

Table des matières

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Tables des matières

Introduction	1
Chapitre I. Présentation de la plante <i>punica granatum</i> et le stress oxydatif.....	2
1. Le grenadier	2
1.1. Généralités sur le grenadier	2
1.2. Classification	2
1.3. Aspect botanique	3
1.4. Répartition géographique	3
1.5. Exigences écologiques	4
1.6. Utilisation de grenadier	4
1.7. Composition chimique de la plante	5
1.8. Propriétés thérapeutiques de <i>punica granatum</i>	8
2. Les composés phénoliques	9
2.1. Généralités sur les composés phénoliques	9
2.2. Classification des composés phénoliques	10
2.2.1 Les acides phénoliques	10
2.2.2 Flavonoïdes	11
2.2.3 Tanins	12
2.3. Espèces radicalaires et le stress oxydatifs	12
2.3.1. Généralités	12
2.3.2. Le type des espèces radicalaires et leur mécanisme de formation	13
2.3.3. Le pouvoir antioxydant	14
Chapitre II. Matériel et méthodes	16
1. Matériel	16
1.1. La plante étudiée	16
1.2. Réactifs et matériels	17

1.3. Préparation des réactifs	17
2. Préparation des extraits	18
2.1. Extrait hydro éthanoïque	18
2.2. Infusion	18
3. Extraction des flavonoïdes	18
3. Screening phytochimique	18
3.1. Révélation des polyphénols	18
3.2. Révélation des flavonoïdes	19
3.3. Révélation des saponines	19
3.4. Révélation des stérols et des polyterpènes	19
3.5. Révélation des alcaloïdes	19
4. Dosages des polyphénols totaux	19
5. Dosages des flavonoïdes	20
6. Dosages des flavonols	20
7. Dosages des anthocyanines	20
8. Activité antioxydant	21
Chapitre III. Résultats et discussions	22
1. Rendement des extractions	22
2. Les tests phytochimiques	22
3. Dosage des polyphénols totaux	23
4. Dosage des flavonoïdes	24
5. Dosage des flavonols	25
6. Dosage des anthocyanines	26
7. Pouvoir antioxydant par DPPH	26
Conclusion	29
Références	

Liste des figures

Figure 1: Photographies de la plante punica granatum. Les feuilles, la fleur, les fruits (grenades)	3
Figure 2: Formule chimique de α -tocopherol	8
Figure 3: Principaux classes des composés phénoliques avec certains exemples	10
Figure 4: Exemples des acides phénols	11
Figure 5: Noyau de base des flavonoïdes	11
Figure 6: exemple des tanins : A: tanins condensé, B : tanins hydrolysable	12
Figure 7: Processus de formation des radicaux libres	14
Figure 8: Ecorce de grenade sécher	16
Figure 9: Montage d'extraction : Soxhlet et Rotavapeur	18
Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	23
Figure 11: Courbe d'étalonnage de quercétine	24
Figure 12: Courbe d'étalonnage de quercétine	25
Figure 13: Variation du pouvoir antioxydant en fonction de la concentration du : (A) l'infusion, (B) extrait hydroalcoolique, (C) référence (vitamine C) et (D) l'extrait de flavonoïdes	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky & Newman, 2006)	6
Tableau 2: Principaux types des substances actifs avec quelques exemples de chaque type	13
Tableau 3: Rendements d'extractions pour l'extrait hydroalcoolique et l'extrait de flavonoïdes	22
Tableau 4: Criblage phytochimique des l'écorce de fruits	23
Tableau 5: Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de l'écorce	24
Tableau 6: Teneur en flavonoïdes dans la partie étudiée de <i>Punica Granatum</i>	24
Tableau 7: Teneur en flavonols dans l'écorce du fruit de la plante étudiée	25
Tableau 8: Teneur en flavonoïdes dans la partie étudiée de grenadier	26

Références Bibliographiques

- Achat S. 2014. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques Université A.Mira-Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Département des Sciences Alimentaires.
- Ahad S, Syed T, Tauseef A.M, Irshad A. N.2018. Anticoccidial activity of fruit peel of Punica granatum L. Microbial Pathogenesis, 116, 78–83
- Aoun M. 2011. Modulation nutritionnelle du métabolisme lipidique et de la mitochondrie (structure et fonction): Effet des lipides et des polyphénols. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.
- Amiot M. J, Aubert, S, Gonnet, M, Tacchini M. 1989. les composés phénoliques des miels étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. Apidologie, 20(2), 115-125.
- Ben Abdennebi, M.A .2012. Le grenadier tunisien (Punica granatum) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Université de Montréal. Université de Montréal.
- Ben Ajmia W, Makni M, Ammar S, Khannous L, Ben Hassana A, Mohamed Bouaziz, Es-Safi d, Radhouane Gdoura N.E . 2012. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety Punica granatum L. extracts against Salmonella enterica (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. International Journal of Food Microbiology, 241, 123–131
- Benkhniq O, Zidane L, Fadli M, Elyacoubi H, Rochdi A, Douira A. 2010. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Bot. Barc, 53, 191-216.
- Bernard F.L.2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa). Université des antilles de la guyane.
- Bhandary S.K, Kumari N.S, Bhat V. S, Sharmila K.P. , Bekal M.P.2012. Preliminary phytochemical screening of various extracts of punica granatum peel, whole fruit and seeds. Journal of Health Science, 2, 34-38.
- Boubekri C. 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider – Biskra.
- Bouguerne B, 2012, Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Université toulouse III - paul sabatier .

- Braga L.C., Leite A.A.M., Xavier K.G.S., Takahashi J.A., Bemquerer M.P., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A.2005. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol*, 51 ,541–547.
- Cesari L .2017. Extraction de composés phénoliques à partir d’une bio-huile de lignine.Université de Lorraine.
- Chira K, Suh J.H, Saucier C, Teissédre P.L.2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6,75–82.
- Dandachi F,Hamadeh B,Youssef H,Chahine H, Chalak L.2017. Diversity assessment of the Lebanese germplasm of pomegranate (*Punica granatum L.*) by morphological and chemical traits. *Annals of Agricultural Sciences*,62(1), Pages 89-98.
- El Hachimi F, El Antari A, Boujnah M, Bendrisse A, Alfaiz C.2015. Comparaison des huiles des graines et de la teneur en acides gras de différentes populations marocaines de jujubier, de grenadier et de figuier de barbarie [Comparison of oils seed and fatty acid content of various Moroccan populations of jujube, grenadier and prickly pear]. *J. Mater. Environ. Sci*, 6 (5), 1488-1502.
- Fadavi A, Barzegar M., Azizi M.H. Bayat M.2007. Note. Physicochemical Composition of Ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum L.*) Grown in Iran. *Food Science and Technology International*, 11, 113.
- Feknous S, Saidi F, Said M.R. 2014. Extraction, caractérisation et identification de quelques metabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis L.*). *Nature & Technologie. A-Sciences fondamentales et Engineering*, 11: 7-13
- Ghedadba N, Hambaba L, Ayachi A, Aberkane MC, Bousselsela H, Oueld-Mokhtar SM. 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13 (2): 118-129.
- Harborne A.J., 1998. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science et Business Media. p: 302.
- Hmid I .2014. Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*punica granatum l*): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Université nantes angers le mans.
- Iqbal E, Abu Salim K, Lim L.B.L. 2015. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27: 224-232.

- Jafri M.A, Aslam M, Javed K, Singh S.2000. Effect of Punica granatum Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70 , 309–314.
- KanounK, Abbouni B, Bénine M.L , Benmahdi F.Z, Marouf B.2014. Etude de l'efficacité de l'extrait ethanologique d'écorces de punica granatum linn sur deux souches phytopathogènes: *Ascochyta rabiel* (pass.) labr. Et *fusarium oxysporum* f.sp.radicilycopersici . *European Scientific Journal*, 10, 301-315.
- Khan M.k .2010. Polyphénols d'agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
- Khwarirakpamet A.D, Bordoloi D, Thakur K.K, Monisha J, Arfuso F, Gautam Sethi G, Mishra S, Alan P. Kumar A.P, Kunnumakkara A.B .2018. Possible use of Punica granatum (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacological Research*, 133, 53–64.
- Kim N.D, Mehta R, Yu W, Neeman Livney I, Amichay A, Poirier D, Nicholls P, Kirby A, Jiang W, Mansel R, Ramachandran C, Rabi T, Kaplan B, Lansky E .2002. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* , 71, 203–217.
- Koechlin-Ramonatxo C.2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme* ,20 ,165–177.
- Kong KW, Mat-Junit S, Aminudin N, Ismail A, Abdul-Aziz A. 2012. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chemistry*, 134: 324-332
- Lairini.2014. R. Bouslamti R, Zerrouq F, Farah A, Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de Punica granatum par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante (Enhancement of the aqueous extract of the bark of Punica granatum fruit through the study of its antimicrobial and antioxidant activities). *J. Mater. Environ. Sci*, 5, 2314-2318.
- Lansky E.P, Newman P.A.2006. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Macheix J.J.2005. Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques. ISBN 2-88074-625-6.
- Mansour E, Ben Khaled A, Lachiheb B, Abid M, Bachar Kh, Ferchichi A .2013. Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate. *J. Agr. Sci. Tech* , 15,1393-1403.

