



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé :

**Valorisation des Produits Forestiers de la Région de
Constantine : *Punica granatum L.***

Présenté et soutenu par : *CHEHBOUB Amina*
CHAOUI Zoubeida

Le : 27/06/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MAAMMERI Zineb* (MCA - UFM Constantine1).

Rapporteur : *MOUAS T. Nardjes* (MCA - UFM Constantine1).

Examineurs : *DJEDOUANI Amelle* (Pr- ENS Constantine3).

*Année universitaire
2018 - 2019*



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé :

Valorisation des Produits Forestiers de la Région de Constantine : *Punica granatum L.*

Présenté et soutenu par : *CHEHBOUB Amina*
CHAOUI Zoubeida

Le : 27/06/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MAAMMERI Zineb* (MCA - UFM Constantine1).

Rapporteur : *MOUAS T. Nardjes* (MCA - UFM Constantine1).

Examineurs : *DJEDOUANI Amelle* (Pr- ENS Constantine3).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et notre gratitude envers tous ceux qui nous ont soutenu et encouragé tout au long de cette traversée du désert et nous ont permis de redoubler d'effort et de persévérance.

Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice le Docteur MOUAS Toma Nardjes, Maitre de Conférences « A », Université Frères Mentouri Constantine1, pour avoir accepté de nous encadrer, pour la confiance qu'elle nous a accordé, et les conseils prodigués tout au long de la réalisation de ce modeste travail. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et l'expression de notre vive reconnaissance.

Nos profonds remerciements au Docteur Benssuici Chawki, MCB, notre directeur de stage au laboratoire 02 de Biochimie, Centre National de Recherche en Biotechnologie «CRBt », de nous avoir accueillis dans son équipe, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses qualités humaines qui nous ont profondément touchés.

Nous remercions le Pr. NECIB YUCEF, Chef du Département de Biochimie et Bio Mol Cel, Université Frères Mentouri Constantine 1, de nous avoir acceptées parmi ses étudiants en Master de Biochimie.

Nos vifs remerciements pour le Président et Membres du jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.

Que Docteur SELLAM Feriel, Maitre de recherche « B » au CRBt Constantine, trouve ici nos vifs remerciements aussi pour son aide, ses précieux conseils et ses encouragements.

Sans oublier tous les membres du CRBt, spécialement ceux du laboratoire 02 de Biochimie pour leur disponibilité, leur sympathie et leur gentillesse.

Dédicace

*Avec l'aide d'ALLAH♥ ; le tout puissant ; ce travail
est achevé ; Je le dédie...*

*À mes chers parents qui m'ont aidé à être ce que je suis ; avec
tant d'amour et d'affection.*

*À ma chère sœur et mon cher frère ; pour leur aide
et leur soutien moral.*

*À toutes mes amies ;
et à tous ceux qui me sont chers...*

À moi-même

Amina ♥

Dédicace

*Nous remercions ALLATT♥ qui nous a aidé et nous a
donné la patience et le courage d'entamer et terminer ce mémoire.*

Je dédie ce travail...

*À mes chers parents ; qui m'ont tout donné sans rien attendre en
retour.*

*À toute ma famille ; toutes mes sœurs;
et tous ceux qui me sont chers*

À moi-même

Lina ♥

Dicton

Autrefois, les conteurs orientaux posaient des devinettes au cours des soirées au clair de lune.

Le conteur s'écriait : « Je ne suis ni roi, ni reine, je porte la couronne, qui suis-je ? »

Et devant le silence perplexe de l'assistance, il tonitruait :

« C'est la grenade ! »

Table des matières

Titre	
Remerciement	
Dédicace.....	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : La grenade, le fruit de *Punica granatum* L.

I. 1. Le grenadier dans le règne végétal	3
I. 1. 1. Description morphologique	3
I. 1. 2. Classification systématique.....	5
I. 2. Origine géographique et aire de répartition du grenadier.....	6
I. 2. 1. Origine	6
I. 2. 2. Aire de répartition géographique.....	6
I. 3. Culture du grenadier	9
I. 4. Exigences de milieu	9
I. 5. La production mondiale de grenade	11
I. 6. Valeur nutritionnelle et composition de différentes parties de grenade.....	12
I. 6. 1. Valeurs nutritionnelles de la grenade	12

I. 6. 2. Composition biochimique et phytochimique de la grenade	13
A. Composition en métabolites primaires et substances organiques	14
B. Composition en métabolites secondaires.....	16
I. 7. Usage empirique et traditionnel du grenadier	20
I. 7. 1. Usage traditionnel	21
I. 7. 2. Usages courants	22

CHAPITRE II: Propriétés pharmacologiques et travaux antérieurs sur

Punica Granatum L.

II. 1. Activité antioxydante.....	25
II. 2. Action neuroprotectrice ou anti-alzheimer	25
II. 3. Action anti-hyperglycémique ou antidiabétique	26
II. 4. Véritable anti-inflammatoire naturel	26
II. 5. Activité anticancéreuse	27
II. 6. Effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires	27
II. 7. Principes des activités réalisées <i>in vitro</i>	27
II. 7. 1. Quantification des composés phénoliques de la grenade	27
II. 7. 2. Activités biologiques de la grenade.....	29
1. Activité antioxydante	29
2. Activité enzymatique.....	33

Partie Expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I. 1. Matériel d'étude	36
I. 2. Méthodes d'études	37
I. 2. 1. Préparation du matériel végétal	37
I. 2. 2. Analyses phytochimiques.....	37
I. 3. Etude quantitative des composés phénoliques	40
1. 3. 1. Dosage des polyphénols totaux TPC (Total Phenolic Content)	40
1. 3. 2. Dosage des Flavonoïdes Totaux, TFC (Total Flavonoid Content)	41
I. 4. Etudes <i>in vitro</i> et évaluations biologiques	43
I. 4. 1. Etude de l'activité antioxydante	45
1. Etude de l'effet scavenger contre le radical DPPH	45
2. Activité du piégeage de l'ABTS	47
3. Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)	48
4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	49
5. Test du pouvoir réducteur du fer (reducing power)	51
6. Activité de Phenanthroline	53
I. 4. 2. Etude de l'activité enzymatique	54
1. Activité anti-Alzheimer ou Anti-cholinestérase (AChE)	54
2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase	56
3. Activité inhibitrice de la tyrosinase.....	58

CHAPITRE II : Résultats et discussion

II. 1. Analyse quantitative.....	61
II. 1. 1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux	61
II. 2. Evaluation des activites biologiques	65
II. 2. 1. Étude de l'activité antioxydante.....	65
1. Le teste DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	65
2. Le test du piégeage du radical ABTS.....	68
3. Test de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR).....	71
4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	73
5. Test du pouvoir réducteur du fer (reducing power)	75
6. Activité de Phenanthroline	78
II. 2. 2. Evaluation de l'activité enzymatique	80
1. Activité anti-Alzheimer ou anti cholinestérase AChE	80
2. Activité inhibitrice de la tyrosinase.....	81
3. Activité antidiabétique (activité inhibitrice de l' α -glucosidase)	81
II. 3. Relation structure - activité « RSA »	85
Conclusion générale.....	96
Références bibliographiques.....	98
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Description morphologique du grenadier.	4
2	Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie.	9
3	Les exigences écologiques du grenadier.	10
4	valeur nutritive de la portion comestible de grenade.	13
5	Composition en macro/ micronutriments des graines de <i>punica granatum L.</i>	14
6	Différents composants organiques de jus de grenade.	16
7	Différents composés phytochimiques constituant le fruit de grenade.	18
8	Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des trois extraits de grenade.	62
9	Inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes parties du fruit de <i>Punica granatum L.</i> en fonction de leurs concentrations.	65
10	Activité anti-radicalaire de l'ABTS par les extraits de fruit de <i>Punica granatum L.</i>	68
11	Activité anti-radicalaire de Gor par les extraits de fruit de <i>Punica granatum L.</i>	71
12	Réduction du cuivre par les trois extraits du fruit de <i>Punica granatum L.</i>	73
13	Absorbance de l'activité du pouvoir réducteur par les extraits de grenade.	76

14	Absorbances des extraits de grenade par l'activité de phenanthroline.	78
15	Inhibition de l' α -glucosidase par les différents extraits de grenades.	82

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Le grenadier.	4
2	Position de <i>Punica granatum</i> L. selon la classification APGII.	5
3	Centres d'origines et de diversité des arbres grenadiers cultivées selon le chercheur Vavilov.	7
4	Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne.	8
5	Les plus grands pays producteurs de grenades au monde.	11
6	Différents constituants de l'huile des graines de grenade.	15
7	Schéma de possibilité de transformation de la grenade.	20
8	Produits industriels drivés de la grenade.	23
9	Réaction de la réduction du réactif Folin-Ciocalteu	28
10	Structure de base des flavonoïdes.	28
11	Transformation du radical DPPH• en DPPHH.	29
12	Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•.	30
13	Radical galvinoxyle (GO').	31
14	Réduction du complexe chromogène de Cu ⁺² -Nc.	32
15	Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's.	35
16	Mécanisme d'action d' α -glucosidase.	34

17	Grenade de la variété « <i>Sefri</i> ».	36
18	Extraits éthanoliques bruts évaporés et concentrés.	38
19	Schéma du protocole d'extraction des extraits bruts éthanoliques.	39
20	Schéma du protocole de dosage des polyphénols totaux TPC .	40
21	Schéma du protocole de dosage des Flavonoïdes Totaux TFC .	42
22	Préparation des dilutions pour les activités biologiques.	44
23	La gamme de dilution des extraits.	44
24	Schéma du protocole de l'activité scavenging du DPPH .	45
25	Schéma du protocole de l'activité du piégeage de l' ABTS ⁺ .	47
26	Schéma du protocole du Test GOR .	48
27	Schéma du protocole du Test CUPRAC .	50
28	Schéma du protocole du test Reducing power .	52
29	Schéma du protocole l'activité de Phenanthroline.	53
30	Schéma du protocole de l'activité AChE .	55
31	Schéma du protocole de l'activité inhibitrice de l' α-glucosidase .	57
32	Schéma du protocole de l'activité inhibitrice de la Tyrosinase.	59
33	Courbe d'étalonnage de l'acide galique (μg EAG/mg ES).	61
34	Courbe d'étalonnage de la Quercétine (μg EQ/ mgES).	62
35	Teneur en composés phénolique totaux.	63
36	Teneur en flavonoïdes totaux.	64
37	Teneur en composants phénoliques totaux des trois extraits de	64

grenade étudiées en comparaison avec quelques extraits méthanoliques d'agrumes.		
38	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de fruit de <i>Punica granatum</i> L.	66
39	Valeurs des IC50 issus des trois extraits de grenade comparativement aux standards.	67
40	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de grenade.	69
41	Valeurs des IC50 issus des trois extraits de grenade comparativement aux standards pour le test ABTS.	70
42	Pourcentages d'inhibition du radical GOR des différents extraits de <i>Punica granatum</i> L. et standards utilisés.	71
43	Valeurs des IC50 issus des trois extraits de grenade comparativement aux standards.	72
44	Courbe comparative des pourcentages d'inhibition du test CUPRAC par les trois extraits de grenade.	74
45	Les concentrations des différents extraits et standards obtenus à l'absorbance 0.50.	75
46	Courbe de pourcentage d'inhibition de l'activité réductrice par les différents extraits et standards.	76
47	Histogramme des valeurs IC50 des différents standards et extraits.	77
48	Courbe comparative des absorbances de l'activité phenanthroline.	78
49	Présentation des valeurs des IC50 des extraits de grenade en comparaison avec les standards.	79
50	Pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha glucosidase sous	82

l'action des différents extraits de grenade.		
51	Pourcentage d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase exercé par le standard Acarbose.	83
52	Histogramme comparative des IC50 des trois extraits de <i>Punica Granatum</i> L.avec le standard Acarbose.	84
53	Structure chimique de punicalagins de la grenade	87
54	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques	88
55	Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante.	89
56	Mécanisme des tocophérols (Vitamine E).	91
57	Mécanisme antiradicalaire du BHT avec le radical libre R= C-C(CH ₃) ₃ .	92
58	Hydrolyse simplifiée de la liaison glycosidique.	93
59	Structure de l'alpha glucosidase.	93
60	Structure chimique de l'acarbose.	95

Liste des abréviations

%	Pourcentage.
Abs	Absorbance.
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
AChE	Anti-cholinestérase.
ACI	Acetylthiocholine iodide.
ACNH₄	Acétate d'ammonium.
AGI	Acide Gras Insaturé.
AGS	Acide Gras Saturé.
Alim	Alimentaire.
(Al(NO₃)₃, 9H₂O)	Nitrate d'aluminium.
BHA	ButylHydroxyAnisole.
BHT	ButylHydroxyToluéne.
Bio	Biologique.
°C	Degrés Celsius.
[C]	Concentration.
CE₅₀	Concentration effective indiquant 0,50 d'absorbance.
CH₃COOK	Acétate de Potassium.
CRBt	Centre de Recherche en Biotechnologie.

(Cu Cl₂, 2H₂O)	Chlorure de cuivre (II).
DPPH	1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl.
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid).
EAG	Equivalent d'Acide Gallique.
EBSE	Extrait Brut Sec d'Epluchure.
EBSJ	Extrait Brut Sec de Jus.
EBSG	Extrait Brut Sec des Graines.
EQ	Equivalent de Quercétine.
ESG	Extrait Sec de Grenade.
FCR	Folin-Ciocalteau Reactif.
Fe⁺³	Fer ferrique.
Fe⁺²	Fer ferreux.
FeCl₃	Chlorure ferrique.
g	Gramme.
GOR	Galvinoxyl radical.
h	Heure.
H	Hydrogène.
I %	Pourcentage d'inhibition.
IC50	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux.
INRAA	Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.
<i>In vitro</i>	En milieu artificiel en laboratoire.

