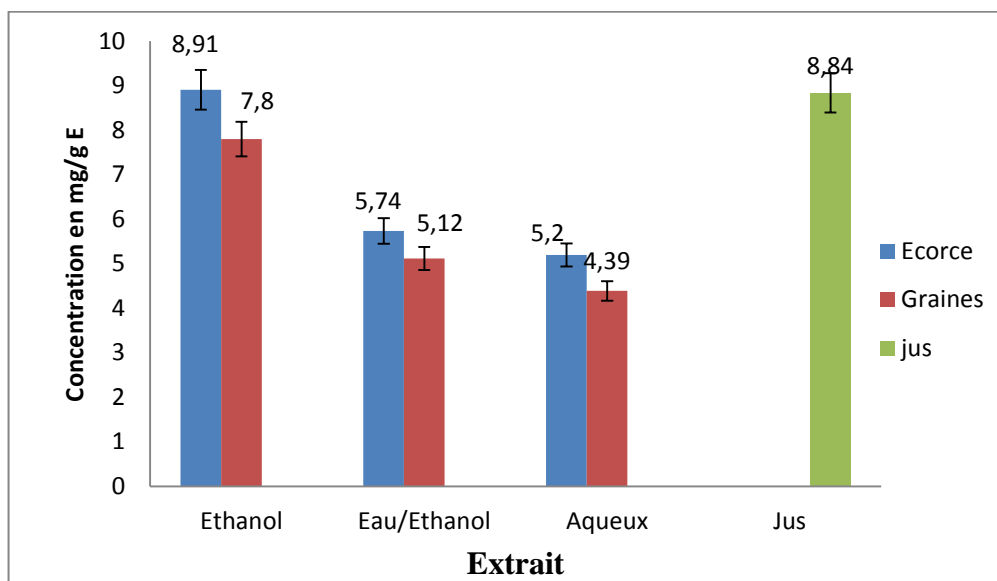
Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal et ils ont une activité antioxydante significative en raison de leur capacité à donner de l'hydrogène et à former des radicaux intermédiaires stables.

La teneur en polyphénols dans nos trois échantillons (écorce, les graines et le jus) a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec différentes concentrations (0,2-0,4-0,6-0,8-1 mg/ml) d'une solution standard d'acide gallique.

Notre courbe d'étalonnage comprend une équation de la régression linéaire ( $y = 0,3877x - 0,0282$ ) et un coefficient de corrélation de ( $R^2 = 0,9658$ ) et qui sont représentés par la **figure18**.



**Figure 18:** La courbe d'étalonnage de l'acide gallique



**Figure 19:** Les teneurs en polyphénols totaux des extraits des différentes parties de *Punica granatum*

Toutes les sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec  $\pm$  l'écartype.

Selon les résultats illustrés dans la **figure19**, nous remarquons que la teneur en polyphénols dépend de la polarité des solvants utilisés. L'extrait éthanolique d'écorce contient la teneur la plus élevée en composés phénolique totaux estimée à  $8,92 \pm 0,094$  mgEAG/g d'extrait sec par rapport aux extrait éthanlique de graines et le jus avec taux égale à  $8,84 \pm 0,006$  mgEAG/g ES et  $7,80 \pm 0,009$  respectivement, suivi par l'extrait hydroéthanolique d'écorce avec un taux estimée  $5,47 \pm 0,004$  mgEAG/gES, puis les extraits aqueux d'écorces et des graines des avec taux égaux  $5,20 \pm 0,04$  et  $5,12 \pm 0,007$  mgEAG/g ES respectivement. Tandis que l'extrait hydroethanolique des graines est le plus pauvre en ces métabolites avec un taux égal à  $4,39 \pm 0,004$  mgEAG/g ES. L'analyse statistique indique une différence significative entre les extraits ( $P \leq 0,05$ ).

Nos résultats sont en accord avec les études précédentes ; Li *et al.* (2006) ont constaté que la teneur totale en composés phénoliques de l'extrait de la peau du *Punica granatum* est plus élevée que celle de l'extrait de pulpe. Une autere étude a été rapporté par Mirdehghan & Rahrmi (2007) , qui ont trouvé que les écorces sont plus riche en polyphénols que les graines.