- Medjdoub H .2012. Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. Université Abou bekr belkaid.
- N'Guessan K, Kadja B, Zirih GN, Traoré D, Aké-assi L.2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, 6 (1): 1-15.
- Negi P.S, Jayaprakasha G.K.2003. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts. *Food science*, 68, 1473-1477.
- Nourddine B, 2010. propriétés antioxydants de deux variétés de grenade (*punica granatum* l.) de la région de béjaia. Université Abderrahmane Mira de béjaia.
- Oukabli A.2004.Le grenadier des variétés performantes pour la culture. décembre n°123.
- Parseh H, Hassanpour S, Emam-djome Z, Lavasani A.S. 2012. Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) as a Tannin rich Fruit: a review The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture 26 – 27 April 2012 in Isfahan, Iran.
- Salhi S, Fadli M, Zidane L, Douira A. 2010. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *LAZAROA*, 31, 133-146.
- Sava C, Sirbu R, Dumitrescu C .2006.Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans produits naturels. *Scientific study & research*, VII (4), 2006, ISSN 1582-540X 785.
- Spilmont M. 2015. Intérêt de la grenade dans la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose : rôle des fractions lipidiques et polyphénoliques, approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. Université Blaise Pascal.
- Tehranifar A, Zarei M, Zahra Nemati Z , Esfandiyari B, Vazifeshenas M.R. 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126, 180–185.
- Wald E. 2009.Le grenadier (*Punica granatum*): plante historique et évolution thérapeutiques récents. Université De Lorraine.
- Virot M, Tomao V, Ginies C, Visinoni F , Chemat F. 2008. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A*, 1196-1197: 147–152.

Introduction

Les plantes médicinales forment un héritage inestimable dans toutes les étapes de l'évolution de l'humanité, surtout dans les Pays en voie de développement ou l'absence d'un système médical moderne. Pour le Continent africain 80% de populations, utilisent la médecine traditionnelle à base de ces plantes pour faire face aux problèmes de santé (Salhi et al., 2010).

Le Maroc, par sa grande richesse en biodiversité (flore) est considéré parmi les pays qui ont une longue tradition médicale (Benkhniqne et el., 2010). Afin de persuader l'effet thérapeutique de ces plantes médicinales, plusieurs recherches sont faites sur ces plantes à travers leurs extraits pour déterminer la composition chimique et le mode d'action de ces substances in vivo et in vitro sur différentes activités biologiques.

Punica granatum est une espèce appartenant aux plantes médicinales qui possède des capacités illimitées. Il est utilisé comme antiparasitaire, antiviral, agent antibactérien, et dispose aussi d'une importante activité Antioxydante.

Notre étude a porté sur les études phytochimiques de l'extrait hydroalcoolique et de l'infusion de la poudre d'écorce de fruit de la plante *punica granatum L.*

Dans ce présent travail, l'étude est divisée en trois parties:

Dans la première, nous présentons une synthèse bibliographique sur la plante *punica granatum*, concernant ses domaines d'utilisations, sa composition chimique (métabolites secondaires, les acides gras) ainsi que ses effets thérapeutiques.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale dont laquelle nous présenterons les processus d'extraction, screening phytochimique des métabolites secondaires, analyse quantitative des certains polyphénols et l'activité antioxydante.

Dans la dernière partie, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus à savoir l'identification des composés actifs, dosage de ces substances et leurs activités antioxydantes.

Chapitre I.

Présentation de la plante *punica granatuim* Et le stress oxydatif.

1. Le grenadier

1.1. Généralités sur le grenadier

Le grenadier est un arbre fruitier autofertile qui appartient à la famille des Punicaceae comprenant trois espèces différentes : *Punica protopunica*, *Punica nana* et *Punica granatum*. Il est connu sous le nom de Pomegranate dans la langue anglaise, Granada pour la langue espagnole (Ben Abdennebi, 2012) et Romman en arabe.

Le grenadier est cultivé comme fruit comestible (les grenades) à cause de ses qualités ornementales de ses fleurs. La plante s'adapte à des nombreux climats surtout dans les zones arides et semi-arides et aussi supporte la sécheresse (Hmid, 2014).

Des études faites sur la composition de la grenade, ont signalé la richesse de ses différentes parties en de nombreux composés chimiques ayant un grand pouvoir préventif et curatif.

La grenade est une fruit qui est largement utilisée dans l'alimentation humaine, dans l'industrie telle que le tannage et l'extraction de jus, confiture, sirop, sauce... et dans des multiples applications thérapeutiques aussi bien en médecine traditionnelle que dans la recherche médicale (Oukabli, 2004).

1.2. Classification

Règne :	Plantae
Super division :	Spermatophyta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Myrtales
Famille :	Punicaceae

Genre : Punica

Espèces : *Punica granatum L.*

1.3. Aspect botanique

La Figure 1 illustre bien des photos du *Punica granatum* qui est un arbuste vivace ligneux qui peut atteindre 8 m de hauteur (Ahad et al., 2018) contenant des feuilles sous forme oblongues, entières, de 2cm de largeur et de longueur allant de 3 à 7 cm avec des fleurs rouges vifs mesurent 3 cm de diamètre et ses fruits appelés la grenade. Cette dernière est composé d'un ensemble de grains enveloppés dans une pulpe gélatineuse de couleur rouge cramoisi, le tout enrobé par une peau de couleur variant entre le jaune et le rouge foncé (Spilmont, 2015).



Figure 1: Photographies de la plante *punica granatum*.

1.4. Répartition géographique

Punica granatum L est une espèce originaire d'Asie occidentale et plus exactement de l'Himalaya au nord de l'Inde jusqu'en Iran puis a été introduit et cultivé, depuis les temps, dans les régions du bassin méditerranéen (Jafri et al., 2000).

Au Maroc, la surface cultivée de la plante s'étale sur une superficie de 4625 ha. La production annuelle est estimée à 58000 Tonnes (Legua et al., 2012). Le Maroc est considéré comme le 3^{ème}

producteur mondial après la Tunisie et la Turquie (Hachimi et al., 2015), mais cette culture reste moins importante par rapport à d'autres cultures telles que les agrumes et l'abricotier.

Le grenadier est cultivé dans tout le territoire national avec une certaine concentration: 35% dans la plaine de Tadla, 20% dans le Haouz, 6,6% à Settât, 5,8% à Taounate, 5,3% à Nador, 4,5% à Chafchaouen, 3,3% à Azilal et dans certaines oasis du sud (Hmid, 2014).

Actuellement un grand nombre de variétés de grenadiers a été caractérisé, au Maroc, sur les bases pomologiques et morphologiques (Oukabli, 2004). Ces variétés portent des dénominations différentes, attribuées selon la forme du fruit, la couleur de l'épiderme ou la zone de culture (Hachimi et al., 2015). On distingue deux groupes de variété:

- **Les grenades à pépins doux:** principalement Le Sefri de Beni Mellal, les grenades rouges et jaunes de Marrakech, le Kharaji de Bzou, le Mesri de Meknès, Laroussi de Fès et Zhéri d'origine tunisienne (Hachimi et al., 2015).
- **Les grenades acides à pépins durs:** On distingue Wonderful, Negro, Monstruoso, et Dwarf semi evergreen (Hachimi et al., 2015).

1.5. Exigences écologiques

Le grenadier est une plante très répandue dans les climats arides et semi-arides, connue par sa tolérance à la sécheresse et supporte des températures extrêmes allant de -10 et 40 °C. Il est connu pour sa tolérance au calcaire et à la salinité. Les meilleurs résultats d'installation de plantations sont obtenus sur des sols d'alluvions profonds avec des disponibilités satisfaisantes en eau et aussi sur des sols argilo-limoneux irrigués (Dandachi et al., 2017).

1.6. Utilisation de grenadier

Le grenadier est utilisé principalement dans l'alimentation humaine, dans les traitements thérapeutiques ainsi que dans les activités ornementales et industrielles (tannerie du cuir et teinture).

- **Usage alimentaire:**

La grenade représente la partie de la plante la plus importante en alimentation grâce à sa valeur énergétique qui est comprise entre 62 et 83 Kcal pour 100g (Spilmont, 2015). Elle est consommée de préférence fraîche (les grenades à pépins doux) ou en jus. C'est un aliment riche en vitamine (entre 0.10±0.04 et 0.40±0.18 mg de vitamine C /100g de jus), en micronutriments, protéines, sucres et en lipides (Fadavi et al., 2007).

- **Usage ornemental:**

Utilisés pour décorer les jardins ou former des haies. En effet, le grenadier possède de très belles fleurs colorées d'une grande valeur ornementale.

- **Usage en médecine traditionnelle:**

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques. Il a été recommandé contre la diarrhée, la fièvre, vomissements, les souffrances de l'utérus chez les femmes (Wald, 2009) ainsi que dans les traitements des infections parasitaires telles que le parasite ténia (Ahad et al., 2018).

Actuellement, au Maroc la pulpe de ses fruits sert d'ingrédient dans les préparations traditionnelles pour soigner des brûlures de l'estomac (Hachimi et al., 2015).

- **Autres usages du grenadier:**

Le grenadier est utilisé pour Les teintures naturelles grâce à la présence de nombreux principes pigments avec des couleurs très variées, (Wald, 2009). Les parties les plus utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce des grenades qui servait au tannage et à la teinture des cuirs (Wald, 2009). Cette partie de la plante est très exploitée; en cataplasme associé avec les feuilles de *Lawsonia inermis* (Henna) et l'écorce de tige de *Salvia officinalis* (*Ssâlmya*) pour noircir et assouplir les cheveux (Hafian et al., 2014).