K₃Fe(CN)₆	Ferricyanure de potassium.
L-DOPA	3,4-dihydrophénylalanine.
µg	Microgramme.
MeOH	Méthanol.
mg/ ml	Rapport gramme par litre.
min	Minutes.
mM	Millimolaire.
Na₂CO₃	Carbonate de sodium.
Nm	Nanomètre.
PAM	Plantes aromatiques médicinales.
Cosm	Cosmétique.
SD	Ecartype.
TCA	Trichloracétique.
TFC	Total Flavonoid Content.
TPC	Total Phenolic Content.

Introduction générale

Dans le cadre de la politique menée par le gouvernement algérien pour trouver des solutions permettant de s'affranchir de la dépendance économique au pétrole et ses sous-produits, l'état a pensé entre autre à la valorisation des produits et ressources forestières comme solution permanente à cette problématique.

Parmi ces ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) et l'arboriculture fruitière qui occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale, étant donné la position géographique et les conditions pédoclimatiques privilégiés de l'Algérie qui lui confèrent la possibilité de mettre en culture plusieurs espèces fruitières.

Le grenadier fait partie des espèces médicinales. Pendant longtemps le fruit de *Punica granatum* L. a été considéré comme une espèce secondaire, mais durant les dernières décennies, il prend de plus en plus d'importance poussé par les recherches scientifiques, si bien que sa culture est passée du caractère traditionnel pour se développer en vergers commerciaux.

Malgré ses caractéristiques nutritionnelles intéressantes, le grenadier reste sous-exploité en Algérie. Il est consommé principalement en fruit frais, alors que ses différentes parties (écorce, pulpe, graines) sont considérées comme des sous-produits utilisés surtout en médecine traditionnelle et en teinturerie, quant à la valorisation de la production par sa transformation, on note l'absence des unités industrielles qui peuvent améliorer la rentabilité de ce secteur (**Melgarejo et Valero, 2012**).

Le retour en force de la grenade dans les phytomédecines est dû à ses innombrables vertus thérapeutiques démontrées récemment, ajouter à cela le besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires (**kurtay, 2014**), ceci en fait une candidate de choix pour cette étude, étant donné que très peu de travaux ont été conduits sur ce fruit « santé » en Algérie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail, dans le cadre de valorisation des produits forestiers dans notre pays très riche en flore diverse, et qui mérite d'être explorée.

Le fruit de *Punica granatum* L. qui fait l'objet de cette étude, appartient à la variété « *Sefri* » de la région d'EL HAMA , Wilaya de Constantine, l'objectif de ce travail étant de

chercher de nouvelles molécules thérapeutiques naturelles compétitives en terme de d'activité et de rendement économique, pour cela des travaux phytochimiques et biologiques originaux ont été conduit *in vitro* sur ce dernier, afin d'enrichir les connaissances sur ses activités biologiques.

Le présent manuscrit est scindé en deux parties :

- ✚ La première partie est une synthèse bibliographique sur tout ce qui concerne *Punica granatum* L.: composition, utilisations thérapeutiques, études antérieures.
- ✚ La seconde partie est une partie expérimentale regroupant le matériel et méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus et leur discussion dans l'ordre suivant :
 - ⊗ Extraction des trois parties de la grenade (épluchures, graines et jus).
 - ⊗ Les extraits préparés feront l'objet de tests phytochimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques: composés phénoliques.
 - ⊗ Analyse quantitative du contenu en polyphénols, et flavonoïdes totaux dans les différents extraits du fruit de *Punica granatum* L.
 - ⊗ Evaluation de l'activité antioxydante, enzymatique des différents extraits au moyen de diverses méthodes.
 - ⊗ Faire une analyse statistique afin d'obtenir des résultats fiables permettant de les évaluer et les discuter.
 - ⊗ Une conclusion générale qui regroupe l'ensemble des résultats obtenus et quelques perspectives de recherche avenir.



Première partie ;

Synthèse Bibliographique

Chapitre 7 :

La grenade, le fruit de Punica granatum L.

Les fruits du Grenadier (*Punica granatum L.*) ainsi que leurs différentes parties graines, épiluchures et fleurs, ont été utilisées depuis l'antiquité par diverses civilisations qui leur ont attribué plusieurs vertus.

Les études modernes montrent que le régime alimentaire est le moyen le plus évident pour maintenir le corps en bon état de santé, et prévenir contre les différentes maladies (**Alhijna et al, 2017**).

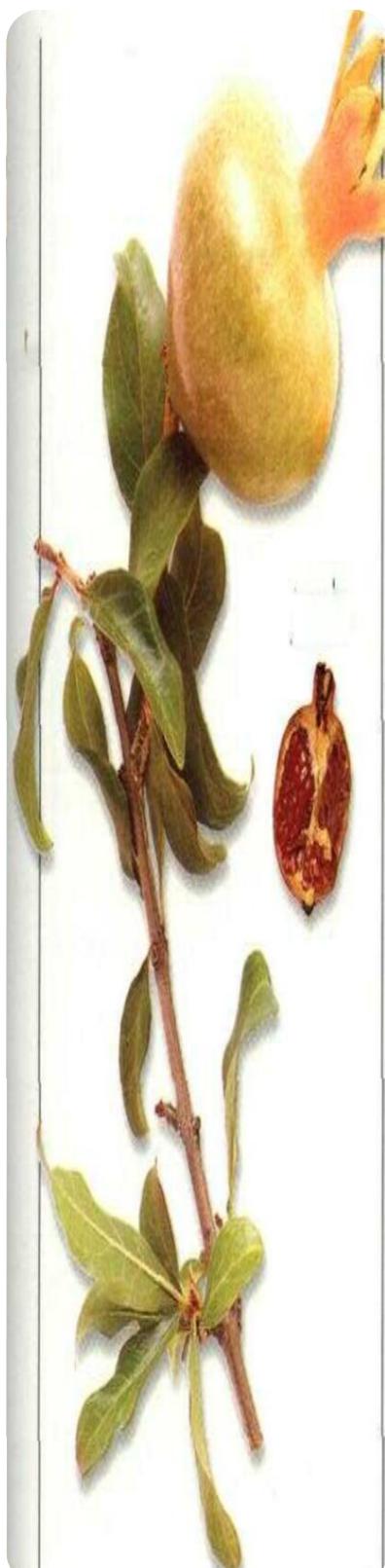
L'intérêt nutritif et plurimillénaire des tradi-praticiens pour cet aliment-médicament a permis de mieux connaître son potentiel et les mécanismes qui permettent d'expliquer ses pouvoirs préventifs et co-thérapeutiques, en relation avec la composition chimique riche en composants bioactifs (**Kurtay, 2014**).

La grande partie de ses composés chimiques se trouve en outre dans l'écorce et les pépins qu'on considère comme déchets. L'étude et l'évaluation de ces derniers 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 et al, 2017**).

I. 1. Le grenadier dans le règne végétal

I. 1. 1. Description morphologique

Le Grenadier est un arbrisseau ou un sous-arbrisseau attrayant, à 20 ou 30 pieds (6 ou 10 m) de hauteur, il est très ramifié depuis la base du tronc, plus ou moins épineux, avec une très longue durée de vie, certains spécimens à Versailles sont connus pour avoir survécu à deux siècles. (**Morton, 1987**).

Tableau 1 : Description morphologique du grenadier, **Source :** (Fourasté, 2002).**Figure 1 :** Le grenadier
(Larousse, 2001).

✿ Feuilles

Généralement opposées, simples, luisantes, entières et non stipulées, parfois, elles sont isolées ou groupées en verticilles sur un même pied.

✿ Fleurs « balaustes »

D'un rouge pourpre à grenat, brièvement sont axillaires, pédonculées, solitaires ou en petites cymes pauciflores.

✿ Le fruit

✿ La baie

Le fruit, globuleux, rouge-brun, de la grosseur d'une orange, est surmonté des dents du calice desséchées, cette baie est cortiquée à péricarpe dur, divisée en plusieurs loges.

✿ Les graines

Possèdent un tégument externe de couleur rouge, pulpeux, succulent, sucré, acidulé, et un tégument interne dur, elles n'ont pas d'albumen mais deux cotylédons foliacés, enroulés l'un sur l'autre.

✿ L'écorce du fruit « *malicorium* »

Grisâtre, se ramifie en branches irrégulières, légèrement épineuses au sommet.

✿ Système racinaire

Racine fasciculée, de surface (60cm²), ligneuse, noueuse, dure et pesante et s'adapte selon les conditions du sol (Evreinoff, 1957).

I. 1. 2. Classification systématique

Le grenadier, *Punica granatum L.* a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'Angiospermes Phylogeny Group ou APG.

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII. Au sein de cette classification, la position du grenadier est la suivante :

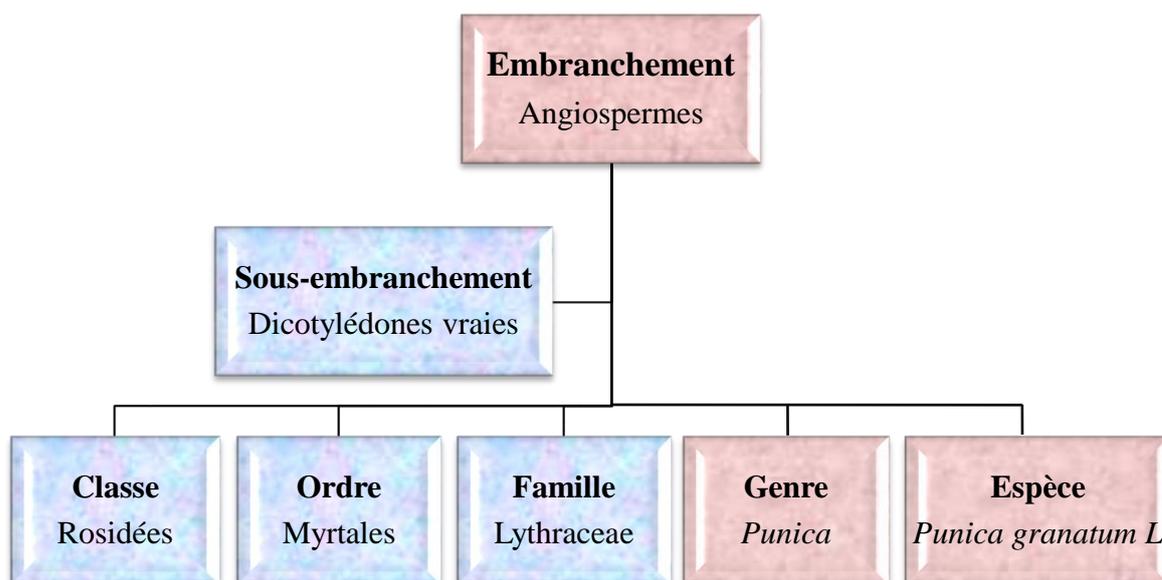


Figure 2 : Position de *Punica granatum L.* selon la classification APGII.

Source : (Spichiger et al, 2004).

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

I. 2. Origine géographique et aire de répartition du grenadier

I. 2. 1. Origine

Le grenadier est une plante fruitière, originaire de l'Himalaya dans le nord de l'Inde jusqu'en Iran. Il est considéré parmi les premiers fruits cultivés par l'homme depuis environ 4000 ans av.j, cependant il est cultivé et naturalisé depuis l'Antiquité dans toute la région méditerranéenne.

Au cours des derniers milliers d'années, il s'est répandu partout dans le monde, de l'Asie à l'Europe puis à l'Amérique du Nord. Il est actuellement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales du monde ((**Melgarejo et Valero, 2012 ; Kurtay, 2014**).

I. 2. 2. Aire de répartition géographique

✿ Dans le monde

Le *Punica granatum L.* est cultivé à une échelle considérable dans de nombreux pays d'Orient tels qu'Iran, Afghanistan, Transcaucasie, Turquie et Turkestan, de même sa culture est largement pratiquée dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Marocetc.) (**Evreinoff, 1957 ; Kanoun, 2014**).

On le trouve encore en Amérique et on le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Israël, en Egypte, en Syrie et dans les pays balkaniques (**Evreinoff, 1950**).

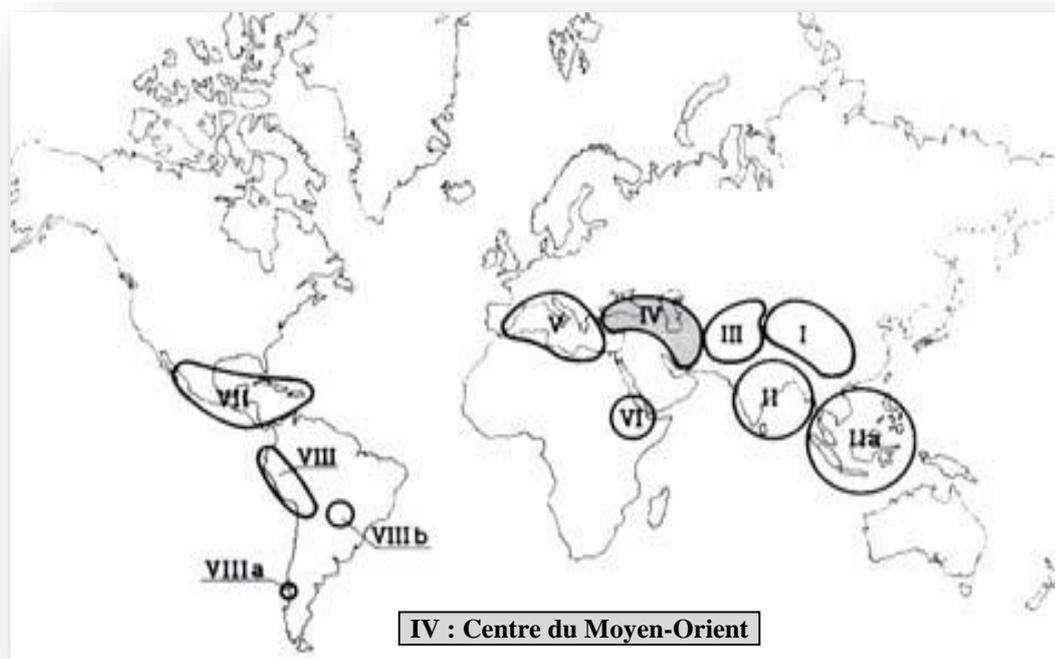


Figure 3 : Centre d'origine et de diversité des arbres grenadiers cultivées (IV) selon le chercheur Vavilov (1951) (Sanchez-Monge, 1974).