La teneur en polyphénols totaux de nos extraits d'écorces est supérieure à celle obtenue par Doukani *et al.* (2018) qui ont trouvé des teneurs égales à 0.89 et 4.125mg EAG/g d'extrait sec pour l'extrait aqueux et hydro-éthanolique respectivement dans la région de Tiaret. Par contre, une autre étude menée par a rapporté des teneurs Orak *et al.* (2012) en polyphénols de l'ordre de  $60,67 \pm 0,40$

et  $54,13 \pm 0,29$  mgEAG/g ES pour l'extrait éthanolique et aqueux respectivement. Ces résultats sont largement supérieurs par rapport à ceux obtenus dans notre étude.

Le résultat retrouvé pour le jus de la grenade est de 8,84 mg EAG/g d'extrait sec. Ce résultat est inférieur par rapport à ceux rapportés par Konsoula (2016). Ce dernier a trouvé des valeurs de 34,2 et 26,8 mg EAG/g d'extrait sec pour un extrait méthanolique et éthanolique respectivement. Une autre étude menée par Aloqbi *et al.* (2016), la teneur des polyphénols était de 118,56 mg EAG/g d'extrait sec, cette teneur supérieure est à la nôtre.

Généralement, le contenu polyphénolique varie selon les facteurs géographiques et climatiques (exposition solaire élevée, température chaude et salinité), les facteurs génétiques, la période de récolte et le stade de développement de la plante (Hesni & Moumine, 2020).

Selon Garcia-Salas *et al.* (2010), la polarité du solvant affecte la solubilité des composés phénoliques ce qui peut causer une différence dans les teneurs en polyphénols totaux obtenus.

### 2.3.2 Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes dans les systèmes biologiques sont réputés pour leurs capacités antioxydantes, leurs capacités à transférer des électrons, à activer les enzymes antioxydants et à inhiber les oxydases (Hesni & Moumine, 2020)

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et la soude (NaOH). La teneur en flavonoïdes dans nos échantillons a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec différentes concentrations (0.2- 0.4 - 0.6 - 0.8 - 1 mg/ml) d'une solution standard de quercitine.

Notre courbe d'étalonnage comprend une équation de la régression linéaire ( $y= 0,5281x+0.0191$ ) et un coefficient de corrélation de ( $R^2= 0,9886$ ) qui sont reportés sur la **figure 20**.

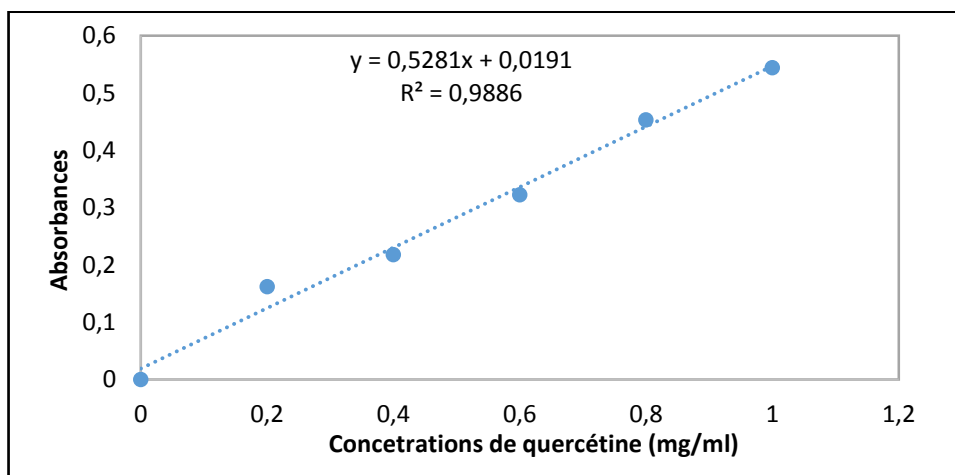


Figure 20: La courbe d'étalonnage de la quercitine.