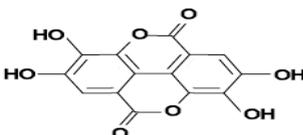
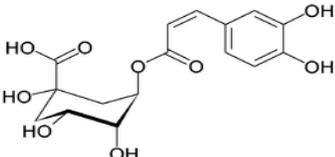
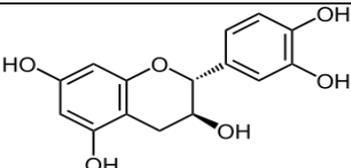
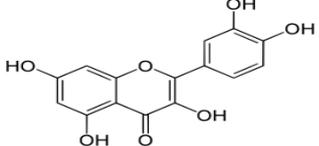
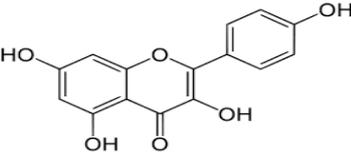
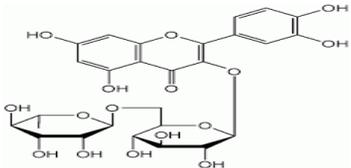
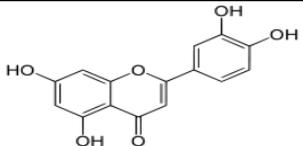
1.7. Composition chimique de la plante

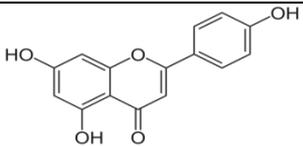
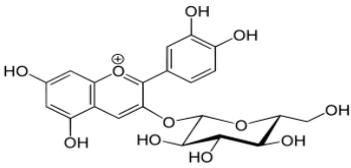
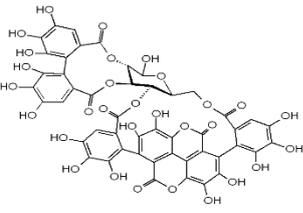
Le grenadier est un paquet d'atouts santé, possédant différentes activités liées à sa composition. Plusieurs études phytochimiques ont montré que la plante comporte un amalgame de composés actifs dans ses diverses parties.

- **Les composés phénoliques:**

Punica granatum constitué d'un amalgame des polyphénols, dont la localisation est liée à leur rôle dans la plante à titre indicatif la présence d'anthocyanidines est responsable de la couleur rouge (Parseh et al., 2012). Le tableau 1^{re} groupe les différents types des polyphénols et leurs présences dans chaque partie de la plante. En effet, les composés majoritaires existant dans le jus de fruits sont l'acide gallique, l'acide élлагique et Punicalagin (Negi et al., 2003).

Tableau 1: Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (Lansky & Newman, 2006).

Classe chimique	Nom du composé	Structure chimique	Organes
Acides Hydroxybenzoïques	Acide Ellagique		Jus - fleurs - feuilles
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoïdes)	Acide Chlorogénique		Jus – feuilles
Flavan-3-ols	Catechine		Jus – feuilles
Flavonols	Quercétine		Jus – feuilles
Flavonols	Kaempferol		Feuilles
Flavonol glycoside	Rutine		Jus – feuilles
Flavones	Luteoline		Feuilles

Flavones	Apigénine		Feuilles
Anthocyanidines	Cyanidin 3-Oglucoside		Jus
Ellagitannins	Punicalagin		Ecorce de l'arbre, écorce des racines et des feuilles

➤ **Les alcaloïdes:**

Dans cette plante les alcaloïdes sont identifiés principalement dans les racines et les plus importants sont: pelletiérine, pipéridine, pyrrolidine et ses dérivés. D'ailleurs, il existe d'autres alcaloïdes tels le Méthylpelletiérine et le Pseudopelletiérine qui se trouvent dans l'écorce du grenade (Wald, 2009).

➤ **Les acides gras:**

Les acides gras sont localisés essentiellement dans les graines et surtout les acides gras insaturés (environ 80%); représentés principalement par l'acide punicoïque qui est un acide gras très rare, acide cis-9, trans-11, cis-15, octadécatriénoïque et les acides oléiques et linoléiques. Ainsi que les composés mineurs tel que l'acide α -éléostéarique, l'acide catalpique et l'acide β -éléostéarique (Hachimi et al., 2015). Les acides gras saturés sont présentés par les acides palmitiques et stéariques (Wald, 2009).

➤ **Les stérols:**

Ils sont représentés particulièrement par les hormones stéroïdiennes (la 17α -oestradiol, l'oestrone, l'oestriol et la testostérone) qui se trouve dans les graines de grenade (Kim et al., 2002).

➤ **Les terpènes:**

Les terpènes sont représentés dans le grenadier par les triterpènes principalement l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'acide maslinique et encore l'acide asiatic qui existe dans les fleurs du grenadier (Spilmont, 2015).

➤ Les tocophérols:

Les tocophérols sont très utilisés pour leurs propriétés antioxydantes, surtout la vitamine E qui est le principal antioxydant qui protège les structures membranaires des cellules contre l'effet des structures des radicaux libres. En effet, α -tocophérol est le composé principal qui existe dans l'huile des graines de grenade, comme montré sur la Figure (kim et al., 2002).

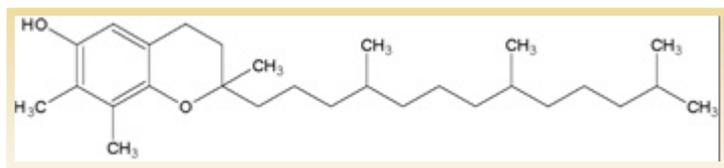


Figure 2: Formule chimique de α -tocopherol.

1.8. Propriétés thérapeutiques de *Punica Granatum*.

Toutes les parties de la plante du grenadier possèdent des effets médicaux bénéfiques grâce à leurs compositions chimiques riches. Cette plante est très utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies diverses telle que les agents antiparasitaires, un «tonique sanguin», les aphtes, les diarrhées et les ulcères. Ajoutant aussi, un grand effet contre les maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer.

- **Activité antioxydante:**

La plante de grenadier est une source des plusieurs molécules antioxydantes; les ellagitannins, la vitamine E et galactomannane, qui sont capable de neutraliser les radicaux libres et inhiber la peroxydation lipidique (Wald, 2009).

- **Activité anti-inflammatoire:**

L'huile de graines pressées du grenade inhibe la production des enzymes cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase; La cyclo-oxygénase enzyme principal dans la réactions du conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, la lipo-oxygénase qui catalyse la transformation de l'acide arachidonique en leukotriènes, les deux réactions sont des médiateurs importants de l'inflammation (Ben Abdennebi, 2012).

- **Activité anticarcinogénique:**

L'utilisation des extraits de différentes parties du grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent le développement de la tumeur, par la modulation des protéines responsables de l'apoptose (Khwairakpam et al., 2018) et ensuite inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses.

- **Activité antidiabétique:**

Le jus concentré de grenade agit sur le cholestérol qui est un facteur responsable du diabète en diminuant l'absorption et en augmentant l'excrétion fécale du cholestérol et réduit ainsi significativement le taux total de cholestérol (Ben Abdennebi, 2012).

- **Activité anti cardiovasculaire:**

Le grenade est capable d'agir sur les facteurs responsables des maladies cardiovasculaires; inhibe l'oxydation des lipoprotéines de basses densités, limite la formation des macrophages spumeux, borne l'apparition des lésions athérosclérotiques et régule la pression artérielle du fait de sa composition qui est riche en polyphénols et en vitamine C (Sahebkar et al., 2017).

- **Action antiviraux et antimicrobiens:**

Le grenadier a des effets antiviraux grâce à sa richesse en polyphénols qui sont capables d'empêcher la formation de la liaison du virus HIV-1 avec certains récepteurs cellulaires (Hmid, 2014) comme elle dispose des effets antimicrobiens en faveur des extraits tels que: les tanins, les alcaloïdes et les stérols qui inhibent la croissance bactérienne (Hmid, 2014), comme la bactérie *Staphylococcus aureus* qui est résistante aux antibiotiques (Braga et al., 2005) et la bactérie *salmonella* présente dans les viandes et de les volailles (Ben Ajmia et al., 2017).

2. Les composés phénoliques

2.1. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances naturelles, d'origine végétale majoritairement. Ils peuvent se trouver chez certains animaux et microorganismes comme les bactéries et les champignons tels que l'œstradiol qui est l'hormone la plus importante de type œstrogène chez les mammifères. Ils sont constitués d'une unité principale « phénol » donc se sont de mono, bi ou polyphénol (Macheix et al., 2005). Actuellement les rôles des composés phénoliques différent et comprennent plusieurs effets telles que l'aspect physiologique de la plante, la communication de la

plante avec l'environnement et dans la qualité des produits consommés par l'homme (la couleur et l'arôme...) (Amiot et al., 1989). Ces substances possèdent des effets bénéfiques sur la santé humaine, par leurs activités qui ont une aptitude antioxydants naturels pour provoquer une certaine prévention et traitement contre le cancer et le vieillissement cellulaire, un effet contre des maladies cardiovasculaires. En plus ces composés sont utilisés comme additif dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Chira et al., 2008).

2.2. Classification des composés phénoliques

Le classement des composés phénoliques est illustré sur la Figure 3. Les plus importants sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins.