❁ L'introduction du Grenadier dans la culture européenne et méditerranéenne

C'est les Romains qui ont introduit cet arbre en Afrique du Nord, et ils le connaissaient sous le nom de « *Malum panicum* », décrit par les auteurs romains depuis l'époque de Caton (IIe siècle avant J-C).

En Espagne, la culture du Grenadier s'est développée surtout sous l'occupation arabe, d'où son nom « Granada » provenant du nom de la ville de Grenade, où cette culture était florissante, mais actuellement est moins appréciée qu'elle ne l'était dans le passé.

En Italie, en Espagne, au Maroc et en Algérie, on observe souvent des grenadiers redevenus sauvages, au voisinage des habitations (Evreinoff, 1957).

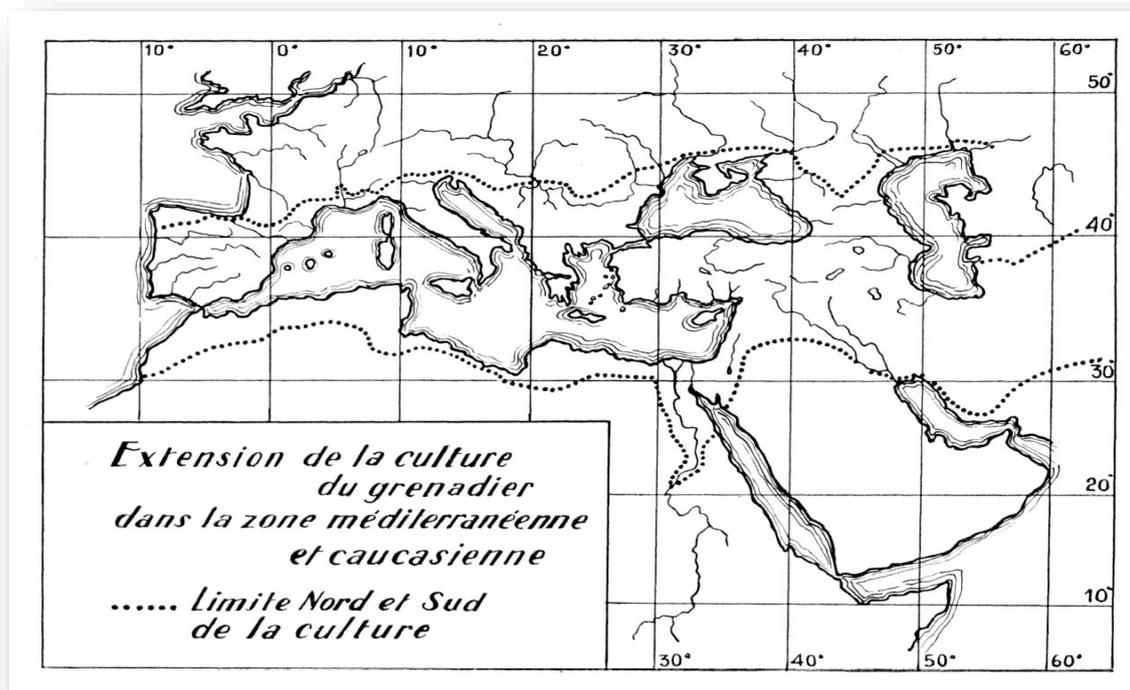


Figure 4 : Limite de la culture du grenadier dans la zone méditerranéenne et caucasienne (Evreinoff, 1957).

❁ Le grenadier en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes.

Il est répandu dans toute l'Algérie et subspontané souvent dans le Tell Algéroconstantinois (Meftah, 2003). En Oranie, les variétés les plus cultivées sont : Tendral (appelée Molla), Blanca, Si Hueso, Colorado. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardin en Kabylie, on ne connaît que leur l'appellation locale (Lahlou, Elmouze,...).

Quatorze variétés qui sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat, sont illustrés dans le tableau suivant (INRAA, 2006) :

Tableau 2 : Variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006).

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

I. 3. Culture du grenadier

Punica granatum L. est généralement cultivé pour ses fruits comestibles, qui servent aussi à préparer la grenadine, ou bien pour l'aspect ornemental de ses fruits et de ses fleurs (Fourasté, 2002).

I. 4. Exigences de milieu

Selon Everinof, (1957) et Oukabli, (2004), les exigences de culture influençant l'arbre grenadier sont l'eau et la température.

Tableau 3 : Les exigences écologiques du grenadier, **source :** (Evreinoff, 1957).

Conditions climatiques	<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Climat - Très chaud, très sec et prospère même dans les climats tropicaux pourvus d'une saison sèche. ⊗ Température - Sensible aux basses températures, les - 15° à - 17° sont mortelles pour ses branches charpentières, à -20° l'arbre est tué. ⊗ Culture - Possible en plaine et même au bord de la mer, sur le littoral de la Méditerranée. - Adaptation aux altitudes de 300 à 1000 mètres. ⊗ Qualité des fruits - Meilleure dans les régions semi-désertiques, arides et chaudes.
Le sol	<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Meilleur développement - Terrains alcalins, sols perméable, profonds, riches, frais, argilo-siliceux, avec sous-sol perméable. ⊗ Culture - Ne craint pas les terres assez salines, ni le voisinage de la mer, d'où son intérêt pour l'utilisation de ces terres difficiles. ⊗ Qualité du fruit et rendement - Dépend de l'humidité et la nature du sol.
L'eau	<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Culture - Les arboriculteurs turcs et perses prétendent que le grenadier doit avoir « les pieds dans l'eau et la tête au soleil ». - Niveau des eaux phréatiques à une profondeur de 1-1,5 m. ⊗ Qualité des fruits - Racines soient au frais et largement irriguées.

I. 5. La production mondiale de grenade

Dans le monde, la grenade est principalement cultivée dans les pays méditerranéens et asiatiques, Parmi ces pays, les principaux producteurs sont l'Inde, l'Iran, la Chine et la Turquie. Il existe d'autres producteurs importants tel que l'Espagne, Tunisie, Maroc, Pakistan Afghanistan, Azerbaïdjan, Arménie, Chypre, Égypte, Israël et Arabie saoudite (**Ercisli et al., 2007 ; Gozlekci et al., 2011**).

Pour la production mondiale, il n'y'a pas des données précises, ça peut être expliqué du fait que cette espèce est considérée comme une culture secondaire. Elle a été estimée par **Melgarejo et Valero, (2012)** a environ 3 086 000 tonnes, tout en se basant sur les données élaborées par différentes associations de chercheurs à travers le monde. La figure N°5 montre la répartition de la production annuelle des plus grands pays producteurs de grenades au niveau mondial.

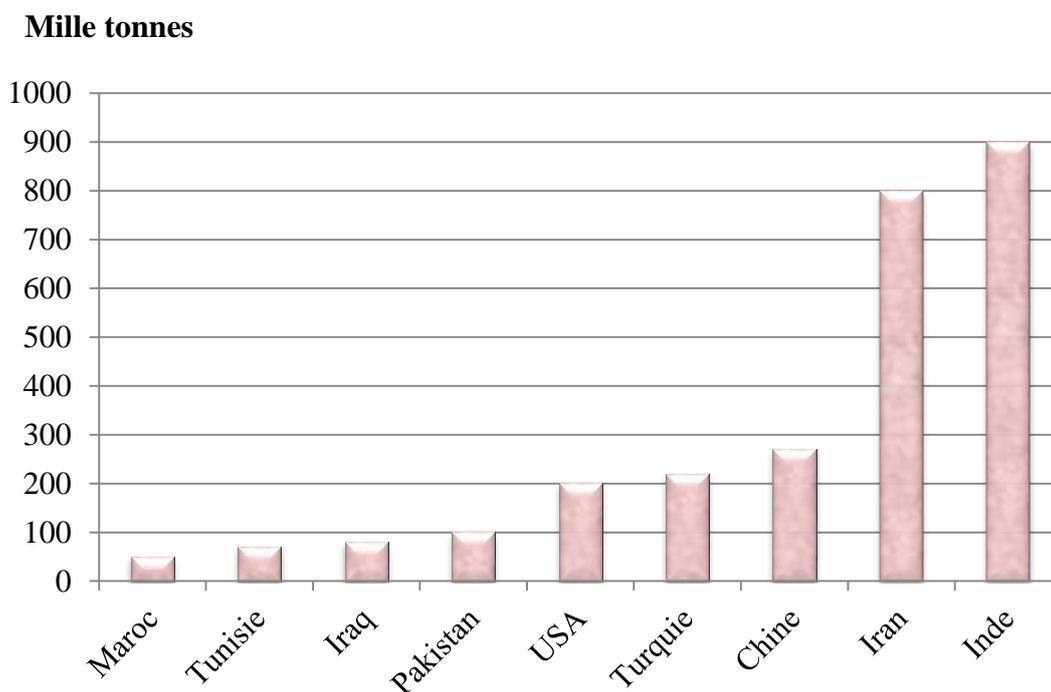


Figure 5 : Les plus grands pays producteurs de grenades au monde.

Source : (Melgarejo et Valero, 2012).

I. 6. Valeur nutritionnelle et composition de différentes parties de grenade

I. 6. 1. Valeurs nutritionnelles de la grenade

La grenade est considérée comme « Aliments-plus » du fait que son fruit contient dans ses différentes parties : écorce, membranes blanches, arilles et pépins de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée (**Calin Sanchez et al., 2005**).

🍷 La partie comestible

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade, dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse) (**Calin Sanchez et al., 2005**). Elle fournit en moyenne 68 kcalories (285 kJoules) pour 100 g de partie comestible, ce qui la situe au niveau de la figue fraîche ou de la mangue (**USDA, 2006**).

Cette énergie est fournie surtout par la composition suivante (**Bdoudjenah et Merzouge, 2016**) :

Tableau 4 : Valeur nutritive de la portion comestible de la grenade (**Bdoudjenah et Merzouge, 2016**).

Grenade fraîche, pulpe et pépins			
(valeur nutritive pour 100 g)			
<u>eau</u> : 81 g	<u>fibres</u> : 1 g	<u>valeur énergétique</u> : 74,2 kcal	<u>valeur énergétique</u> : 315 Kj
<u>protéines</u> : 0,95 g	<u>lipides</u> : 0,3 g	<u>glucides</u> : 16,2 g	<u>sucres simples</u> : 16,2 g
Sels minéraux et oligo-éléments			
<u>potassium</u> : 259 mg	<u>phosphore</u> : 8 mg	<u>calcium</u> : 3 mg	<u>magnésium</u> : 3 mg
<u>sodium</u> : 3 mg	<u>fer</u> : 300 µg	<u>zinc</u> : 120 µg	<u>cuivre</u> : 70 µg
Vitamines			
<u>vitamine C</u> : 11,4 mg	<u>vitamine B1</u> : 30 µg	<u>vitamine B2</u> : 30 µg	<u>vitamine B3</u> (ou PP) : 300µg
<u>vitamine B5</u> : 590 µg	<u>vitamine B6</u> : 200µg	<u>vitamine B9</u> (folate) : 6 µg	<u>vitamine B12</u> : 0 µg
<u>bêta-carotène</u> : 20 µg	<u>rétinol</u> : 0 µg	<u>vitamine E</u> : 0,55 mg	<u>vitamine D</u> : 0 µg

La présence des composés énumérés précédemment (Tableau 4) garantit la valeur nutritionnelle importante de la grenade.

I. 6. 2. Composition biochimique et phytochimique de la grenade

Généralement, la composition de la partie comestible de la grenade a été bien décrite, contrairement aux autres fractions comme la peau du fruit et les pépins, où seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées.

Chacun de ses constituants possède des composés spécifiques, dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des

conditions de culture (Gil *et al.*, 2000 ; Al-Maiman et Ahmad, 2002 ; Kulkarni et Aradhya, 2005 ; Mirdehghan et Rahemi, 2007 ; Schwartz *et al.*, 2009).

A. Composition en métabolites primaires et substances organiques

Toutes les cellules de la plante peuvent élaborer des molécules indispensables à sa vie que l'on appelle les métabolites primaires, ce sont les protéines, les acides nucléiques, les glucides et les lipides.

🌀 L'écorce ou *malicorium*

Environ 50% du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très intéressante de composés bioactifs et minéraux, essentiellement du potassium, du calcium, de l'azote, du phosphore, du magnésium et du sodium.

C'est pour cette raison, que les produits nutraceutiques et les condiments alimentaires fabriqués à partir d'extraits d'écorce et de membranes blanches peuvent représenter une source importante de tous ces composés, à condition qu'ils aient été élaborés d'une manière correcte (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

🌀 Les graines et leur huile

Selon Calin Sanchez *et al.*, (2005), cette partie de la grenade est répartie en Eau, avec un pourcentage de 85% et bien sûr en d'autres constituants mentionnés ci-dessous :

Tableau 5 : Composition en macro/ micronutriments des graines de *punica granatum L.*
Source : (Calin Sanchez *et al.*, 2005 ; Souci *et al.*, 1994).

Acides organiques (1,5%)	✓ Acide malique, acide citrique et acide salicylique.
Glucides importants (10%)	✓ Glucose, fructose et sucrose.
Fibres alimentaires	✓ Hydrosoluble et non hydrosolubles.
Vitamines	✓ Equivalents rétinol, caroténoïdes totaux, β -carotène, B1, B2, Vitamine C, Nicotinamide. ✓ γ -tocophérol (Lansky et Newman, 2007).

En outre, ces arilles sont une source importante de lipide, car ses pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec) (Calin Sanchez *et al.*, 2005).