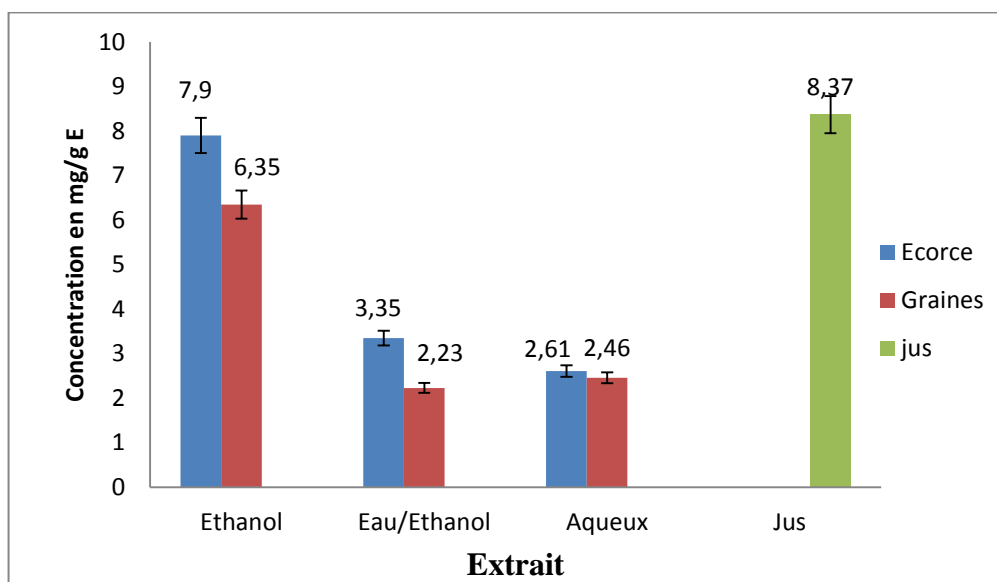


Figure 21: Les teneurs en flavonoïdes des extraits des différentes parties des fruits de *Punica granatum*.

Toutes les sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec± l'écartype.

Suivant les données obtenues (**figure21**), le taux le plus élevé en flavonoïdes est réparé dans le jus avec  $8,37 \pm 0,044$ mg EQ/ g d'extrait sec suivi par l'extrait éthanolique d'écorce et des graines avec  $7,90 \pm 0,006$  et  $6,35 \pm 0,033$  mg EQ/ g d'extrait sec respectivement, suivi l'extrait hydroéthanolique d'écorce avec  $3,35 \pm 0,02$  mg EQ/ g ES, puis l'extrait aqueux d'écorce avec  $2,61 \pm 0,009$  mg EQ/ g ES et l'extrait hydroethanolique des graines avec  $2,46 \pm 0,025$  mg EQ/ g ES. Enfin l'extrait aqueux des graines qui présente une faibles teneur en flavonoïdes correspondant à

$2,22 \pm 0,004$  mg EQ/ g d'extrait sec. L'analyse statistique indique une différence significative entre les extraits ( $P \leq 0,05$ ).

Nos résultats obtenus sont contradictoires avec ceux de l'étude effectuée par Okra et ses collaborateurs en 2012 où l'extrait éthanolique des écorcées présente la teneur la plus élevée en flavonoïde.

La teneur des flavonoïdes du jus de la grenade est de 8,37 mg EQ/g ES. Ce résultat est en supérieures avec ceux rapportés par Konsoula (2016). En effet, pour une concentration 0,25g/ml, les teneurs étaient de 4,3 et 3,4 mg EQ/g ES pour un extrait méthanolique et éthanolique respectivement. Tandis que pour une autre étude menée par Aloqbi *et al.* (2016), la teneur des flavonoïdes est de 31,5mg EQ/g d'extrait sec, cette teneur est supérieure à la nôtre.

Cependant, Mousavinejad *et al.* (2009) n'ont pas détecté par HPLC UV-VIS de flavonoïdes autre que les anthocyanines dans le jus de huit variétés de grenade étudiées. Cela pourrait s'expliquer par le fait que lors de la maturation du fruit, la teneur en anthocyanine augmente alors que celle des autres composés phénoliques diminue (Mousavinejad *et al.*, 2009).

Cam & Hisil (2010) ont mesuré la teneur des flavonoïdes pour trois extraits de l'écorce de grenade à une concentration de 0.16 g/ml : la teneur de l'extrait hydro-éthanolique (13 mg EQ/g d'extrait sec) est supérieure au résultat trouvé avec notre extrait, par contre la teneur de l'extrait aqueux (6,2 mg EQ/g ES) est similaire à la nôtre et l'extrait éthanolique (18,1 mg EQ/gES) est légèrement supérieur comparé à une autre étude Elfalleh *et al.* (2012) qui a obtenue 51,52 mg EQ/g pour le même type d'extrait.