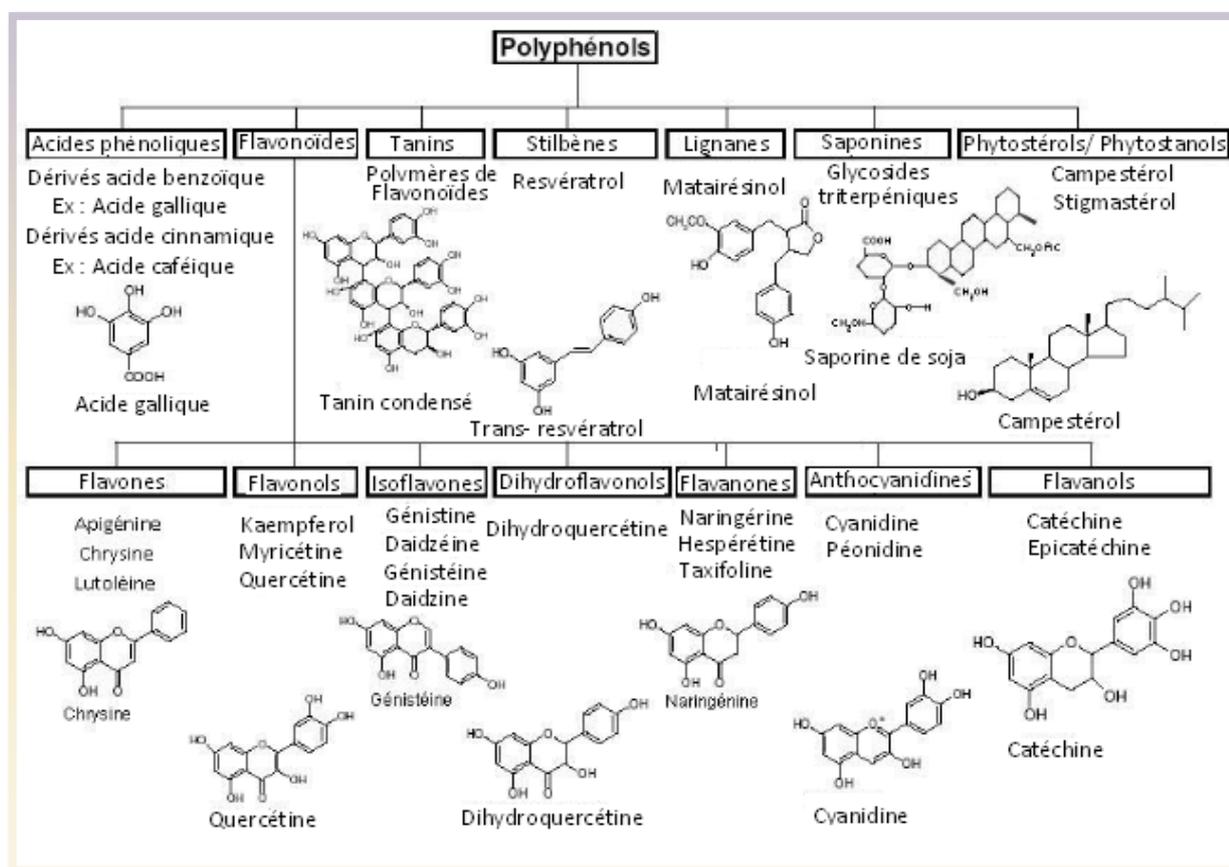


Figure 3: Principales classes des composés phénoliques.

2.2.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les composés les plus simples de cette famille chimique et sont divisés en deux groupes: le premier est un dérivé de l'acide benzoïque (C₆-C₁) tel que l'acide gallique ou vanillique et le second groupe dérive de l'acide cinnamique (C₆-C₃) comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces substances sont connues par leurs pouvoirs

antioxydants pouvant contribuer à prévenir le corps de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires...) (Khan, 2010).

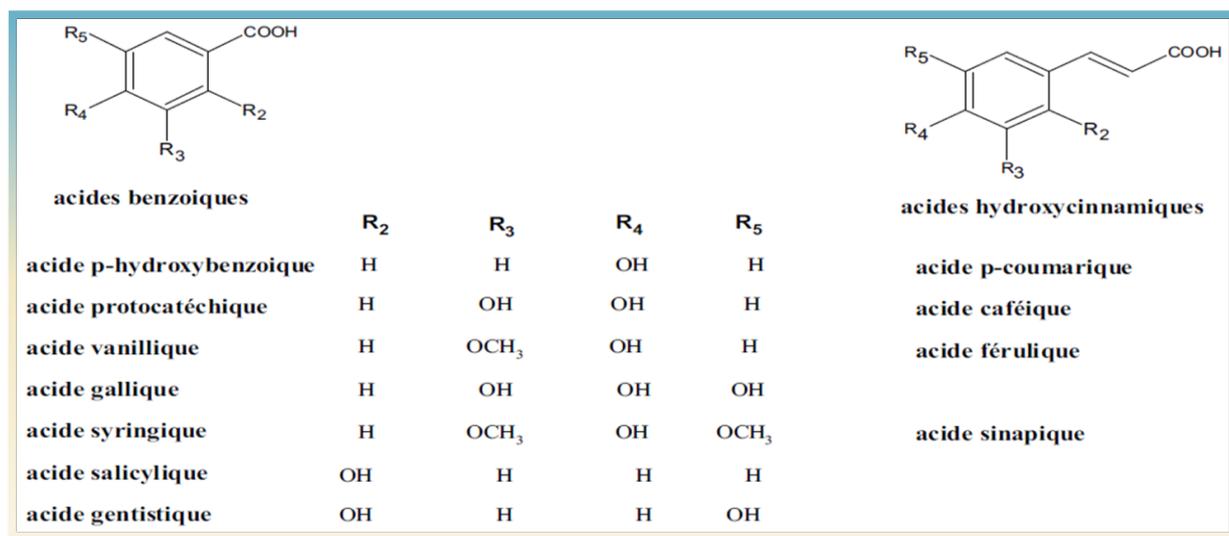


Figure 4: Exemples des acides phénols.

2.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentées sur la Figure 5 forment la classe la plus grande et la plus variée des composés phénoliques. Plusieurs milliers de molécules ont été découvertes à ce jour qui sont constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane et a pour formule: C₆-C₃-C₆ (Achat, 2014).

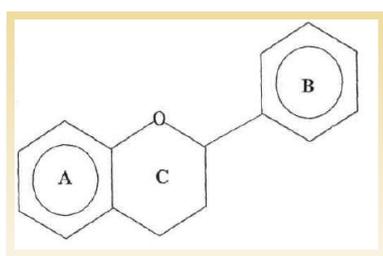


Figure 5: Noyau de base des flavonoïdes.

La classe des flavonoïdes peut se diviser en six sous-classes qui diffèrent par leurs structures chimiques et par leur degré d'hydroxylation: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Aoun, 2011). Ces substances sont des anti-inflammatoires qui assurent une bonne circulation sanguine (Medjdoub, 2012).

2.2.3. Tanins

Les tanins sont des composés organiques complexes qui résultent de la condensation ou de l'estérification des polyphénols. Les tanins se trouvent dans les vacuoles (Achat, 2013), et se caractérisent par leur capacité de former des liaisons stables avec les protéines. Ces substances sont des forts antioxydants ont une aptitude à éliminer l'effet néfaste des radicaux libres grâce à leur structure chimique convenable, constituée de plusieurs groupements hydroxyle (Bouguern, 2012) (Figure 6). Ils sont divisés en deux groupes chimiques, les tanins condensés et les tanins hydrolysables.

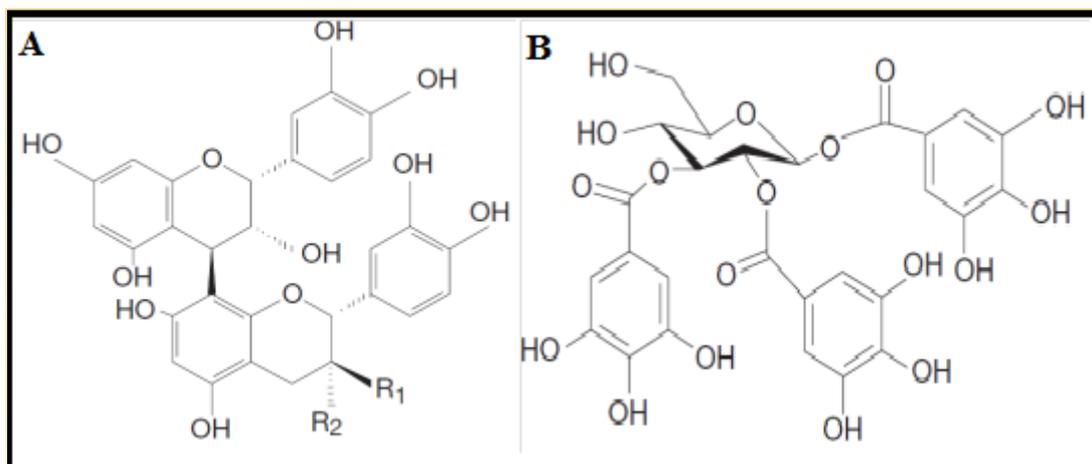


Figure 6: Exemple des tanins: A: tanins condensés, B: tanins hydrolysables.

2.4. Espèces radicalaires et le stress oxydatif

2.4.1. Généralités

L'oxygène est une épée à double tranchant. D'une part, sans l'oxygène, il n'y a pas de vie et permet ainsi de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Cependant, nos cellules transforment une faible partie d'O₂ en substances potentiellement toxiques. Les espèces réactives de l'oxygène «ERO» possèdent un électron célibataire sur la couche périphérique de l'atome d'oxygène. Les radicaux libres sont produits naturellement par le corps mais il y a d'autres facteurs qui peuvent augmenter cette production tels que : la pollution, la radiation, la cigarette, le stress, le xénobiotique. Cette augmentation peut produire un déséquilibre appelé stress oxydatif entre les radicaux libres et le système antioxydant d'un organisme. Par ailleurs les radicaux libres sont des substances instables et cherchent à se stabiliser. Cette stabilisation peut infecter plusieurs composés de cellules et par conséquent conduit à une mutation dans l'ADN, destruction des protéines, changement de l'enchaînement dans les hydrates de carbones et peroxydation des lipides (Cesari, 2017).