A partir des pépins de grenade on récupère une huile constituée majoritairement des composants suivants :

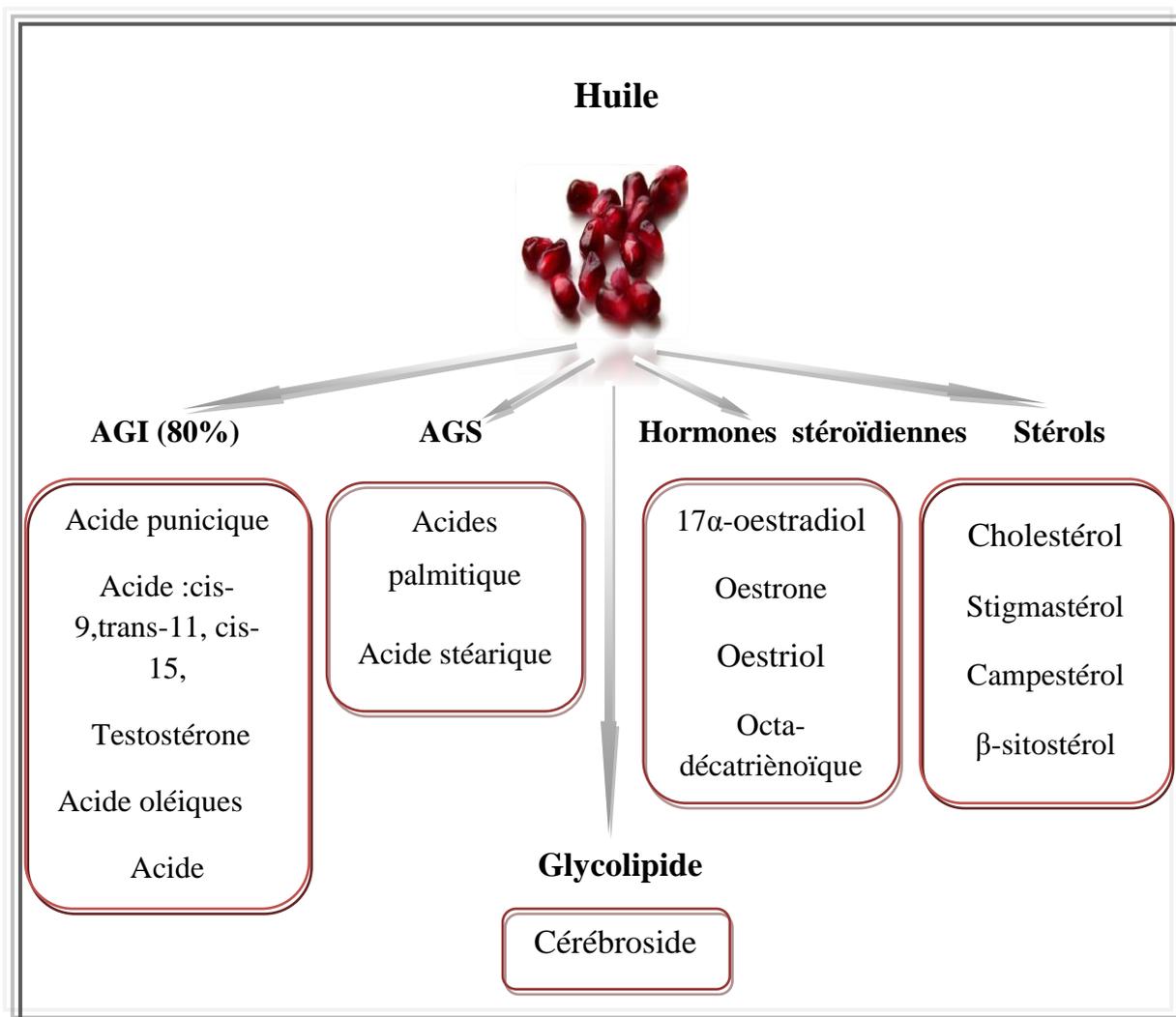


Figure 6 : Différents constituants de l'huile des graines de grenade.

Source : (Lansky et Newman, 2007).

📍 Le jus de grenade

Le jus de grenade est réparti en 85, 4% d'eau, 10, 6% Sucres totaux et 1, 4% de pectine (Prakash et Prakash, 2011). La composition du jus de grenade est reportée table (N° 6) selon l'étude conduite par Melgarejo *et al.*, (2000) et Lansky et Newman, (2007).

Tableau 6 : Différents composants organiques de jus de grenade, **source :** (Melgarejo *et al.*, 2000 ; Lansky et Newman, 2007).

Sucres	✓ le glucose, le fructose et le saccharose.
Acides organiques	✓ l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide tartrique et l'acide fumarique.
Acides aminés	✓ la valine, proline et méthionine.
Vitamines hydrosolubles	✓ Vitamine B1 Vitamine B2 et le plus important est la vitamine C
Minéraux et métaux lourds	✓ Phosphore, Fer, Potassium, Calcium, Sodium, Manganèse Magnésium, Cuivre, Sélénium (codex alimentarius, 2009).
Indole-amines	✓ Tryptamine et sérotonine responsable de la régulation du sommeil, de l'appétit et de l'humeur. ✓ Mélatonine : hormone du sommeil pour la régulation des rythmes chronobiologiques.

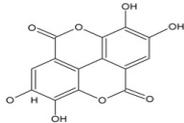
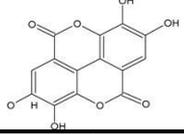
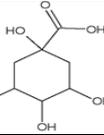
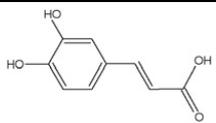
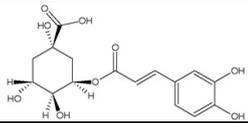
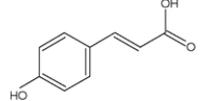
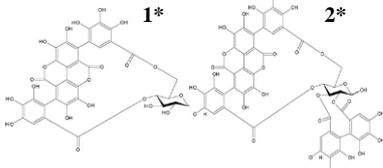
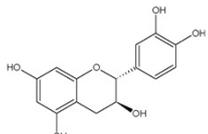
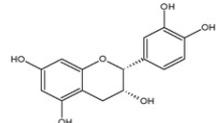
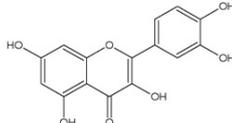
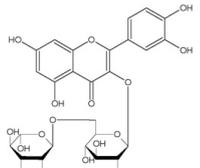
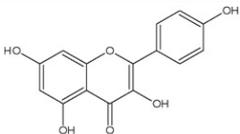
B. Composition en métabolites secondaires

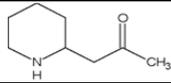
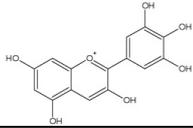
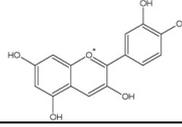
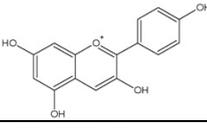
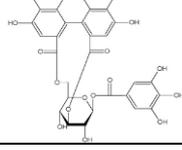
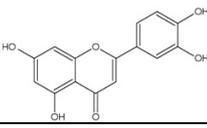
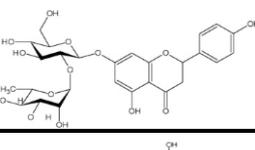
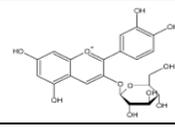
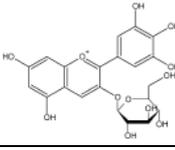
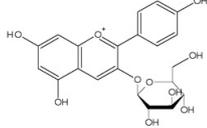
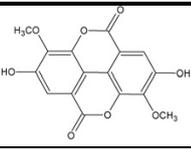
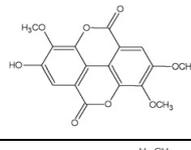
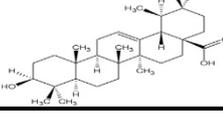
Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Jeun *et al.*, 2005).

Ces principes actifs ont une importance capitale pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent ainsi que leurs écosystèmes. Aussi ils sont très exploités par l'homme dans différents domaines (Tohge *et al.*, 2005).

Le fruit de grenade renferme dans sa composition de nombreux composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes, on donne quelques molécules végétales présents comme exemples dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Différents composés phytochimiques constituant le fruit de grenade, **Source :** (Lansky et Newman, 2007) et (Prakash et Prakash, 2011 ; Reddy, 2018).

Classe chimique	Nom du composé	Structures chimiques	Localisation dans la plante
Acide hydroxbenzoïque	Acide gallique		Ecorce, Graines, Jus
	Acide Ellagique		
Acide cyclitolcarboxylique	Acide quinique		
Acides hydroxycinnamiques (phenylpropanoïdes)	Acide Caféique		
	Acide Chlorogénique		
	Acide p-Coumarique		
Ellagitannins	Punicalin 1* Punicalagin 2*		
Flavan-3-ols	Catéchine		Ecorce, Jus
	Epicatechine		
Flavonols	Quercétine		
	Rutine		
	Kaempferol		

Alcaloïdes	pelletière		
	Delphinidine		
Anthocyanidine	Cyanidine		
	Pelargonidine		
	Corilagin		
Ellagitannins 28%	GranatinA, Granatin B		Ecorce
Flavone	Luteoline		
Flavanone	Naringine		
	Cyanidin 3-O-glucoside		
Anthocyanines (0, 2 à 1, 0%)	Delphinidin 3,5-di-O-glucoside		Jus
	Pelargonidin 3-O-glucoside		
Acide	Acide 3,3'-Di-O-methylellagique		
Hydroxybenzoïque	Acide 3',3'',4''-Tri-Omethylellagique		Graines
Triterpenoïde	Acide Ursolique		

I. 7. Usage empirique et traditionnel du grenadier

Le Grenadier est une espèce fruitière méridionale et subtropicale précieuse. Il est sans doute celui qui se prête aux usages les plus variés même décoratifs. Il n'est pas seulement utile par ses fruits, mais par les produits qui en sont extraits (Evreinoff, 1957).

Le potentiel d'utilisation du fruit de la grenade illustre schématiquement l'ensemble des possibilités de son transformation dans la figure ci-dessus.

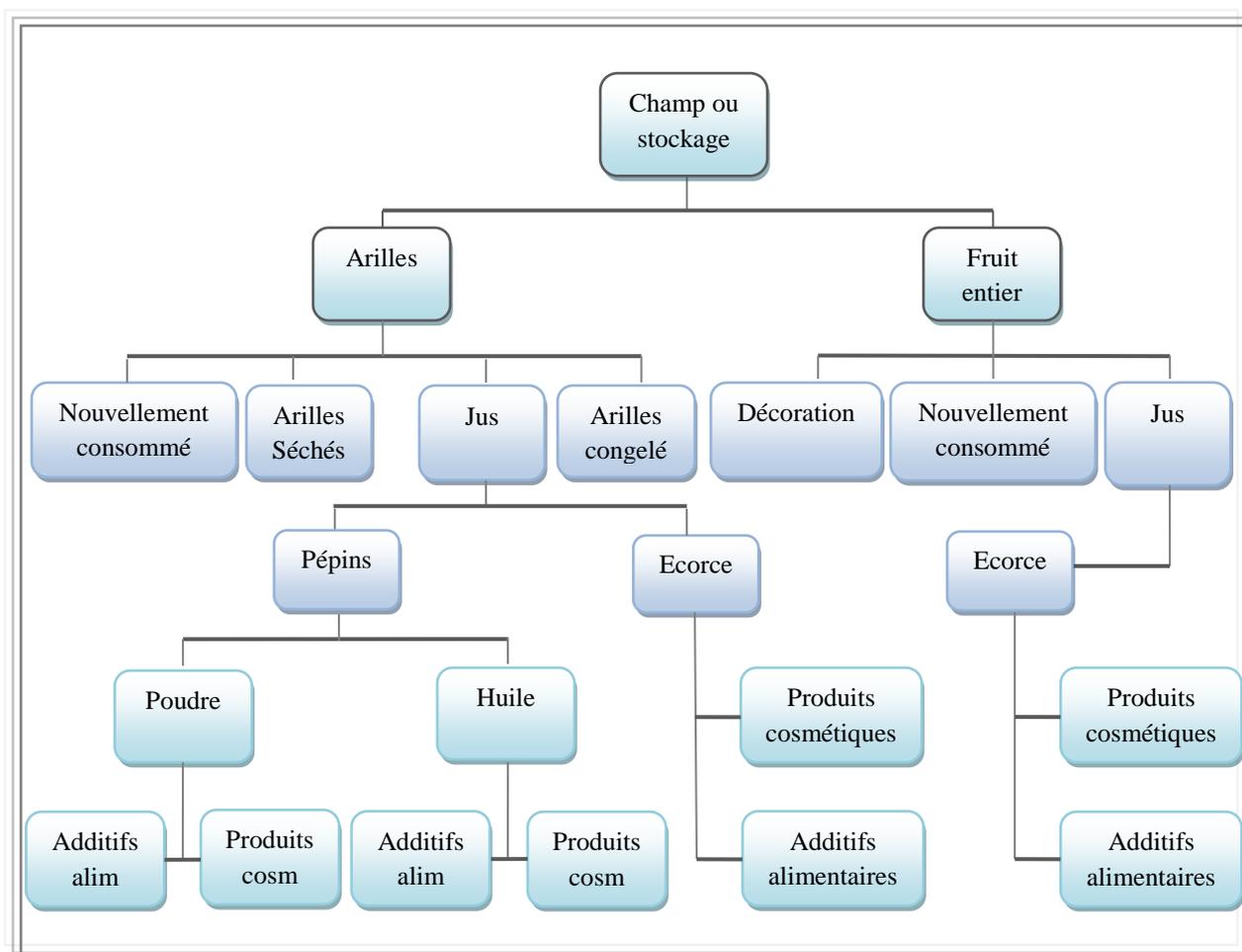


Figure 7 : Schéma de possibilité de transformation de la grenade .