Les résultats obtenus par Li et ses collaborateurs en 2006, ont révélé que les écorces sont plus riches en flavonoïdes que les graines.

Cette grande variation peut être due à la différence des solvants utilisés, aux procédures d'extraction utilisées, la partie de la plante utilisée ou les conditions de stockage et de travail.

### 2.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante :

#### 2.3.3.1 Test de piégeage du radical libre DPPH :

Le DPPH est un radical libre stable qui est largement utilisé pour l'estimation simple de la capacité antioxydante des composés phénoliques (Achat *et al.*, 2016). La méthode est basée sur la mesure spectrophotométrique de la variation de concentration en DPPH résultant de la réaction avec un antioxydant (Pyrzynska & Pekal, 2013).

Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Le paramètre IC50 représente la concentration équivalente à 50% de DPPH perdu. Les résultats exprimés en IC50 qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC50 est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Zeghad, 2009).

Les résultats sont résumés dans le tableau :

**Tableau 1:** Les concentrations inhibitrices IC50 (mg/ml) du radical DPPH des différents extraits de grenade et les antioxydants de référence BHA et BHT.

<b>Extrait</b>	<b>IC50 (mg/ml)</b>
<b>Extrait éthanolique de l'écorce</b>	0,13
<b>Extrait hydrohéthanolique de l'écorce</b>	0,35
<b>Extrait aqueux de l'écorce</b>	0,18
<b>Extrait éthanolique des graines</b>	0,15
<b>Extrait hydrohéthanolique des graines</b>	0,51
<b>Extrait aqueux des graines</b>	0,19
<b>Jus</b>	1,14
<b>BHT</b>	0,1
<b>BHA</b>	0,09

D'après les résultats mentionnés dans le **tableau 1**, la valeur d'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé car elle reflète la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale en DPPH\*.

L'analyse des données obtenus montre que les antioxydants de référence BHA et BHT présentent les plus faibles valeurs d'IC50 estimées à 0,09 mg/ml et 0,1 mg/ml respectivement. L'extrait éthanolique de l'écorce a montré une valeur d'IC50 de 0,13 mg/ml, proche de celles de BHT et plus faible par rapport aux autres extraits et au jus de fruit. Cela signifie que leur pouvoir antioxydant est plus important que celui des autres extraits.

Nous pouvons donc classer les différentes fractions par ordre décroissant de leurs activités comme suit : BHA > BHT > extrait éthanolique de l'écorce > extrait éthanolique des graines > extrait aqueux de l'écorce > extrait aqueux des graines > extrait hydrohéthanolique de l'écorce >

extrait hydroéthanolique des graines > jus. Tous les extraits montrent une différence significative ( $P > 0,05$ ).

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

L'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique des écorces est plus élevée que celle de l'extrait aqueux et hydroéthanolique. Ces résultats sont confirmés par plusieurs études Elfalleh *et al.* (2012) ; Malviya *et al.* (2014), où l'extrait méthanolique et éthanolique donne une activité plus élevée que l'extrait aqueux.

L'activité antiradicalaire des extraits des écorces est plus élevée que celle des graines. On remarque une corrélation entre la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins et l'activité antiradicalaire équivalente à celle du pouvoir réducteur.

Li *et al.* (2006) confirme dans leur études, que les écorces sont plus riches en composés phénoliques, ce qui fait que leurs activités antiradicalaires soient supérieures à celles des graines.

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

Les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH suggèrent que les composants qui se trouvent dans l'écorce de la grenade sont capables de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire des mécanismes de donation d'électrons ou d'hydrogène et pourrait donc être en mesure d'empêcher l'initiation des réactions en chaîne des radicaux libres délétères induites dans les matrices sensibles comme les membranes biologiques. Ceci indique que les composants de l'écorce de grenade peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux (Iskounen & Tadount, 2018).

### Conclusion :

Ces dernières décennies, un intérêt croissant a été accordé à la mise au point de composés antioxydants naturels via le screening de ressources végétales et de plants médicinales. Ce qui a abouti à la découverte d'un grand nombre de ces composés utiles qui peuvent jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies et aussi un rôle dans les industries agroalimentaires. C'est dans ce but nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante des différentes parties du fruit *Punica granatum* (écorce, graines, et le jus).