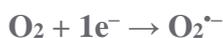
2.4.2. Type des espèces radicalaires et leur mécanisme de formation

Les substances actives sont classées en trois types selon les atomes qu'elles constituent. Le tableau 2 résume cette classification.

Tableau 2: Principaux types des substances actives avec quelques exemples de chaque type.

Espèces radicalaires oxygénés (Achat, 2014)	Espèces radicalaires Azotés (Bernard, 2012)	Espèces radicalaires Soufrés (Bouguerne, 2012)
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Monoxyde d'azote (NO^{\cdot})	Radical thiyle (GS^{\cdot})
Radical hydroxyl (OH^{\cdot})	Peroxynitrite ($ONOO^-$)	Disulfure ($GSSG^{\cdot-}$)
Radicaux oxyl (RO^{\cdot})	(NO_2^{\cdot})	
Radicaux peroxy (ROO^{\cdot})		
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)		
Dioxygène singulet ($1O_2$)		
Acide hypochloreux ($HOCl$)		
Ozone (O_3)		
$CO_3^{\cdot-}$		

Au niveau des mitochondries, la production des ERO est une conséquence du métabolisme aérobie au cours du processus de la respiration mitochondriale. Une partie d' O_2 se transforme en superoxyde par la réduction monoélectrique au niveau du transporteur d'électron ubiquinone (coenzyme Q) ou les cofacteurs flavine (Koechlin-Ramonatxo, 2006), selon la réaction :



Aussi d'après la réaction spontanée ou catalysée par le superoxyde dismutase, $O_2^{\cdot-}$ peut se dismuter en H_2O_2 et O_2 ou réagir avec NO^{\cdot} pour former $ONOO^-$. Les radicaux libres oxygénés peuvent aussi être produits à l'extérieur des mitochondries lors des réactions des métabolismes ou lors les différents stress au niveau de peroxysomes sous action des oxydases en produisant H_2O_2 et au niveau de réticulum endoplasmique en produisant le $O_2^{\cdot-}$ (Martein, 2008).

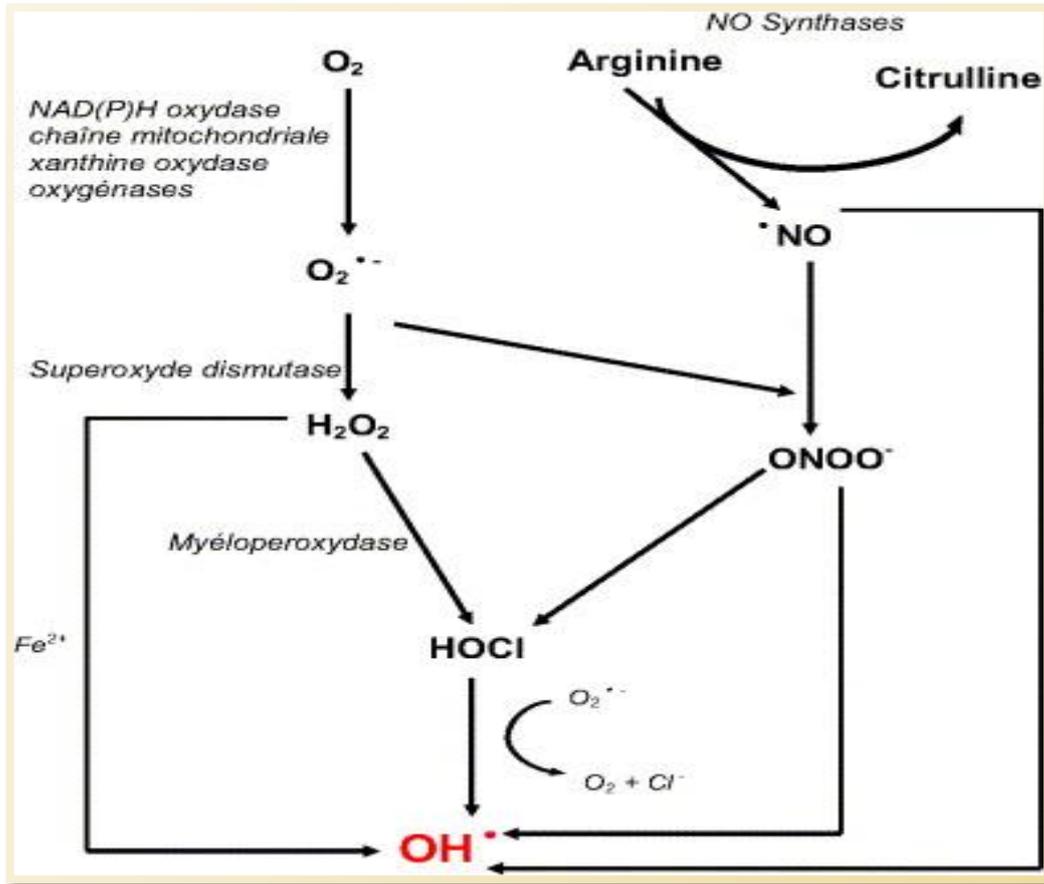


Figure 7: Processus de formation des radicaux libres.

2.4.3. Pouvoir antioxydant

L'organisme a une disposition limitée pour borner les dégâts dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques, ou l'intervention des antioxydants. Ces derniers sont soit produits par le corps humain, soit apportés par alimentation.

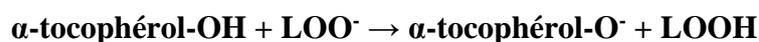
Systèmes antioxydants endogènes :

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes, composés de nombreux thiols spécialement le glutathion qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, IO₂, ONOO•, l'acide lipoïque capable de piéger les HO•, RO₂•, l'HOCl et l'IO₂ *in vitro* et également l'acide urique qui possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les HO• et RO₂• (Bernard, 2012).

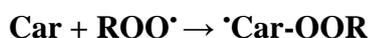
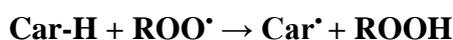
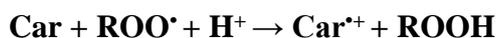
Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes comprennent principalement les vitamines A, C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques.

- **Vitamine A** : connue pour son action protectrice contre peroxydations lipidiques (Chalour, 2012).
- **Vitamine C** : qui est l'acide ascorbique hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes. Elle protège les cellules contre l'oxydation membranaire. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AsC^{H-}) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AsC^{H•}), stabilisé par résonance (Jhaleng et al., 2007).
- **Vitamine E**: un antioxydant très fort qui protège les structures membranaires et les lipoprotéines. L'alpha-tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E qui agit en neutralisant les radicaux libres (Boubekiri, 2014), selon la réaction suivante;



- **Les caroténoïdes**: sont aussi les pro-vitamines A de la famille des carotènes d'unités de bases isoprènes. Ces composés peuvent réagir sur plusieurs espèces radicalaires en même temps tels que: ROO[•], HO[•], O₂^{•-}, R[•] par une simple addition électrophile et transfert d'électron grâce à sa chaîne qui est longue et polyénique (Salem, 2009), selon les réactions suivantes:



- **Les composés phénoliques**: en particulier les flavonoïdes qui ont une aptitude antioxydante et réside dans la capacité de donner des électrons et des protons pour neutraliser les radicaux, ainsi que dans l'aptitude de chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Bernard, 2012).

Chapitre II.

Matériel et méthodes

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans les industries : alimentaire, cosmétique et médicale. Notre choix de la plante *punica granatum* à été basé sur des études ethnobotanique réalisé par des différents chercheurs, et qui ont révélé une large utilisation de cette plante par les peuples dans le traitement des maladies.

1. Matériel

1.1. La plante étudiée

Notre travail porte sur l'étude de la composition chimique et sur l'activité antioxydante de l'écorce de fruit de grenadier.

L'écorce du fruit de grenade présentée sur la figure 8 est séchée à l'ombre dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum de molécules, puis broyées. La poudre obtenue est conservée à l'abri de la lumière.



Figure 8: Ecorce de grenade sécher.

1.2. Réactifs et matériels.

balance analytique	Anhydre acétique
Rota vapeur	Chloroforme
Soxhlet	Acide sulfurique
spectrophotomètre UV	Acide chlorhydrique
Hexane	Butanol
Carbonate de sodium	Ethanol
Réactif de follin ciocalteau	Acétate de sodium
DPPH	Acide gallique
Vitamine C	FeCl ₃
Méthanol	

1.3. Préparation des réactifs

- Réactif de mayer:

Dans 60ml de l'eau distillée solubiliser 1.358g d'HgCl₂, puis dans 10ml dissoudre 5g de KI, mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100ml.

- Réactif de wagner:

Dans 75ml de l'eau distillée, solubiliser 2g de KI et 1.27g d'I₂, puis ajouter 25ml de l'eau distillée.

2. Préparation des extraits

2.1. Extrait hydro éthanoïque

La préparation de l'extrait hydroalcoolique consiste à placer 20g de la poudre dans la cartouche cellulosique du montage soxhlet qui est surmonté d'un réfrigérant et 170ml de n-hexane dans le ballon relatif au montage. Le tout est porté à ébullition pendant 4h à une température de l'ordre de 65°C. Puis l'extrait lipidique est récupéré par élimination du solvant contenu dans le ballon de distillation à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide selon le principe (Feknous et al., 2014), (Virot et al., 2008). Ensuite, une deuxième extraction hydroalcoolique de la marque restante dans la cartouche est effectuée avec un mélange d'éthanol/d'eau distillé (80v/20v) pendant 4h. L'élimination de l'éthanol et de l'eau se fait aussi à l'aide du rotavapor.



Figure 9: Montage d'extraction: Soxhlet et Rotavapeur.