Source (Melgarejo et Valero, 2012).

I. 7. 1. Usage traditionnel

✿ En médecine

Connu depuis l'Antiquité, le Grenadier ne fut vraiment utilisé en Europe qu'à partir du siècle dernier. En raison de leur teneur en tanins, les extraits d'écorce, de feuilles, de fruits immatures et les fleurs séchées ont été administré comme astringents pour enrayer les diarrhées tenaces, la dysenterie et les hémorragies. Les fleurs pour soigner les leucorrhées, en bain de bouche, les aphtes et les gingivites. Le jus de grenade entre dans les préparations pour traiter la dyspepsie et est considéré comme bénéfique contre la lèpre.

L'écorce de la tige et de la racine connues pour être de puissants vermifuges, contient plusieurs alcaloïdes, dont l'isopelletierine, actif contre les ténias. Recommandés en 1550 avant JC, dans le papyrus EBERS, pour le traitement des vers, ont été employés comme ténicide, jusqu'à la première moitié du XX^e siècle. Les feuilles, les graines, les racines et l'écorce ont montré une hypotension, activité antispasmodique et anthelminthique dans les essais biologiques (**Faurasté, 2002 ; Morton, 1987**).

D'autres utilisations ont été mentionnées dans la littérature : empêcher la fécondation et cause l'avortement, traitement des morsures de serpent, du diabète, de la lèpre et des brûlures (**Lansky et Newman, 2000**).

✿ Usage culinaire

Dans les pays tropicaux, souvent les graines sont fraîchement utilisées, comme ingrédient ou bien condiment. Elles décorent et assaisonnent salades de fruits, volailles, soupes, poissons, fruits de mer, sauces et fromages.

En Occident, on consomme la grenade sous forme de jus pour préparer l'authentique sirop de grenadine ou bien des apéritifs ou des desserts comme les sorbets. En Inde, on s'en sert à la place du jus de citron ou du vinaigre (**Fourasté, 2002**).

Dans le nord de l'Inde, l'une des utilisations principales des fruits sauvages est la préparation de "anardana" (**Morton, 1987**).

I. 7. 2. Usages courants

🌿 Usage médicinal moderne

La grenade est considérée comme un fruit complet dans le Coran, dont les propriétés sont confirmées aujourd'hui par la science, est de plus en plus appréciée. Elle est devenue le fruit santé le plus recherché.

Ce n'est pas sans raison objective et loin d'être une mode, en effet ces dernières années, plus de 250 études scientifiques ont démontré que les substances protectrices de la grenade, dont des polyphénols spécifiques, peuvent protéger contre le stress oxydant, les maladies cardio-vasculaires, le diabète, la démence, les réactions inflammatoires virulentes, certaines infections virales et même le cancer (**Curtay, 2014**).

🌿 Le tannage et la teinture des cuirs

La tannerie de cuir dépend des tanins retrouvés dans toutes les parties du grenadier, comme exemple l'écorce du tronc contient 10 à 25% de tanin et était autrefois utilisée dans la production de cuir marocain. La peau et les fleurs produisent des teintures pour les textiles tels que la laine, la soie et tapis de grande qualité (**Evreinoff, 1957 ; Morton, 1987 ; Oukabli, 2011**).

🌿 Autres

Au Japon, un dérivé de l'écorce est utilisé comme un insecticide. Le bois de couleur jaune pâle est très dur, et bien qu'il est disponible uniquement dans les petites dimensions, est utilisé pour la confection de cannes, aussi de l'encre a été produit à partir des feuilles macérées dans du vinaigre (**Morton, 1987**).

🌿 Industrie agroalimentaire

L'industrie agroalimentaire, et plus précisément celle des boissons, s'intéresse de près à la grenade, avant tout pour son côté exotique et son goût nouveau et agréable (**Edeas, 2010**).

Lors de la production du jus, l'écorce de grenade qui est considéré comme déchet est renommé pour ses effets sur la santé, qui en font un candidat attrayant comme un complément nutritif pour l'alimentation du bétail (Melgarejo et Valero, 2012)..

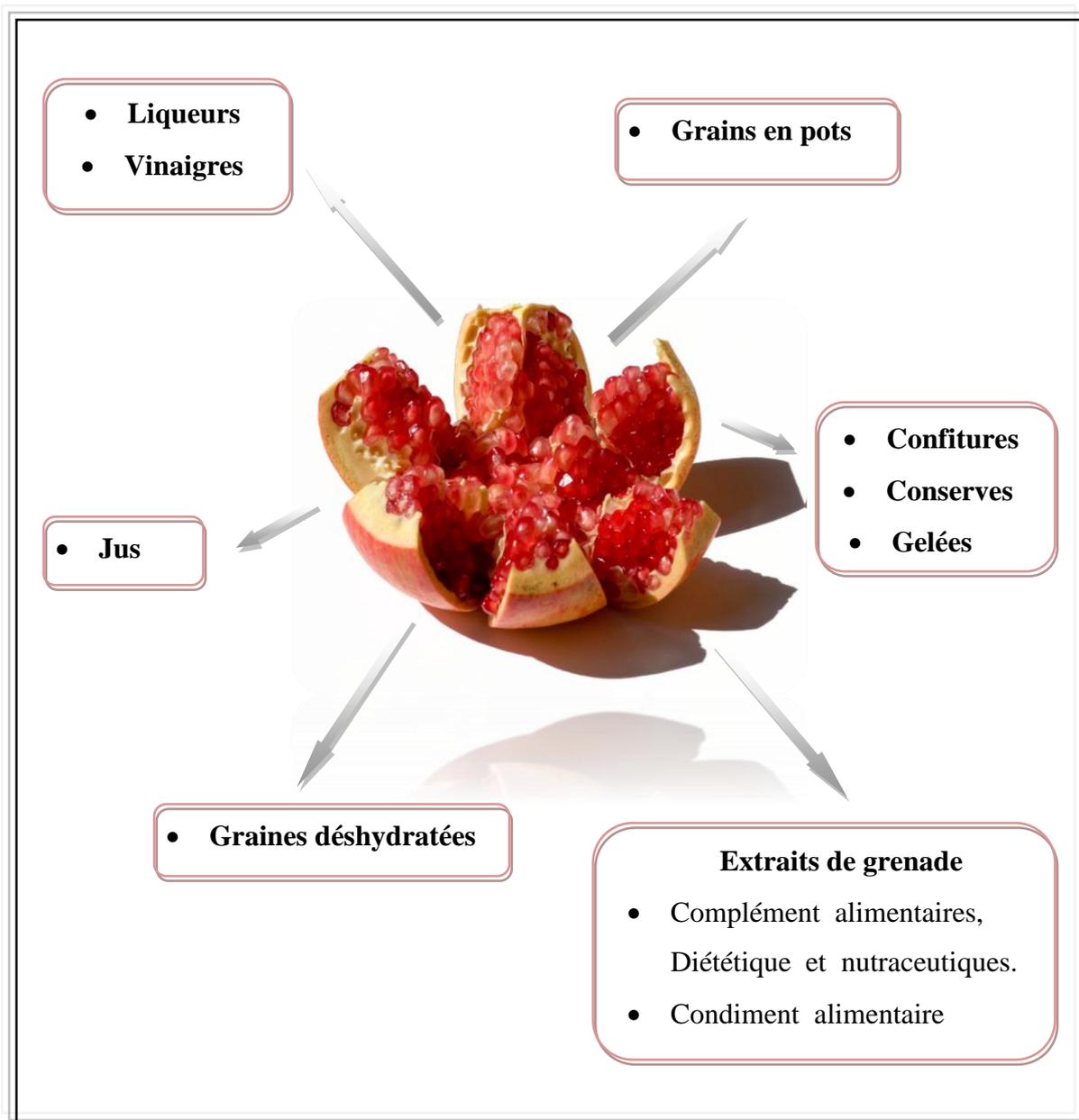


Figure 8 : Produits industriels drivés de la grenade, source : (Melgarejo et Valero, 2012).

♻️ **Industrie cosmétique**

Les puissantes propriétés anti-oxydantes de la grenade en font un ingrédient de choix en cosmétique, particulièrement dans les produits dermatologiques visant à protéger la peau du cancer (**Afaq et al., 2005**).

Par ailleurs, l'extrait de grenade est déjà incorporé dans plusieurs marques de produits cosmétiques qui exploitent son parfum, ses propriétés adoucissantes et hydratantes, ainsi que ses effets raffermissant (crème anticellulite) (**Edeas, 2010**).

Le jus de grenade est de plus en plus largement utilisé en tant que colorant dans les produits de soin sanitaire et cosmétiques tels que les shampooings (**Al said et al., 2009**). L'écorce de ce fruit est également utilisée comme ingrédient de base dans les huiles de massages crèmes, gels,...etc (**Calin Sanchez, 2005 ; Melgarejo et Valero, 2012**).

Chapitre 2:

*Propriétés pharmacologiques et travaux antérieurs
sur l'activité et l'intérêt de *Punica granatum* L.*

Le *Punica Granatum* L. fait partie des espèces utilisées dans la phytothérapie traditionnelle depuis des siècles, mais ce n'est que récemment que les études scientifiques ont permis de confirmer ces propriétés médicinales attribuées à sa richesse en molécules bioactives : polyphénols, flavonoïdes et beaucoup plus d'autres molécules. Il a été reconnu que les différentes parties du grenadier possédaient des activités biologiques distinctes.

II. 1. Activité antioxydante

Le fruit de grenade possède dans ses différentes parties : jus, graines et pelures de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée, ces composés sur tous ceux de nature phénolique lui confèrent une importante activité antioxydante.

Plusieurs études ont été conduites sur cette propriété antioxydante de la grenade :

Dans une étude, basée sur l'analyse spectrophotométrique du jus de grenade, du vin rouge, du jus de myrtille, du jus d'orange et du thé vert, il est rapporté que le jus de grenade possède la plus forte capacité de destruction des radicaux libres. Le jus de grenade serait le plus efficace de ces jus de fruits pour diminuer l'oxydation des LDL et inhiber le stress oxydatif cellulaire dans les macrophages (**Azadzi et al., 2005**).

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

II. 2. Action neuroprotectrice ou Anti-Alzheimer

Il est récemment apparu que la supplémentation en aliments riches en polyphénols, a un effet neuroprotecteur chez les animaux adultes utilisés comme modèles de cas de maladie d'Alzheimer. Une expérience a été réalisée sur des souriceaux nouveau-nés dont la mère avait ingéré depuis le début du troisième trimestre de gestation et pendant la période d'allaitement de l'eau de boisson additionnée de jus de grenade.

Les lésions du cerveau provoquées de manière artificielle et examinées au niveau histologique et biochimique montrent que les souriceaux ayant reçu du jus de grenade

présentent une perte de tissu cérébral significativement réduite, d'autant plus que la dose administrée est élevée. L'acide ellagique a été détecté dans le plasma des souriceaux traités mais pas chez les souriceaux témoins. Sa présence pourrait donc être liée à l'effet neuroprotecteur obtenu chez les nouveau-nés par suppléments maternels en jus de grenade (**Loren et al., 2005**).

De nombreuses études scientifiques prouvent que la grenade développe une capacité protectrice sur le cerveau et le système nerveux. Une étude réalisée sur des souris ont conclu que le jus de grenade pourrait avoir un effet neuro-protecteur, qui prouve que le jus de grenade réduit de moitié le dépôt de la protéine bêta-amyloïde dans le cerveau, marqueur de l'apparition de la maladie d'Alzheimer (**Hartmann et al., 2006**).

II. 3. Action anti-hyperglycémiant ou antidiabétique

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

II. 4. Véritable anti-inflammatoire naturel

La grenade était déjà célébrée pour ses propriétés anti-inflammatoires dans la médecine. Les polyphénols de grenade combattent le stress oxydant par le renforcement des systèmes de protection du corps. En outre, ils influencent directement le processus inflammatoire par la modulation des substances pro-inflammatoires. Ceci se fait via l'inhibition d'enzymes pro-inflammatoires (COX-2) et de protéines (par ex. : TNF-alpha et NF-kappaB,) (**Curtay, 2014**).

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase qui a été inhibée de 37%. Ainsi que d'autres médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait (**Schubert, 1999**).

II. 5. Activité anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur. Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (Albrecht, 2004).

II. 6. Effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires

La consommation de jus de grenade par des patients hypertendus a un effet considérable sur leur tension artérielle et sur l'activité d'enzyme de conversion sérique a été décrite, une diminution de l'activité de l'AC sérique ainsi qu'une réduction de la tension artérielle systolique ont été observées (Aviram et Dornfeld, 2001).

II. 7. Principes des activités réalisées *in vitro*

Dans la présente étude, une série de tests Bio réalisés *in vitro* contribueront à l'enrichissement des informations sur les propriétés du fruit de *punica granatum L.*, en réalisant les applications suivantes :

II. 7. 1. Quantification des composés phénoliques de la grenade

1. Dosage des phénols totaux (TPC)

- **Principe**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV -Vis en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu.

Les propriétés colorimétriques du réactif de Folin- Ciocalteu sont modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules comme la fonction OH des phénols. Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique H₃PMO₁₂O₄ et d'acide phosphotungstique H₃PW₁₂O₄₀ qui

sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_{23} , cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée (Wong et al., 2006). La coloration bleue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans l'extrait.

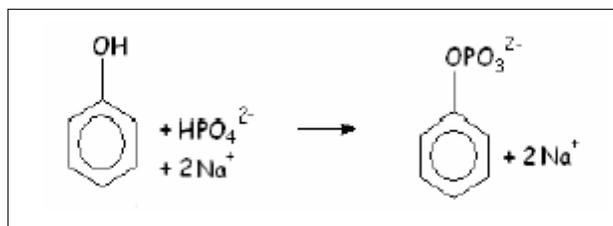


Figure 9 : Réaction de la réduction du réactif Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965).