Le calcul des rendements après extraction a montré que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction pour les écorces et les graines.

Le dosage des composés phénoliques révèle la richesse des extraits de l'écorce, les graines et l'extrait naturel de grenade en polyphénols totaux avec des valeurs variant entre 2,46 mg EAG/g d'extrait sec et 8,91 mg EAG/g d'extrait sec et en flavonoïdes avec des valeurs variant entre 4,39mg EC/g ES et 7,9 mg EC/g d'extrait sec.

L'étude de l'activité antioxydante montre une grande capacité des différents extraits à neutraliser le radical DPPH. Cette activité est hautement dépendante de la teneur en composés phénoliques. L'extrait éthanolique a représenté le pouvoir antioxydant le plus important par rapport aux autres extraits.

Notre étude confirme l'efficacité de l'usage de la grenade en médecine traditionnelle et constitue une source d'informations qui ouvre le chemin pour la réalisation d'autres études plus approfondies telles que :

- Une évaluation de l'activité antioxydante de différentes parties de *Punica granatum* L par des tests supplémentaires tels que la méthode de blanchissement de la  $\beta$ -carotène et la méthode de réduction des radicaux cations (ABTS).
- Une étude de d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire et antimicrobienne).
- Un isolement des molécules bioactives par des techniques chromatographiques afin de les identifier par des méthodes spectrales.
- Une évaluation de l'effet thérapeutique de molécules isolées par des essais in vivo sur les animaux

### Référence bibliographiques :

- Abbayes, H., Chedefoud, M., Ferré, Y., Feldmann, J., Gaussen, H., Gasse, P., et al. (1963). *Botanique*. Masson: anatomie-cycles évolutifs systématique.
- Achat, s., Rakotomanomana, N., Madani, K., & Dangles, O. (2016). Antioxidant activity of olive phenols and other dietary phenols in model gastric condition : Scavenging of the free radical DPPH and inhibition of the haem-induced peroxidation of liolec acid . *Food Chemistry*, 123, 135-142.
- Afanas'eva, I., Ostrakhovitch, E., Mikhal'chik, E., Ibragimova, G., & Korkina, L. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *biochemical pharmacology*(61(6)), 677-6.
- Ahmed, S., Wang, N., Hafeez, B., Cheruvu, V., & Haqqi, T. (2005). Punica granatum L. extract inhibits IL-1B-Introduced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kBin human chondrocytes in vitro. *The journal of nutrition*,135(9),, 2096-2102.
- Ajaikumar, K., Asheef, M., Babu, B., & Padikkala, J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by Punica granatum (pomegranate) methanolic extract. *Jornal or Ethnopharmacology*,96 (1-2), 171- 176.
- Alhijna, O., & Bourich, E. (2017). Grenade de Beni Snous:Etude et caractérisation chimique des extraits de pépins , evaluation de l'activité microbiologique. *Mémoire de docteur en pharmacie :Université Abou Bekr Belkaid*, p64. Tlemcen.
- Almeida, N., Figueiredo, G., & Venturini, J. e. (2018). Antimicrobial and immunomodulatory activity of pomegranate in the systemic candidiasis on *Galleria mellonella*. *J Clin Exp Tox*, 8-17.
- Aloqbi, A., Omar, U., Yousr, M., Howell, N., & K. (2016). Antioxidant activity of pomegranate juice and punicalagin, 8(6). *Jurnal of Food Microbiology*, 235-246.
- Arora, A., Sairam, R., & Srivastasa, G. (2002). Oxidative stess and antioxidative system in plants. *Current Science*, 1227-1238.