2.2. Infusion

Une masse «m» de la poudre est mise dans un volume V d'eau distillée bouillante est laissée infuser pendant 30min puis filtrée à l'aide d'un papier filtre.

2.3. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été faite selon la méthode modifiée de Lee et al. (1995). La poudre a été extraite par soxhlet en utilisant un mélange eau distillée/ éthanol absolu (100ml, 100ml) pendant quatre heures. L'extrait a été filtré à travers le papier filtre. La phase aqueuse a été ensuite extraite par 200ml de n-butanol, puis acidifiée par HCl à 10% au pH 3. La phase butanolique a été évaporée à sec sous pression réduite par le rotavapor à 40°C et à vitesse 4. Le résidu sec a été extrait trois fois par 200ml du mélange eau distillée/acétate d'éthyle (100ml, 100ml) pendant une heure. La phase organique a été basifiée par NaHCO₃ au pH 9. Après 15 minutes de repos la phase organique (=flavonoïdes) a été évaporée à sec à 40°C, pesée et reprise par de l'éthanol à 1% pour les tests.

3. Screening phytochimique

Il s'agit d'une étude analytique qualitative qui a pour but de rechercher les principaux groupes chimiques contenus dans les deux extraits de la plante étudiée avec des concentrations 5mg/l pour l'infusion et de 4g/100ml pour l'extrait hydroalcoolique.

3.1. Révélation des polyphénols

A 2ml de l'extrait, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est signe de la présence des polyphénols (N'Guessan et al., 2009).

3.2. Révélation des flavonoïdes

5ml de l'extrait est placé dans un tube à essai sur laquelle est ajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré, puis, 2 à 3 copeaux de magnésium. Le dégagement de chaleur puis d'une coloration rose orangé ou violacée indique la présence des flavonoïdes.

3.3. Révélation des saponines

Dans un tube à essai contenant 5ml de l'extrait a été ajouté 10ml d'eau distillée puis agité pendant 20s et laissé au repos durant 15min. l'apparition d'une mousse de hauteur supérieure à 1cm et persistante, indique la présence des saponosides (Harborne, 1998).

3.4. Révélation des stérols et des polyterpènes

Dans un tube à essai contenant 5ml de l'extrait a été ajouté 1ml d'Anhydride Acétique, 0,5ml de Chloroforme et 0,5ml d'acide sulfurique concentré sans agitation. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique la présence de stérols et de polyterpènes (Ghedadba et al., 2015).

3.5. Révélation des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont caractérisés par l'utilisation des réactifs de Mayer et de Wagner. Le principe consiste à préparer d'abord un extrait chloridrique à partir de 15mg d'extrait et de 5ml de HCl à 1% qui est chauffé pendant 5min dans un bain mari puis filtré sur papier filtre. Ensuite, le filtrat est mis dans deux tubes à essai sur lesquelles sont ajoutées quelques gouttes du réactif de Mayer dans le premier tube et quelques gouttes du réactif de Wagner dans le deuxième tube. L'apparition de précipité blanc jaunâtre (Mayer) et un précipite brun-rouge (Wagner) indique la présence d'alcaloïdes (Iqbal et al., 2015).

4. Dosages des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton et Rossi (1965) avec quelques modifications: 100µl de l'extrait est mélangé avec 500µl de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillé) et laissé au repos à température ambiante durant 5 minutes. Ensuite 750µl de la solution de Na₂CO₃ (60 g/l) a été ajouté. L'absorbance a été mesurée à 760nm après 90min d'incubation à l'abri de la lumière. Une courbe d'étalonnage standard d'acide gallique (0 à 0,2 mg/ml) a été préparée et les résultats ont été exprimés en milliéquivalents d'acide gallique par gramme l'extrait (mg/g) (Kong et al., 2012).

5. Dosages des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique (Chang et al., 2002; Stankovic, 2011) avec quelques modifications utilisant la quercétine comme étalon. Une courbe d'étalonnage de la quercétine a été préparée dans la gamme de 0-200 µg/mL. Brièvement, l'extrait (0,5 ml) et l'étalon (0,5ml) ont été placés dans différents tubes à essai et à chaque 10% de chlorure d'aluminium (0,1ml), 1M d'acétate de potassium (0,1ml), 80% de méthanol (1,5ml) et de l'eau distillée (2,8ml) ont été ajoutés et mélangés. Un blanc a été préparé de la même manière où 0,5ml d'eau distillée a été utilisé à la place de l'échantillon ou de l'étalon, et la quantité de chlorure d'aluminium a également été remplacée par de l'eau distillée. Tous les tubes ont été incubés à température ambiante pour 30min. L'absorbance a été prise à 415nm. La concentration de flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent quercétine (QE) par gramme d'extrait.

6. Dosages des flavonols

La teneur totale en flavonols a été analysée selon la méthode de (Pattanayak et al., 2011; Kalita et al., 2013) avec quelques modifications. Dans cette méthode, la quercétine a été utilisée pour établir une courbe d'étalonnage standard de 0 à 100 µg/mL. Dans différents tubes à essai, chaque extrait (1ml) et des solutions étalons (1ml) ont été placés, puis du chlorure d'aluminium à 2% (1ml), de l'acétate de sodium à 5% (3ml) et bien mélangés. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 minutes pour obtenir une solution limpide. L'absorbance de l'étalon et de l'échantillon a été prise à 440nm. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercétine (QE) par gramme d'extrait.

7. Dosages des anthocyanines

Les anthocyanines totaux ont été déterminées par la méthode de variation de pH décrite par Hosseinian et al. (2008) avec quelque modification. 0,5ml d'extrait a été ajouté à 3,5ml de tampon chlorure de potassium (0,025M) pour donner un pH=1,0. Le mélange a été agité et laisse reposer pendant 15 minutes avant la mesure de l'absorbance à 515nm et 700nm par le spectrophotomètre contre de l'eau distillée comme blanc. Pour le pH=4.5, l'extrait a été également mélangés avec un tampon d'acétate de sodium (0,025M) de la même manière qu'avec du tampon chlorure de potassium, puis l'absorbance a été mesurée aux mêmes longueurs d'onde après une période d'incubation de 15 minutes. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents de cyanidine-3-glucoside/g d'extrait par la relation suivante:

$$\text{Anthocyanine totaux} = \frac{A * MW * DF * 1000}{\epsilon * L}$$

Avec : **A (absorbance)** = ((A515-A700) pH1-(A515-A700) pH4.5).

MW= masse molaire de cyanidine 3-glucoside (449.2 g/mol).

DF= facteur dilution.

ϵ = coefficient d'extinction ($L \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)= 26 900 pour cyanidine 3-glucoside.

L = trajet optique (cm).

1000 = facteur de conversion de g à mg.

8. Activité antioxydante

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. dans des tubes à essai en introduit 750 μ l de différentes concentrations extraits (0.1 ;0.25 ;0.5 ;1 ;2 ;5) g/l et de vitamine C (0.01 ;0.1 ;0.25 ;0.5 ;1 ;2) g/l, ensuite 1.5ml de la solution de DPPH à été ajoutée, après incubation de 30min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517nm contre le blanc correspondant. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés par la relation suivante:

Pourcentage d'activité antioxydante = $[(\text{DO contrôle} - \text{DO échantillon}) / \text{DO contrôle}] \times 100$.

Chapitre III.

Résultats et discussion

1. Rendement de l'extraction

Pour l'extraction des écorces du fruit de grenadier, la méthode adoptée dans notre travail est l'extraction solide-liquide en utilisant le montage Soxhlet et le rendement de cette extraction est calculé par la formule ci-dessous.

$$R(\%) = \frac{M_{\text{extrait}}}{M_{\text{échantillon}}} * 100$$

Avec : M_{extrait} = masse de l'extrait en g.

$M_{\text{échantillon}}$ = masse de l'échantillon en g.

Les résultats des rendements obtenus pour l'extrait hydroalcoolique et pour l'extrait de flavonoïdes sont notés dans le tableau 3.

Tableau 3: Rendement d'extractions pour l'extrait hydroalcoolique et l'extrait de flavonoïdes.

	L'extrait hydroalcoolique	L'extrait de flavonoïdes
Rendement d'extraction	19.23%	0.06%

➤ L'extrait hydroalcoolique

Après évaporation à l'aide d'un Rotavapor, l'extrait obtenu est de couleur marron foncé avec une odeur forte caractéristique de la plante. Le rendement est de l'ordre de 19.23% par rapport au poids initial de la poudre de l'écorce de la grenade. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par Kanoun et al, (2014) qui ont trouvé un rendement de l'ordre de 37%. Cette différence de rendement peut être expliquée par la méthode d'extraction de la macération alcoolique.

➤ L'extrait de flavonoïdes

L'extrait obtenu après les deux extractions : d'abord solide-liquide par Soxhlet puis liquide-liquide par décantation est de couleur marron avec un rendement de 0.06%.

2. Tests phytochimiques

Le criblage phytochimique nous permet de mettre en évidence la présence ou l'absence des différentes familles chimiques dans la plante, par des réactions qui induisent des changements de couleur ou la formation des précipités lorsqu'on ajoute des réactifs spécifiques. Les résultats de ces tests sont rassemblés dans le tableau 4.

Tableau 4: Criblage phytochimique de l'écorce de fruits.

Groupes phytochimiques	IPG	EPG
Polyphénols	+++	+++
Flavonoïdes	++	++
Saponosides	-	-
stérols et polyterpènes	+	+
Alcaloïdes	-	-

+++ : Très abondant. ++ : Abondant. + : Moyen. - : Absence.