2. Dosage des flavonoïdes totaux (TFC)

- 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. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribereau-Gayon, 1968).

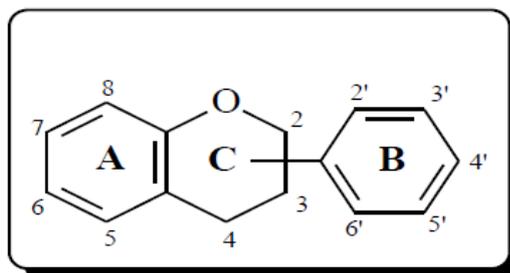


Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes.

II. 7. 2. Activités biologiques de *punica granatum* L.

1. Activité antioxydante

⊗ Le test DPPH

▣ Principe du piégeage du radicale libre

L'activité anti-radicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH qui est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, avec une couleur violette intense.

Le DPPH est le plus stable radical connu, il ne peut pas se dimériser, comme la plupart des radicaux libres, à cause de l'encombrement stérique autour de l'atome d'azote porteur de l'électron célibataire. Toutefois, ce radical peut être réduit par un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel. La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur qui est mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (Molyneux, 2004).

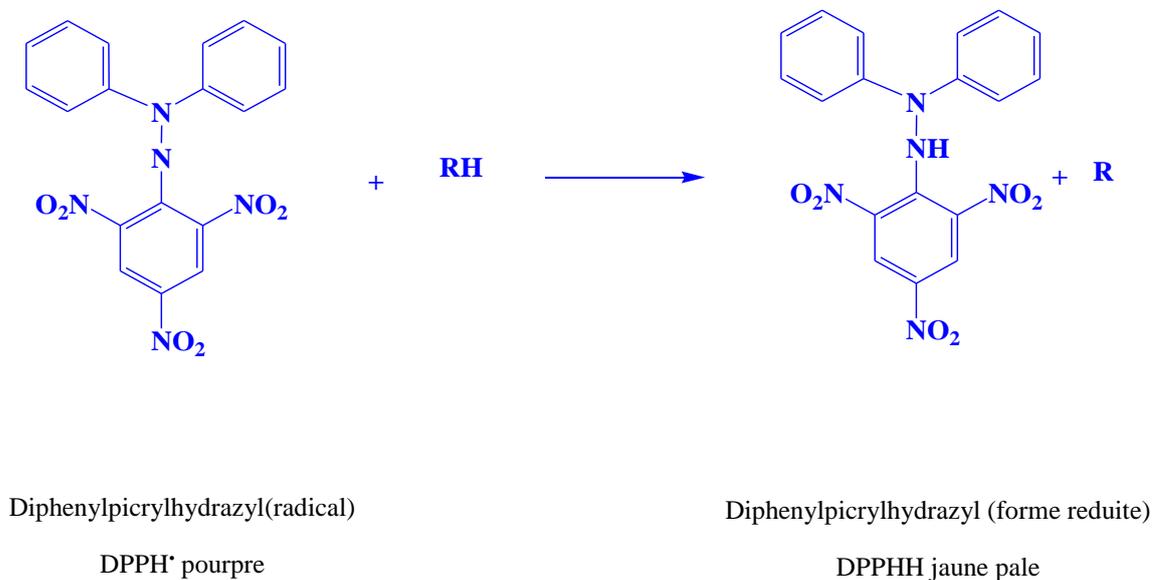
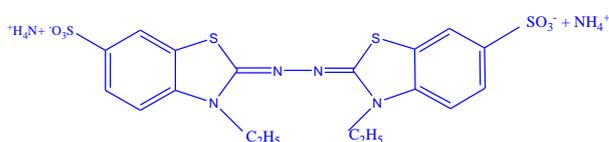


Figure 11 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH.

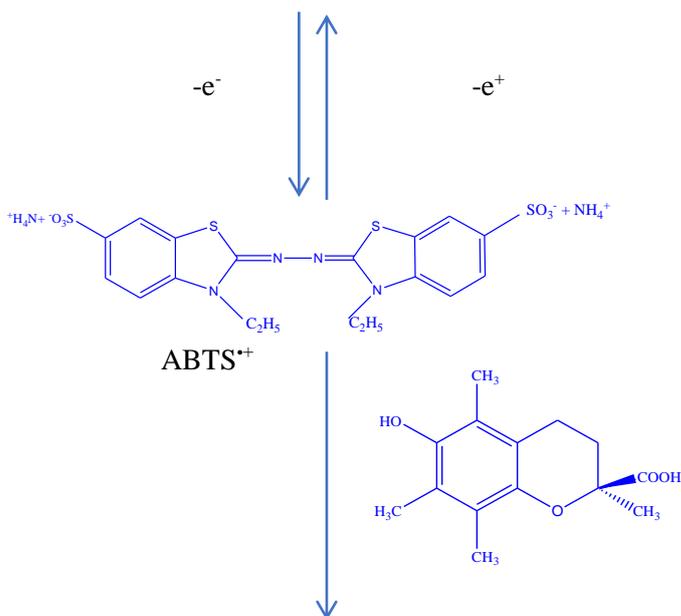
⊗ Test ABTS

▣ Principe du Piégeage de radical ABTS

Le radical cation ABTS^{•+} (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) est stable sous sa forme libre. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de la quantité des antioxydants présents dans le milieu (**Mansour et al., 2011**). L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}.



ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)



(Ou antioxydant à tester donneur de H[•])

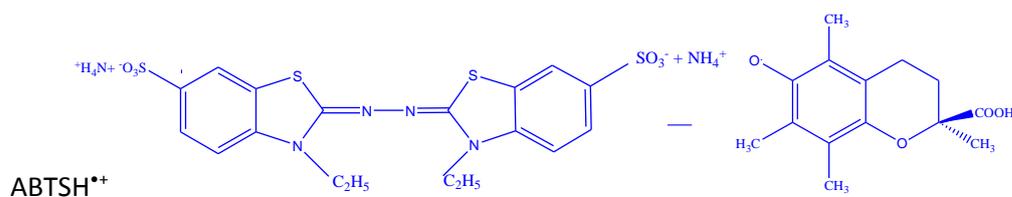


Figure 12 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•].

☼ Test du radical galvanoxyl (GOR)

▣ Principe

Le radical galvinoxyle (GO[•]) est un radical phénolique relativement stable, il est largement utilisé pour évaluer l'activité anti-radicalaire des composés phénoliques et déterminer leur capacité à transférer des protons H labiles aux radicaux libres. Il peut être réduit de manière irréversible, en raison de son électron impair, le radical galvinoxyle présente une bande d'absorption puissante à 428 nm, dans son état radical et à une faible concentration, une solution de galvinoxyle apparaît en jaune. Sa couleur est dégradée du jaune foncé en jaune pâle en présence d'un antioxydant et son absorbance diminue (Shi et al., 2001).

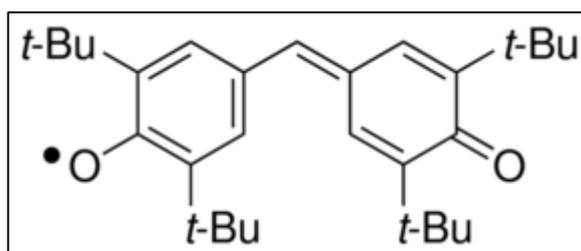


Figure 13 : Radical galvinoxyle (GO[•]).

☼ Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

▣ Principe

La méthode CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre (Cu⁺²)Nc₂-Cu⁺².

En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproéne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak, R., et al., 2004).

Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$, produisant ainsi un complexe chromogène du $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$ qui absorbe à 450 nm (Figure 14).

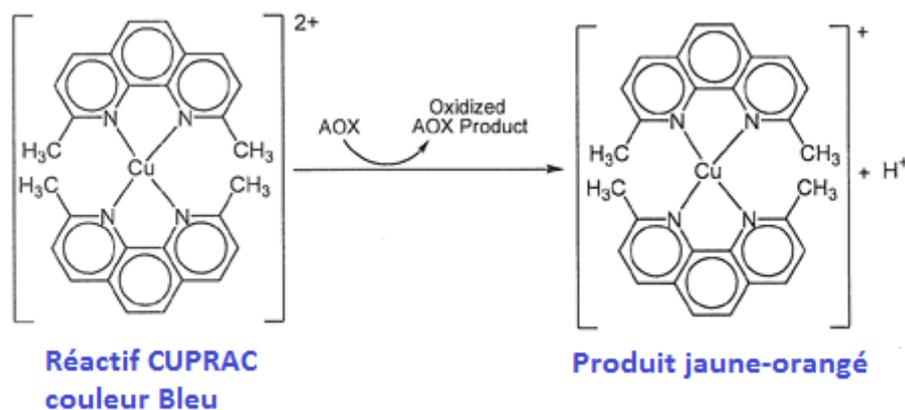


Figure 14 : Réduction du complexe chromogène de $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$.

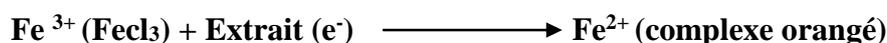
☼ Test du Pouvoir réducteur

▣ Principe

La méthode du pouvoir réducteur est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel. L'aptitude des antioxydants réductants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évaluée en mesurant l'augmentation de la densité de couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. La forme réduite est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait **CRBt**.

☼ Test de phenanthroline

Seul le fer ferreux Fe(II) ou Fe^{2+} forme un complexe stable avec l'orthophénantroline et donne une couleur orangé. On nomme ce complexe ferroïne et il se quantifie photométriquement à une longueur d'onde de 510 nm (**Szydłows Czerniaka, 2008**).



2. Activité enzymatique

❖ Action neuroprotectrice ou Anti-Alzheimer

⊗ Activité Anticholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme responsable de la métabolisation de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué notamment dans les fonctions cognitives. L'inhibition de cette enzyme va engendrer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour diminuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Dans la Maladie d'Alzheimer (MA), les cellules nerveuses se détériorent progressivement, surtout celles produisant de l'acétylcholine, substance importante pour la mémoire. Il a été démontré qu'il existe une baisse de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau de patients atteints de MA. Les anticholinestérasiques diminuent l'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme détruisant l'acétylcholine. Leur action favorise donc l'élévation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau (Ellman *et al.*, 1961).

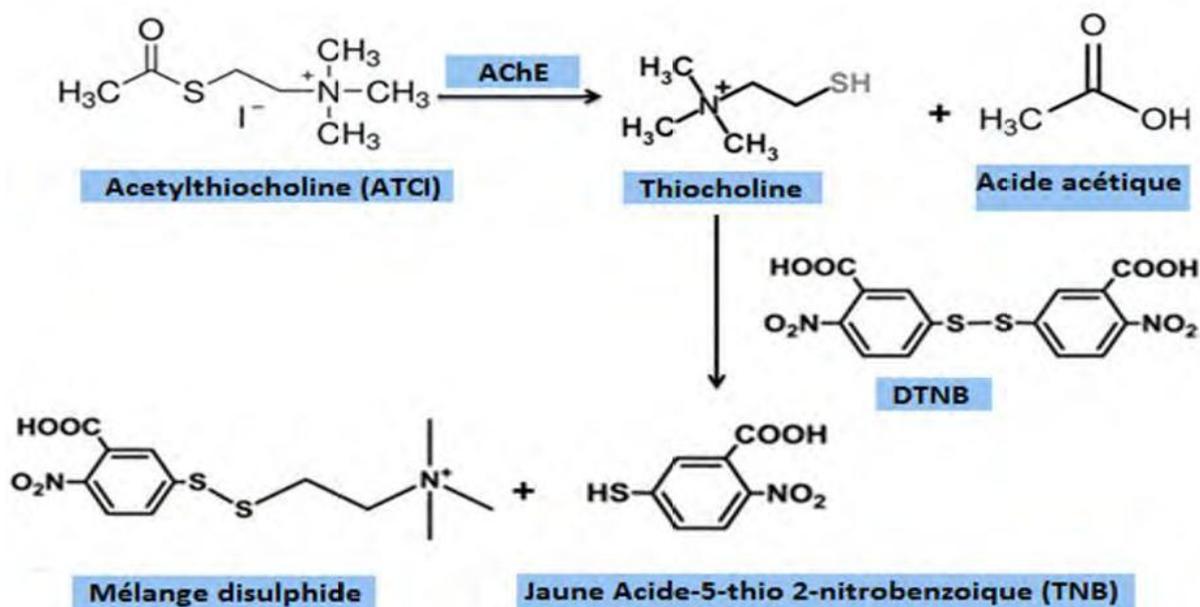


Figure 15 : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's.

❁ Activité inhibitrice de la Tyrosinase

Les mélanines qui constituent pour la peau une protection naturelle contre les effets néfastes des UV.

Divers dysfonctionnement de la mélanogenèse due à des agressions extérieures, aux perturbations hormonales ou au vieillissement se traduisent par l'apparition de taches d'hyperpigmentation qui peuvent être particulièrement inesthétiques. Dans ce cas, l'utilisation d'actifs capables de réduire la production des mélanines pourrait permettre de remédier à ces troubles de la pigmentation, la recherche et l'étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentation en dermocosmétique.

❖ Action anti-hyperglycémique ou antidiabétique

❁ Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

• Principe

A l'état normal de l'organisme, l'enzyme α -glucosidase agit sur la liaison glycosidique du complexe glycopranoside par une hydrolyse, en dégradant en deux molécules simples de glucose donnant une coloration jaune dans le milieu réactionnel en présence d'un agent antioxydant induit son occupation et par conséquent son inhibition et la coloration jaune va disparaître qui indique l'absence des molécules simple de glucose (BehvarAsghariet *et al.*, 2018).