## Références bibliographiques

- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkora, N., Kaplam, M., Coleman, R., et al. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modification to LDL and platelet aggregation: Studies in humans in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*(75( 5)), 1062 -1076.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*,23(3), 423- 433.
- Banihani, S., Makahleh, S., El-Akawi, Z., Al-Fashtaki, R., Khabour, O., Gharibeh, M., et al. (2014). Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances B-cell function and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. *Nutr Res*(34:), 862- 867.
- Bartosch, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*,82, 5-21.
- Belguidoum, M. (2012). Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. *Mémoire de Mester, Université Kasdi Merbah Ouargla*, p37.
- Belkheiri, N. (2019). Dérives phénoliques à activités antiathérogènes. *Thèse de Doctorat*, 129:1504-1512. l'université Toulouse 3 - Paul Sabatier, spécialité chimie biologie santé.
- Bendif, H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques lamiaceae: *Ajuga reptans* (L.) *teucrium polium* L. *thymus munbyanus* subsp. *coloratus* ( Boiss.& Reut.) *greuter & Burdet* et *rosmarinus eriocalyx* Jor. *Thèse de doctorat*, 154p. Ecole normale supérieure de Kouba-Alger.
- Bendjabeur, S. (2012). Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *Punica granatum*) en vue de leur utilisations alimentaire. *Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques*. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger.
- Benhammou, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *thèse de doctorat*, p113. Universités Aboubakr Belkaid, Tlemcen (Algérie).
- Benoit Bock. (2013). *Tela Botanica: Base de données Nomenclature de la flore en France*. BDNFE.

## Références bibliographiques

- Bessas, A. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. *Mémoire de Ingénieur d'état Université Djillali Liabe-Sidi Bel Abbes*, P51.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J., & Sapirstien, H. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, 82(4), 390-393.
- Bouayed, J., Rammal, C., Younos, A., Dicko, & Soulimani, R. (2008). Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie*, 6(2):71-74.
- Bougandoura, & Bendimerad. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta(L.)*. 14-19.
- Bourgou, S., Serairi, B., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur le teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphobia helioscopia*. *Journal of new sciences*(32), 1649-1655.
- Cam, M., & Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123, 878- 885.
- Cheurfa, M., Allem, R., Zabel, A., Aichouni, W., & Medjkane, M. (2017). Etude des effets des extraits des racines de *Glycyrrhizaglabra L.* et *Zizyphus lotus L.* sur quelques bactéries pathogènes de l'homme. *Phytothérapie*.
- Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Paris: Ed Yves Dacosta.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di, B., Giovannini, C., & Msella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43: 348-361.
- Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). *Thèse de Doctorat*. Mali.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, et al. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 50(8), 654-660.
- Doukani, K., Chahida, K., Tabak, S., & Bouhenni, H. (2018). Profil phytochimique et activité anti *Helicobacter pylori* de la grenade (*Punica granatum L.*) (fruit et écorce) dans la région de Tiaret. *Algerian journal of natural products*, 6(1), 618-629.

## Références bibliographiques

---

- Edeas, M. (2006). *Les antioxydants*. PepsiCo France 1 place de la BOULE 92024 Nanterre cedex.
- Elfalleh,W.,Hannachi, H., Tlili,N., Yahia,Y., Nasri, N., & Ferchichi, A (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel,seed,leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*,6, 4724-4730.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation , more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Fischer, U., Carle, R., & Kammerer, D. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* ) peel,mesocarp,aril and differently produced juices by HPLC-ESI/ MSn. *Food chemistry*(127(2)), 807-821.
- Flora von Deutschland, O., & Schweiz, O. (1885). *Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera*. Germany.
- Fournir, P. (1948). *Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France*. (E. P. Lechevaier, Éd.)
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic -Compound-Extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*(15), 8813-8826.
- Gey, K. (1998). Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. *Biofactors*(7(1,2)), 113-174.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes,structure, propriétés biologique, rôle prophylactique et emplois thérapeutiques. *Phytothérapie*(3(4)), 162-169.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Harbone, J. (1997). Recent advances in chemical ecology. *Nat ProdRep*, 14:83-98.
- Heber, D., Schulman, R., & Seeram, N. (2006). *Pomegranates: Ancient roots to modern medicine*. CRC press.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux,sources,utilisations,et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*(1), 3-6.