D'après le tableau précédent, les résultats des tests phytochimiques montrent que les écorces de fruits de la plante *Punica granatum* est très riche en polyphénols et en flavonoïdes. Ils contiennent aussi des traces des stérols et polyterpènes alors que sont dépourvus des saponines et des alcaloïdes. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Bhandary et al, (2012).

3. Dosage des polyphénols totaux

Afin de déterminer la quantité des polyphénols totaux dans la plante étudiée, une gamme d'étalonnage a été élaborée par une solution standard de l'acide gallique à des concentrations différentes. L'équation de courbe d'étalonnage (Figure 10) est de:

$$y = 0,015 x + 0,092$$

Avec un coefficient de corrélation R² égal à 0,968.

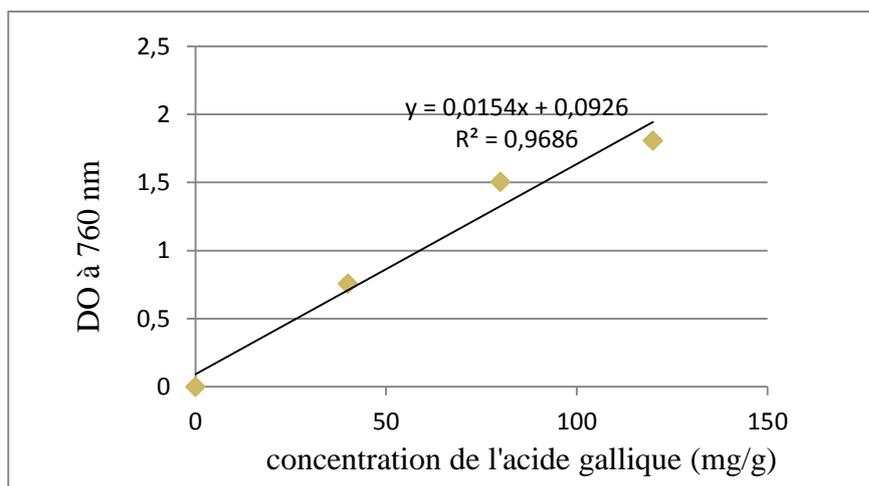


Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

L'analyse quantitative des composés phénoliques pour les deux extraits a été faite par spectrophotomètre, afin de déterminer les teneurs des polyphénols selon la méthode de Folin-

Ciocalteu. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 5 et sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique par g d'extrait (mg A.G/g de l'extrait).

Tableau 5: Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de l'écorce.

Extrait	mg A.G/g de l'extrait
IPG	112,3
EPG	110,94

D'après le tableau 5, on remarque que la plante est riche par des composés phénoliques, les deux extraits de l'IPG et de l'EPG révèlent des teneurs presque identiques de l'ordre de 112.3 et 110.94 mg A.G/g pour IPG et EPG respectivement. En effet, nos résultats sont en accord avec des recherches faites par Mansour et al, (2013) qui ont trouvé des teneurs entre 230.4 ± 0.6 mg A.G/g et 40.8 ± 0.2 mg A.G/g pour les variétés tunisiennes. Cette différence des teneurs est du probablement à l'origine des écorces des grenades extraits.

4. Dosage des flavonoïdes

Pour déterminer la teneur de ces composés, un étalonnage a été préparé par le quercétine (Figure 11) et le tableau 6 montres les résultats obtenus.

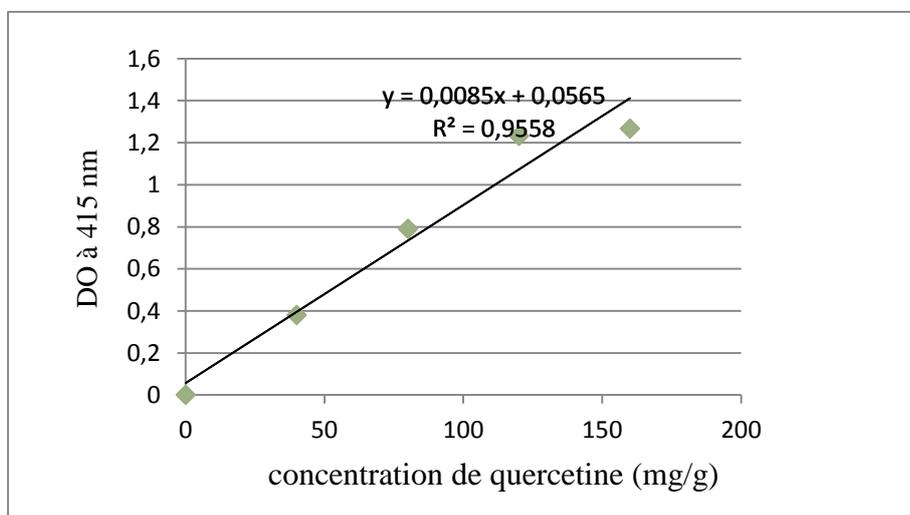


Figure 11: Courbe d'étalonnage de quercétine.

Tableau 6: Teneur en flavonoïdes dans la partie étudiée de *Punica Granatum*.

Extrait	QE/g de l'extrait
EPG	$32,24 \pm 1.41$
IPG	$32,76 \pm 0.33$

Les résultats illustrés sur le tableau 6 montre que la plante possède une teneur importante en flavonoïdes pour les deux extraits préparés de IPG et du EPG qui donne des valeurs de l'ordre de 32,76 et 32.24 mg A.G Q.E/g respectivement. En effet, nos résultats sont en accord avec ceux de Noureddine, (2010) qui a trouvé une teneur en flavonoïdes comprise entre 64,40 et 509.44 mg EAG/g de MS.

5. Dosage des flavonols

Dans le but de déterminer la teneur en flavonols dans l'écorce de fruit de la plante *punica granatum*, une courbe d'étalonnage de quercétine représentée sur la figure 12 avec des modifications par rapport aux flavonoides a été adoptée. La quantité des flavonols a été exprimée par masse du quercétine en mg par un gramme d'extrait (mg QE/g de l'extrait). Les résultats sont représentés dans le tableau 7.

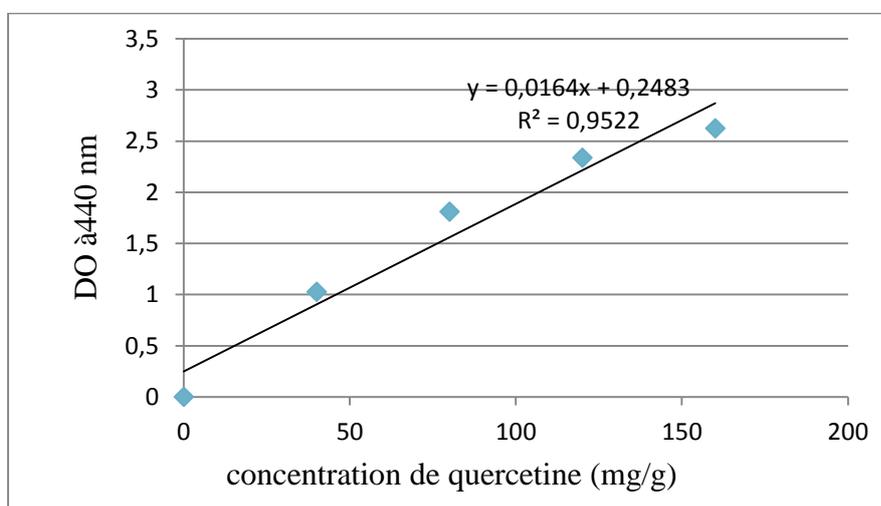


Figure 12: Courbe d'étalonnage de quercétine.

Tableau 7: Teneur en flavonols dans l'écorce du fruit de la plante étudié.

extrait	mg QE/g de l'extrait
EPG	4,98±0.60
IPG	6,93±0.086

Comme le montre le tableau 7, la partie étudiée de la plante contient des flavonols, et surtout dans l'infusion qui présente une teneur de 6,93 mg/g. alors que l'extrait hydroalcoolique contient une teneur de 4,98 mg/g, cela confirme que l'infusion est une bonne méthode d'extraction des flavonols. Nos résultats sont en accord avec les recherches faites par Tehranifar et al, (2010) qui ont trouvé les valeurs entre 5,62 mg/g et 30,11 mg/g pour les variétés iraniennes.

6. dosage des anthocyanines

Les anthocyanes sont des composés phénoliques donnent la couleur aux plantes, ainsi possèdent un éventail d'avantages pour la santé. Leurs dosage a été effectué par utilisation de la méthode de la variation de pH, et les résultats sont représentés dans le tableau 8.