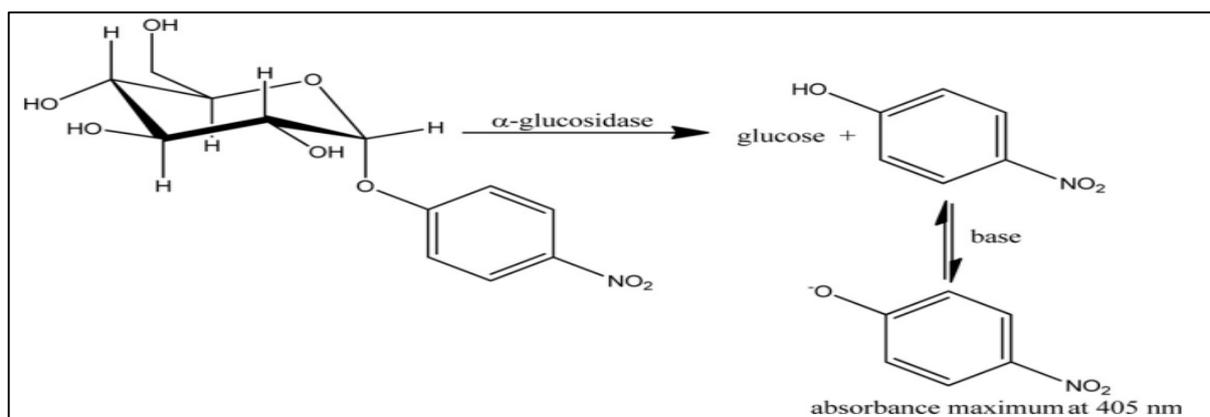


Figure 16 : Mécanisme d'action d' α -glucosidase (BehvarAsghariet *et al.*, 2018).

Deuxième partie :

Partie expérimentale

Chapitre 9 :

Matériel et méthodes

La phytothérapie joue un rôle essentiel dans le traitement de plusieurs maladies par les plantes médicinales. Actuellement plusieurs études sont consacrées à la grenade et ses sous produits, et comme notre pays et la région de Constantine spécialement sont des domaines propices à la culture de cet arbre ancestrale, il serait intéressant de le valoriser sur le plan biologique aussi bien qu'il l'ait sur le plan nutritionnel.

Le présent travail porte sur une étude phytochimique des différentes parties de *Punica granatum* L. : jus frais, graines, et pelures, afin de quantifier les métabolites secondaires en particulier, les polyphénols et flavonoïdes contenus dans ces trois parties, comparer leurs effets antioxydant et enzymatique *in vitro*, et essayer de trouver une relation structure activité. Pour cela, la partie expérimentale de ce travail a été réalisée comme la suit :

✚ La partie extraction a été faite au niveau du Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université des Frères Mentouri Constantine1.

✚ Une deuxième partie consacrée à l'évaluation des activités biologiques a été réalisée au laboratoire 02 de Biochimie, au niveau du Centre National de Recherche en Biotechnologie « **CRBt** », Nouvelle Ville – Constantine.

I. 1. Matériel d'étude

🌸 Matériel végétal

Le fruit de *Punica granatum* L., qui fait l'objet de notre étude biochimique, a été acheté fraîchement cueilli à la fin du mois de Septembre 2018 et identifié par le maraicher comme étant de la variété « *Sefri* », cultivé selon les méthodes de l'Agriculture Bio dans la région d'EL HAMA de la wilaya de Constantine.



Figure 17 : Grenade de la variété « *Sefri* ».

🌸 Réactifs et appareillage

Les produits chimiques et les appareils utilisés sont reportés en annexes.

I. 2. Méthodes d'études

I. 2. 1. Préparation du matériel végétal

❖ Séchage, épluchage, égrenage et pressage

Le fruit entier, fraîchement récolté, a été débarrassé et lavé abondamment avec de l'eau de robinet afin d'éliminer toutes les impuretés.

⊗ Pelures

Après avoir épluché manuellement, de façon délicate les grenades, une quantité de pelures a été séchée dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et à température ambiante, pour être réduite en poudre fine et homogène par broyage à l'aide d'un mortier et un pilon afin d'augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant et faciliter l'extraction.

⊗ Jus

Le jus frais est obtenu par pressage des pépins à la moulinette puis filtration.

⊗ Graines

Les pépins récupérés de couleur jaune beige sont lavés puis séchés.

I. 2. 2. Analyses phytochimiques

❖ Extraction par macération à froid

L'intérêt de cette méthode est de conserver tous les métabolites secondaires surtout les thermofragiles, en plus d'être économique sur le plan énergétique.

⊗ Manipulation

✓ Un broyat de 72,32 g de pelures séchées précédemment, est mis dans un bocal stérile en verre ombré et rempli au deux tiers avec de l'éthanol pur.

✓ D'une autre part 2,89 g de graines sèches sont mis dans un bocal stérile en verre ombré et rempli à moitié avec le même solvant.

✓ Le tout est ainsi agité, hermétiquement fermé et laissé à macérer à température ambiante et à l'ombre pendant quinze jours en mélangeant régulièrement.

❖ **Récupération de l'extrait total par évaporation**

✓ Les extraits recueillis et filtrés sont ensuite évaporés et concentrés via un évaporateur rotatif, programmé à 40 °C sous pression réduite, maintenu à l'aide d'une pompe qui assure le vide, pour séparer le solvant et les composés chimiques existants dans l'extrait.

✓ Ce procédé a permis d'obtenir trois extraits bruts secs, sous forme d'une gomme rouge marron pour les pelures et le jus et jaune pour les graines accumulées sur les bordures du ballon.

✓ Le tout a été récupéré en grattant les bordures du ballon à l'aide d'une spatule, puis conservé aseptiquement au congélateur jusqu'à leur utilisation.

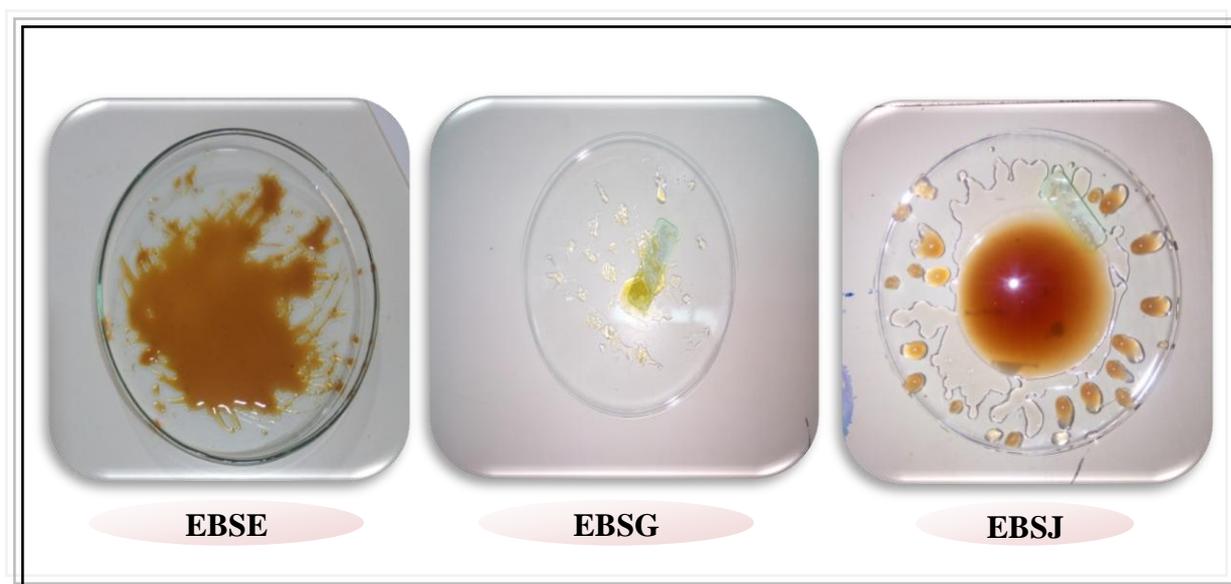


Figure 18 : Extraits éthanoliques bruts évaporés et concentrés.

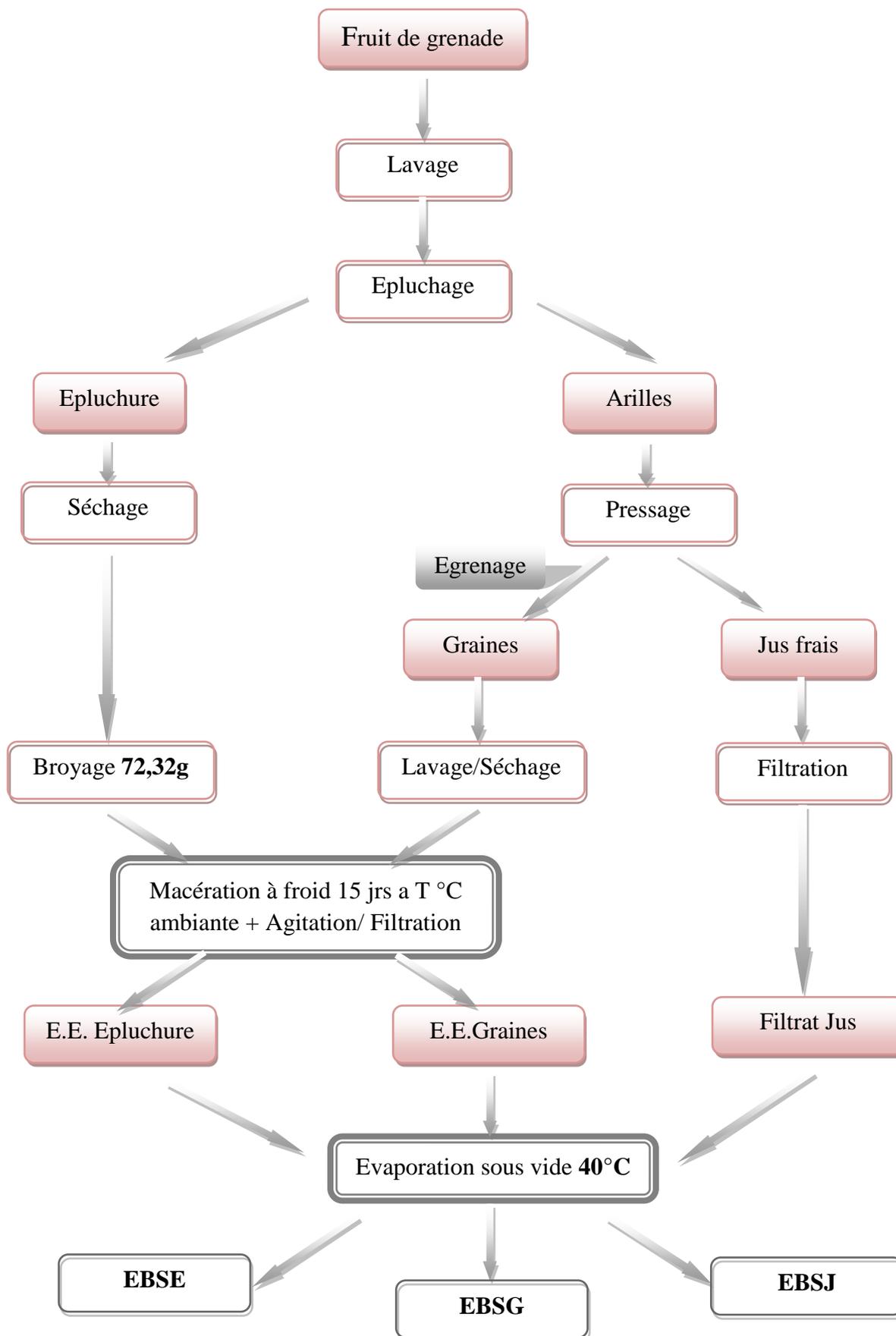


Figure 19 : Schéma du protocole d'extraction des extraits bruts éthanoliques.

I. 3. Etude quantitative des composés phénoliques

1. 3. 1. Dosage des polyphénols totaux TPC (Total Phenolic Content)

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965), suivant une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller *et al.*, (2010), Avec de légères modifications.

❖ Protocol expérimental

A un volume de 20 μl de chaque échantillon à doser (1 mg d'extrait dissoute dans un volume de 1 ml du méthanol), 100 μl de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10), puis 75 μl de carbonate de sodium à une concentration de 7,5% ont été ajoutés, ensuite le tout a été incubé à l'obscurité pendant 2h à température ambiante.

➤ L'absorbance du mélange a été lue à une longueur d'onde de 765nm, en utilisant un blanc préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par les solvants utilisés (Méthanol).

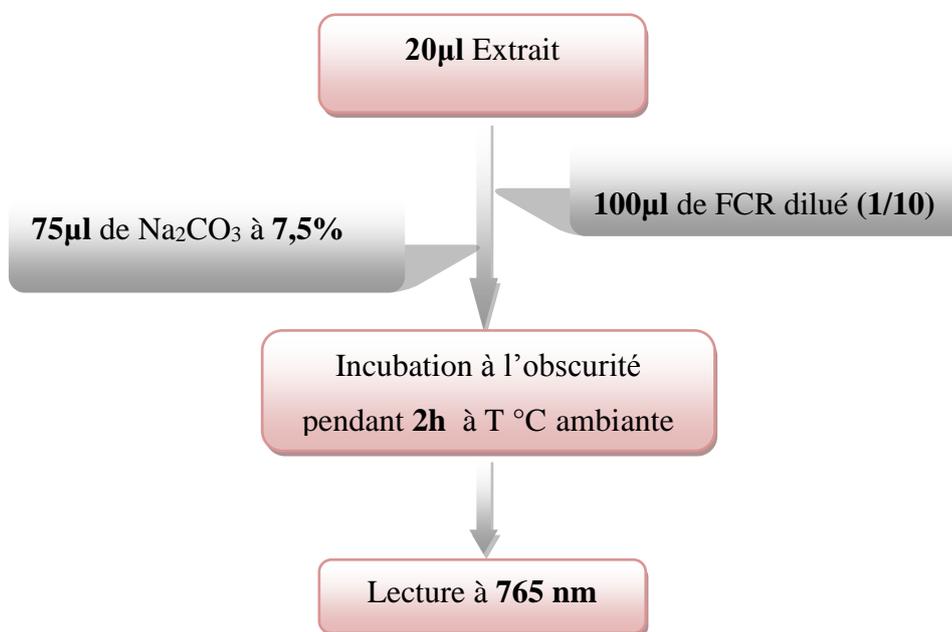


Figure 20 : Schéma du protocole de dosage des polyphénols totaux TPC.