## Références bibliographiques

- Herrera, E., & Barbas, C. (2001). Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*(57 (1)), 435-6.
- Hesni, I., & Moumine, Y. (2020). Etude phytochimique et valorisation des extraits bruts de l'écorce de fruit de grenadier d'Ain Témouchent (*Punica granatum*) par l'étude de son activité antioxydante. *Mémoire de Master*. Université d'Ain-Temouchent.
- Hmid, I. (2013). Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum*): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. *These de doctorat en Alimentation et Nutrition*, p177. Université d'Angers(France)et l'Université de Béni Mellal( Maroc).
- Hollman, P. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: Local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*,81(9), 842 -852.
- Hong, J.-W., Peng, G., Kota, B., Li, G., Yamahara, J., Roufogalis, B., et al. (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.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays .*J.Agric. Food chem*(53), 1841 -1856.
- Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., & Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated ,conditions. *Food Research International*,41(20), 194-200.
- Iskounen, T., & Tadount, S. (2018). L'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'écorce et du jus de la grenade *Punica granatum* de kabylie. *Mémoire de mester*. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouazou.
- Ismail, T., Sestili, p., & akhtar, s. (2012). pomegranate peel and fruit extracts : areview of potential antiinflammatory and anti infective effects. *journal of ethnopharmacology*(143(2)), 397- 405.
- Jardini, F., & Mancini Filhi, J. (2007). Composição centesimal e perfil dos ácidos graxos de roma(*Punica granatum*) cultivado no Brasil. *Hig alimentl*, 81-85.
- Jurenka, J. (2008). Therapeutic Application of Pomegranate( *Punica granatum*) : A Review. *Alternative Medicine Review*, 13:128 - 144.

## Références bibliographiques

- Kanatt, S., Chander, R., & Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Inter.J.of Food and Tech.*,45, 216- 222.
- Konsoula, Z. (2016). Comparative efficacy of pomegranate juice,peel and seed extract in the stabilization of Corn Oil under accelerated conditions. *International Journal of Nutrition and Food Engineery*,10(9).
- Koolman, J. (1999). *Atlas de poche de biochimie*.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (Momordica charantia L.) leaf,stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*:11(04), 881-890.
- Kumar, N., Neeraj, & Kumar, S. (2018). Functional properties of pomgranate (Punica granatum L.). *The Pharma Innovation Journal*, 7:71-81.
- Lansky, E., & Newman, R. (2007). Punica granatum (pomegranate)and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *journal of Ethnopharmacology*(109), 109- 177.
- Lecerf, J., Luc, G., & Fruchart, J. (1994). Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *La Revue de médecine interne*(15(10)), 6416-49.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wie, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison pulp extract. *Food chemistry*, 254-260.
- Long, H., Tileney, P., & VanWyk, B. (2010). The ethnobotany and pharmacognosy of Oleaeuropaeasubsp(Oleaceae). *South african journal of botany*(76(2)), 167-420.
- Longtin, R. (2003). *The pomegranate: Nature's power fruit?* JNCI.Nalt: Cancer Inst.
- Malesev, D., & Kuntic, V. (2007). Investigation of metal- flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid reactions. *Journal of the Serbian chemical society*,72(10), 291- 939.
- Malviya, S., AlokJha, A., & Hettiarachchy, N. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal Food Science Technology*, 51(12), 413-413.
- Marc, F., Davin, A., Delene-benbrahim, L., Ferrand, C., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences*(20(4)), 458-463.
- Martin, M., Ramos, S., Malteos, R., Marais, J., Bravo-Clemente, L., Khoo, C., et al. (2015). Chemical characterization and chemo-protective activity of phenolic powders in a model

## Références bibliographiques

---

- cell culture . Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food research international*, 71,86- 82.
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., & Luthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3,173- 193.
- Mirdehghan, S., & Rahrmi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum*) fruit. *Scientia Horticulturae*, 120-127.
- Mohammad, S., & Kashani, H. (2012). Chemical composition of the plant *Punica granatum* (pomegranate) and its effect on heart and cancer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6:5306-5310.
- Molyueux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryldrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakaraj J. Sci. Techn.*, 26(2), 211-219.
- Moufida, R. (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microboite ruminal d'ovins. *Mémoire de Magister*, P 95. Université Mentouri, Constantine (algérie).
- Mousavinejad, I., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., & Khodaparast, M. (2009). Identification and quantification of phenol compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115, 1274-1278.
- Naveena, B., Sen, A., Vaithyanathan, S., Babji, Y., & Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80:, 1304-1308.
- Negi, P., Jayaprakasha, G., & Jena, B. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 393-397.
- Njus, D., & Kelley, P. (1991). Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS.Letters*, 28(42), 147-151.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103, 839-846.