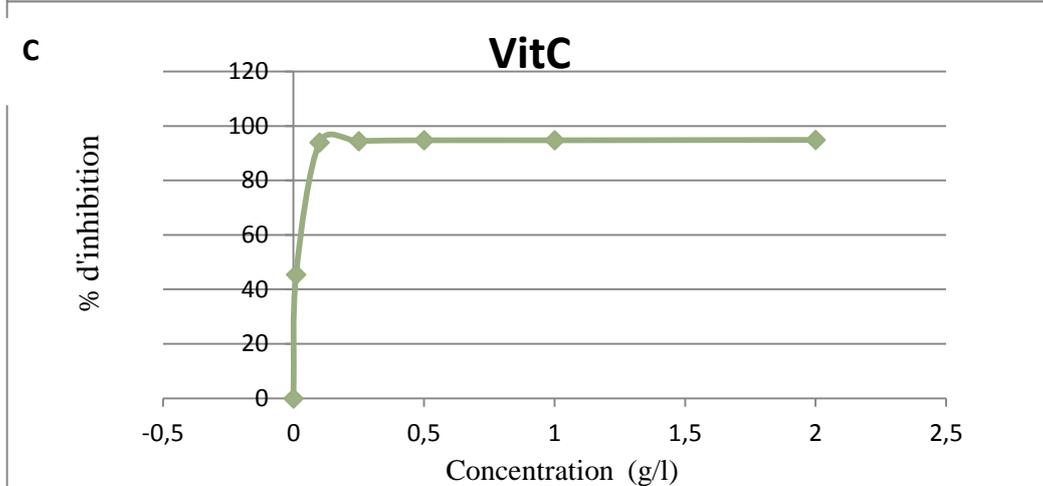
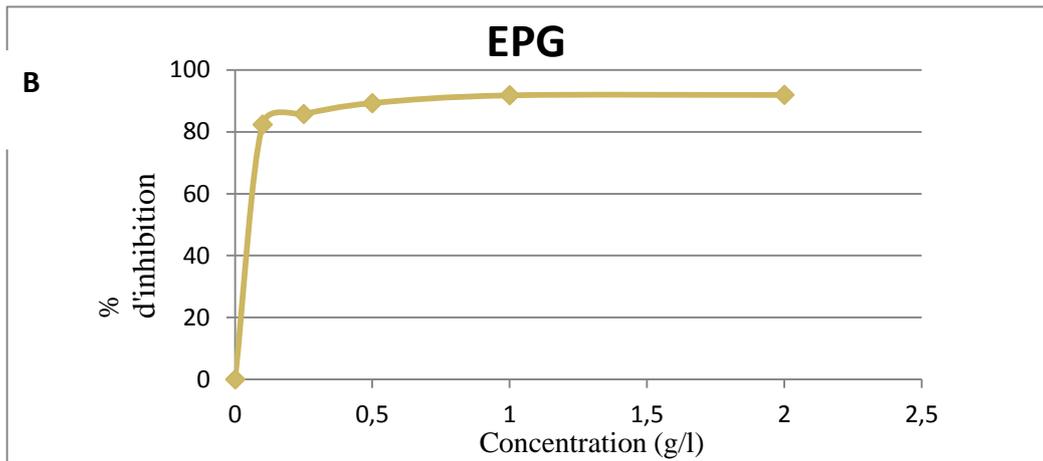
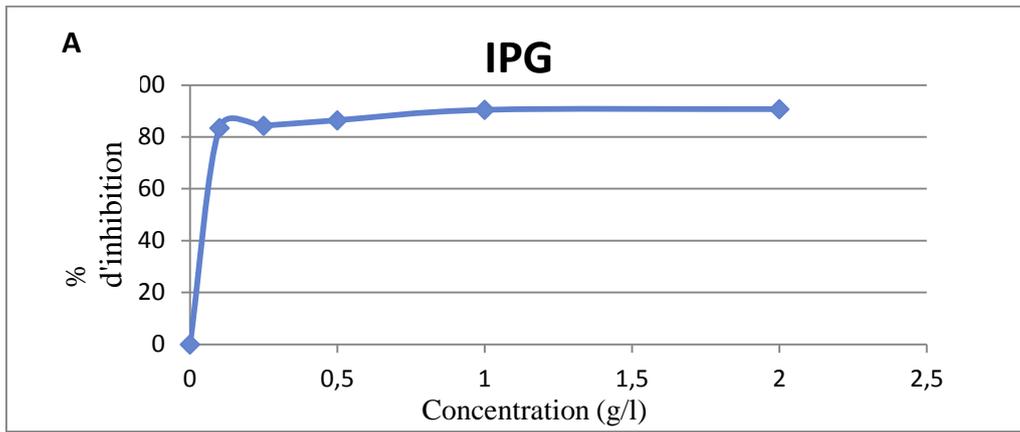
Tableau 8: Teneur en anthocyanes dans la partie étudiée de grenadier.

Extrait	c-3-g E/g d'extrait
EPG	0.46±0.094
IPG	0.67±0.19

On remarque d'après le tableau 8 que l'écorce contient les anthocyanes avec des teneurs moyennes. Ces résultats ont été comparés avec les teneurs de ces substances dans les racines des légumes rouges et noirs (contient la plus grande quantité des anthocyanes) et qui ont une valeur d'environ 20 mg/g (Sava et al., 2006).

7. Pouvoir antioxydant par DPPH

Les antioxydants sont des substances utilisées d'une part pour piéger les radicaux libres du corps humain afin de limiter la probabilité de l'infection par plusieurs maladies; et d'autre part, dans la sécurité alimentaire des aliments contenant des composés lipidiques. Pour cela plusieurs recherches ont été faites pour trouver des substances antioxydantes (Bouhdid et al., 2006). Le potentiel antiradicalaire peut être testé à l'aide de différentes méthodes analytiques. Parmi ces méthodes le DPPH : en utilisant le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH^{*} (est un radical libre stable, grâce à la délocalisation électronique d'un électron non apparié sur la molécule entière de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm). Cette méthode est utilisée principalement pour les composés contenant des phénols, et par manque de mesures absolues de cette capacité qui nous permet de déterminer la signification des extraits, nous avons réalisé une comparaison avec un antioxydant très fort qui est la vitamine C et les résultats obtenus sont représentés dans les figures 13.



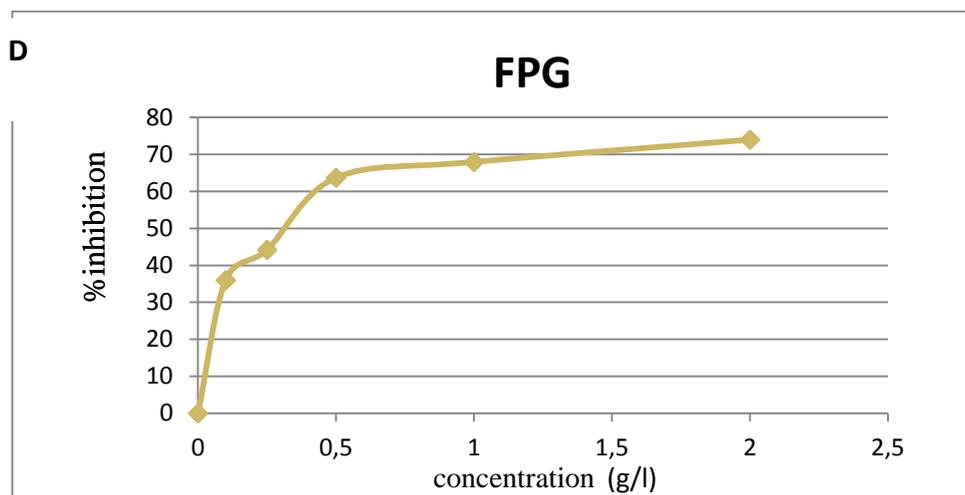


Figure 13: Variation du pouvoir antioxydant en fonction de la concentration du: (A) l'infusion, (B) extrait hydroalcoolique et (C) référence (vitamine C), (D) flavonoïdes.

D'après la Figure 14, on remarque que les courbes ont même allure et qui implique la même interprétation. Plus on augmente la concentration, plus l'activité antiradicalaire augmente jusqu'à atteindre un palier. Au-delà de ce maximum, l'activité reste constante. Nous interprétons ce phénomène par le transfert des électrons célibataires qui sont localisés dans l'orbitale externe du DPPH. Après avoir atteint une concentration donnée, l'antioxydant va réagir complètement avec le radical et quand nous augmentons la concentration, l'activité antioxydante reste constante puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical. On constate que l'écorce de fruit de la plante *punica granatum* possède une forte activité antioxydante, et capable de piéger le radical DPPH*. Les valeurs d'inhibition sont de l'ordre de 73,98%, 90,73% et 91,9% pour les flavonoïdes, l'infusion et l'extrait hydroalcoolique respectivement. Ces dernières sont proches de celle de vitamine C qui a une valeur de 94,88 %. Ces résultats sont confirmés par des recherches de (Lairini et al., 2014), qui ont montré que l'écorce de fruit a un effet antiradicalaire important de l'ordre de 87,43%.

Confrontant aux résultats précédents, la grande capacité réduit le DPPH* par les extraits de l'écorce est relié à leurs teneurs élevés en polyphénols (fort antioxydant naturelle). Et pour limiter la toxicité des ces dernières, on a déterminé la valeur IC_{50} ; qui présente la concentration de l'antioxydant nécessaire pour inhiber 50% de DPPH*. Les valeurs de IC_{50} sont de 0.06 g/l, 0.09 g/l, 0.1 g/l et 0.33 g/l pour la vitamine C, l'infusion, l'extrait hydroalcoolique et les flavonoïdes respectivement.

Conclusion

Les plantes médicinales jouent un rôle majeur dans la vie humaine. Elles sont les principales sources d'alimentation d'une part et d'autre part, ces plantes sont largement utilisées dans le traitement et la prévention des maladies, surtout dans les pays en voie de développement.

L'identification par les méthodes phytochimiques confirment la richesse de l'écorce de la plante en polyphénols. Et les analyses qualitatives révèlent des teneurs élevées en polyphénols totaux dans les extraits de la plante, avec la présence des teneurs considérables en flavonoïdes, flavonols et anthocyanines. Toutes ces substances sont des forts pouvoirs antioxydants. Cela reflète une grande aptitude de neutraliser les radicaux libres par ces extraits.

D'autre part, pour obtenir des meilleurs résultats, il est nécessaire d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs comme l'extraction au CO₂ supercritique qui est actuellement le moyen le plus écologique et technologique pour obtenir des principes actifs végétaux de très haute qualité et pour identifier leur présence par des techniques précises comme Chromatographie à phase Gazeuse «GC» ou GC- couplée à Spectrométrie de Masse «GC-MS» et résonance magnétique nucléaire «RMN».