## Références bibliographiques

- Orak, H., Yagar, H., & Isbilir, S. (2012). Comparaison of antioxidant activities of juice, peel and seed of pomegranate (*Punica granatum*) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin and flavonoid contents. *Food Sci. Biotechnol*, 21(2), 373-387.
- Pham-Huy, L., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science:IJBS*(4(2)), 89.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*,63((7)), 1035-1042.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 25-39.
- Porter, L. (1989). *Tanins In J,B,Harborne(Ed); Methods in plantbiochemistry ;Vol,I,plant phenolique*. London: Academic press.
- Pourrut, B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. *Thèse pour l'obtention du diplom de doctorat à l' institut national polytechnique de l'université de Toulouse spécialité: Ecotoxicologie*. France.
- Powers, S., & Jackson, M. (2008). Exercise-induced oxidative stress:Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 1243-1276.
- Prashanth, D., Asha, M., & Amit, A. (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum Granatum* Fitoterapia. 171-173.
- Princemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutr.Clin.Metab*(16), 233-239.
- Pyrzynska, K., & Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl DPPH to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288.
- Pyrzynska, K., & Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl DPPH to estimate the antioxidant capacity food samples. *Analytical Methods*,5(17), 4288.
- QA international collectif. (1996). *L'encyclopédie visuelle des aliments*. Singapour: Quebec-Amerique(EDS).
- Qamar, A., Zara, B., Rizwan, S., & Tahir, Z. (2018). Nutritional and therapeutic properties of pomegranate. *Scho J Food & Nutr*(2:), 115-120.
- Rusznayak, I., & Szent-Gyorgyi, A. (1936). *Vitamin P: flavanols as vitamins*. Nature.

## Références bibliographiques

---

- Salunkhe, D., Chavan, J., & Kadam, S. (1990). *Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies*. Florida: CRC press: Boca Raton.
- Sang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in popolis by two colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 178-182.
- Satrani, B., Ghanmi, M., Mansuori, N., & Amusnt, N. (2015). Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of moroccan junipers.
- seeram, N., Lee, R., & Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate juice. *Clinica chimica acta*, 348 (1-2), 63-68.
- Seeram, N., Zhang, Y., Reel, J., Krueger, C., & Vaya, J. (2006). Pomegranate Phytochemicals. In: Pomegranates Ancientes Roots to Modern Medicine . *Medicine CRCPress Taylor&Fancis Group Medicinal and aromatic plants-industrial profiles*, p263.
- Sereme, A., Milloga-rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2008). Proprietes therapeutique des plants a tanins du Bukina Faso. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, 15 :41-49.
- Serteyn, D., Mouithys-Mickalad, A., Franck, T., Grulke, S., Lamy, M., Deby, C., et al. (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Annales de médecine vétérinaire*(146(3)), 137-153.
- Shehu, A., Salwani, I., Rohin, M., Harun, A., Aziz, A., & Haque, M. (2016). Antifungal properties of Malaysian tualang honey and stingless bee propolis against *Condida albicans* and *Crypococcus neoformans*. *journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6:44-50.
- Stover, E., & Mercure, E. (2007). The pomegranate :A new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5),1088-1092.
- Tapiero, H., Tew, K., Ba, G., & Mathe, G. (2002). Polyphenols : Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*(56( 4)), 200-207.
- Tsao, R. (2010). Chemisty and biochemistry of dietary polyphenols. *Noutrients*(2(12)), 1231-1246.
- ViudaMartos, M., Fernàndeslopes, J., & PérezAlvares, J. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: areview. *Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety*(9(6)), 635- 654.

## Références bibliographiques

---

- Von Sonntag, C. (2008). Advanced oxidation processes: Mechanistic aspects. *Water science and technology*(58(5)), 1015-1021.
- Wald, E. (2009). Le grenadier *Punica granatum*: Plante historique et évaluation thérapeutique récentes. Université Henri Poincaré.
- Wichtl, M., & Anton, R. (2009). *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Paris: Edition Lavoisier.
- Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M., & Azizi, M. (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts. *Journal of agricultural sciences and technology*, 9, 35-42.
- Zeghad, N. (2009). Étude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. *Mémoire magister*. Université Costantine.