Source : Muller *et al.*, (2010).

✿ Teneur en Polyphénols Totaux (TPC)

Une courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est déterminée. a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique (0,5mg/ 5ml MeOH) comme contrôle positif à différentes concentrations (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µl/ ml).

✚ Les résultats obtenus, sont exprimés en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec des différentes parties de la grenade (µg EAG/mg ESG), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée.

Selon la formule suivante :

$$\text{TPC} = \text{C} * \text{V} / \text{M}$$

Avec :

C : [a.g] µg/ ml.

V : Volume d'extrait (ml).

M : Poids de l'extrait (mg).

1. 3. 2. Dosage des Flavonoïdes Totaux, TFC (Total Flavonoid Content)

La quantification des flavonoïdes dans les extraits est basée sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. La méthode de **Topçu et al., (2007)** a été utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque.

❖ Protocole expérimental

50µl de chaque extrait de fruit de ((S1) : 1 mg d'extrait/ 1 ml du méthanol), ont été mélangés avec 130 µl de méthanol (MeOH), un volume de 10 µl d'une solution préparée à

partir de 9.80 g de CH_3COOK dissoute dans 100 ml d'eau distillée est ajouté, puis 10 μl de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$) (10% dans de l'eau distillée) sont additionnés.

La mesure de l'absorbance du mélange a été effectuée à une longueur d'onde de 415 nm après une incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 40 minutes.

➤ Un blanc échantillon est identiquement préparé, sans les réactifs (50 μl extrait + 150 μl méthanol).

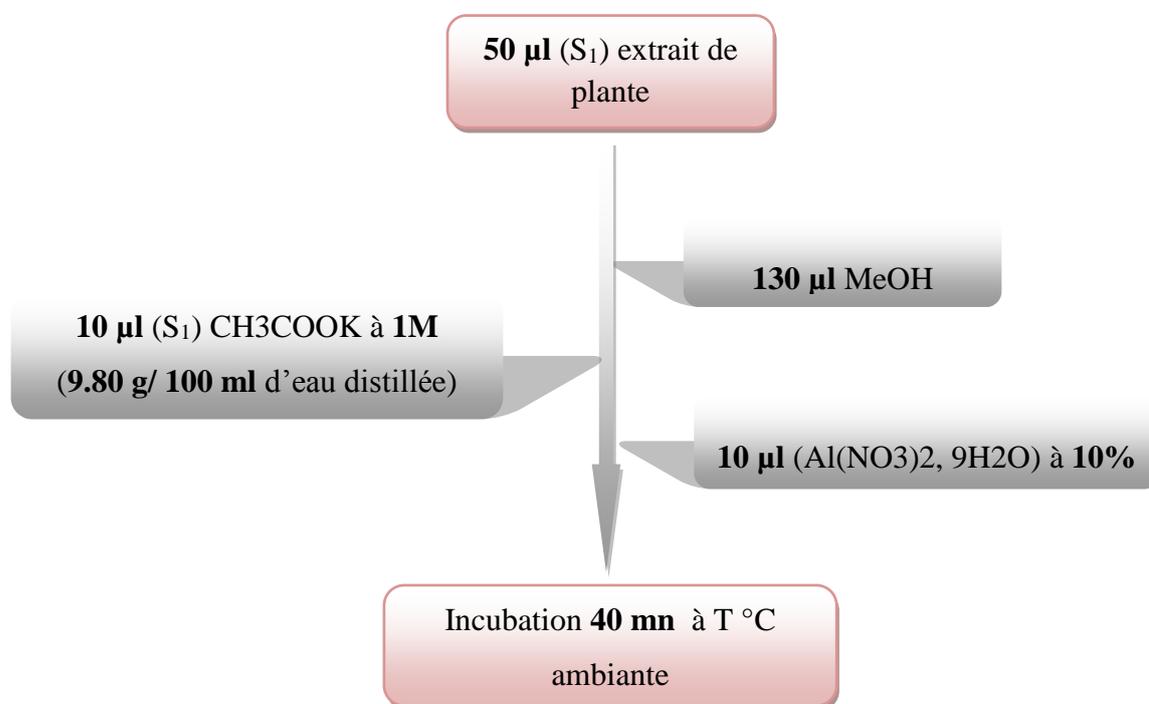


Figure 21 : Schéma du protocole de dosage des Flavonoïdes Totaux **TFC**.

Source : (Topçu *et al.*, 2007).

⚙️ Teneur en Flavonoïdes Totaux (TFC)

Une courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavonoïdes contenus dans nos extraits est déduite, a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant la quercétine (1mg/5ml MeOH) comme substance de référence à différentes concentrations (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$).

✚ Les résultats obtenus, sont exprimés en μg d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec des différentes parties de la grenade ($\mu\text{g EQ/mg ESG}$), en utilisant l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage tracée avec cette dernière.

En appliquant la formule suivante :

$$\text{TFT} = \text{C} \cdot \text{V} / \text{M}$$

Où :

C : [Q] $\mu\text{g/ml}$.

V : Volume d'extrait (ml).

M : Poids extrait (mg).

I. 4. Etudes *in vitro* et évaluations biologiques

❖ Principe de travail

✚ Pour les activités biologiques testées *in vitro* une microplaque à 96 puits, de volume 200 μl a été utilisée et les essais répétés trois fois pour chaque dilution, sachant que leurs disposition dans les puits se fait de la plus faible concentration jusqu'à la plus forte.

✚ Pour toutes les lectures, les absorbances ont été mesurées via un lecteur de microplaque *Multi-mode EnSpire^R* PerkinElmer.

❖ Préparation des dilutions des extraits

Une gamme de sept dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) a été établie pour les trois extraits, en partant de deux concentrations de solution mère :

- ✓ 4mg/ 1 ml de MeOH pour l'extrait de graines et le jus, pour obtenir les concentrations [200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125] $\mu\text{g/ml}$.
- ✓ 1mg/ 1 ml de MeOH pour l'extrait de pelures pour obtenir les concentrations [800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5] $\mu\text{g/ml}$.

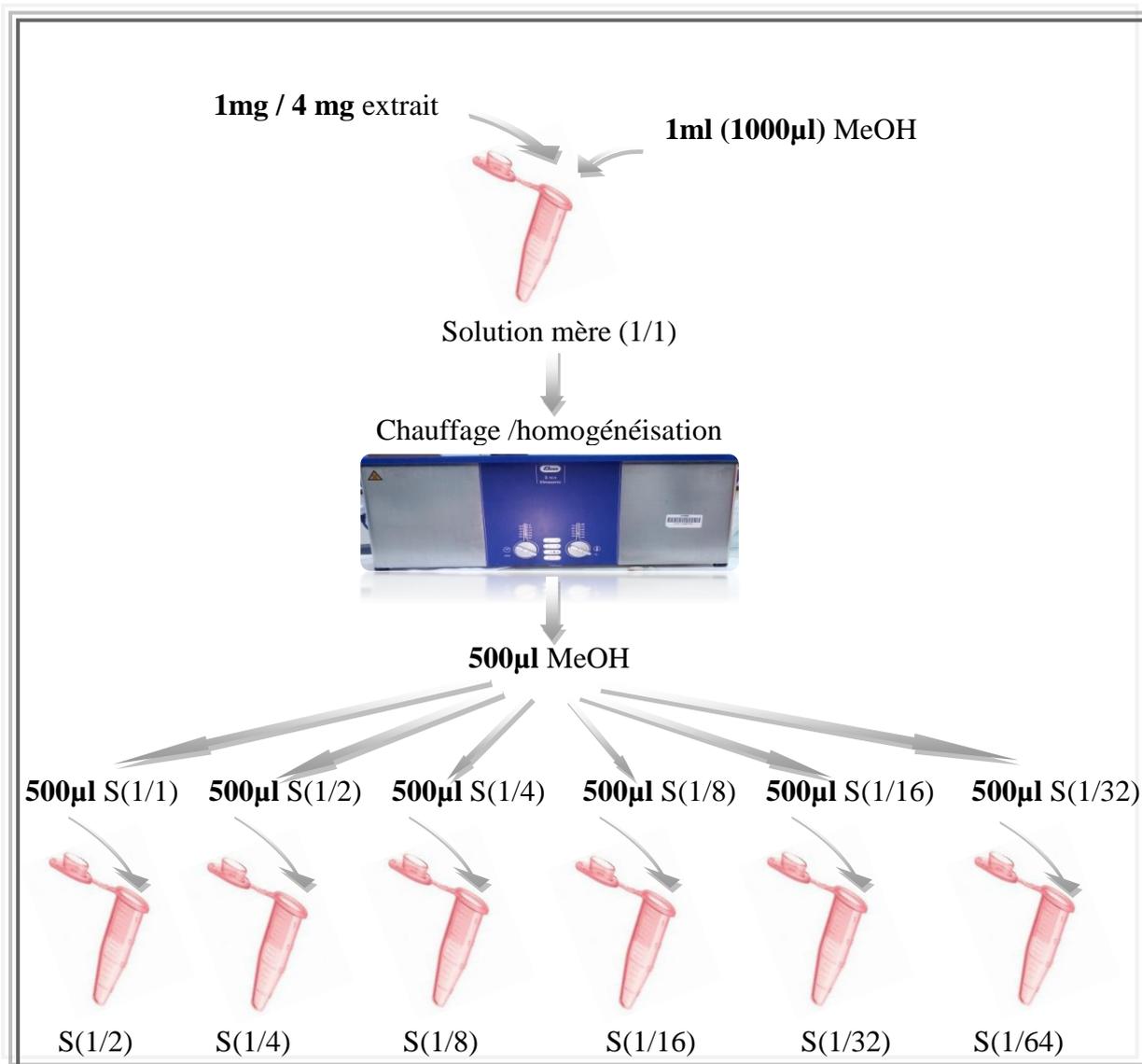


Figure 22 : Préparation des dilutions pour les activités biologiques.



Figure 23 : La gamme de dilution des extraits.

I. 4. 1. Etude de l'activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des trois différents extraits de fruit de *Punica granatum* L., six méthodes détaillées prochainement ont été réalisées.

1. Etude de l'effet scavenger contre le radical DPPH

L'activité anti-radicalaire libre a été mesurée selon le protocole de dosage du DPPH décrit par **Blois, (1958)**.

❖ Protocole expérimental

Un volume de 160 μ l de la solution méthanolique du DPPH (6 mg /100 ml) a été ajoutés à 40 μ l de chaque dilution, ensuite la microplaque a été placée dans l'obscurité et à température ambiante. 30 minutes plus tard l'absorbance de chaque concentration a été mesurée à 517 nm.

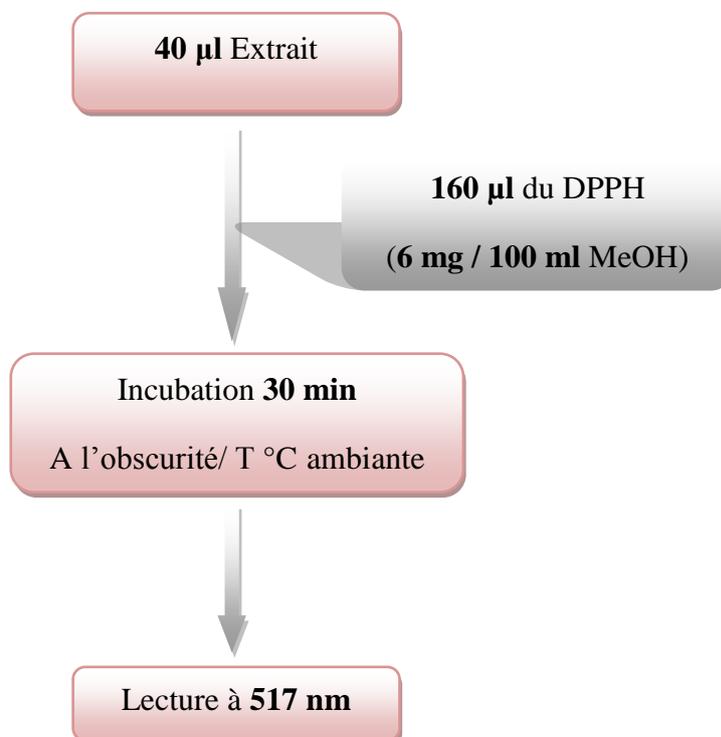


Figure 24 : Schéma du protocole de l'activité scavenging du **DPPH**.

Source : (Blois, 1958).

➤ Un contrôle négatif a été préparé, en mélangeant 40 µl de méthanol avec 5 ml de la solution de DPPH.

➤ Les résultats de l'activité obtenus pour chacun des extraits testés sont comparés à ceux de trois standards antioxydants l'α-tocophérol, BHT et BHA à différentes concentrations.

❖ **Expression des résultats**

✚ **Calcul des pourcentages d'inhibitions**

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, calculé suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, à partir de la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs Extrait}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Tels que :

- ✓ Abs contrôle est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.
- ✓ Abs Extrait est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

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

Le pourcentage d'inhibition est utilisé pour calculer la valeur d'IC50, qui est défini comme étant la concentration qui cause 50% de réduction de la concentration du radicale libre DPPH•, elle est obtenue graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées.

La plus faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure de l'extrait.

2. Activité du piégeage de l'ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS^{•+}, a été déterminée selon la méthode de **Re et al., (1999)**, avec de légères modifications.

❖ Protocole expérimental

160 µl de la solution de l'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 40 µl de la solution d'extrait à différentes concentrations, la microplaque a été placée ensuite dans l'obscurité et à température ambiante toutes les 10 minutes d'incubation. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

➤ Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 40 µl de méthanol avec 160 µl de la solution de l'ABTS^{•+}.

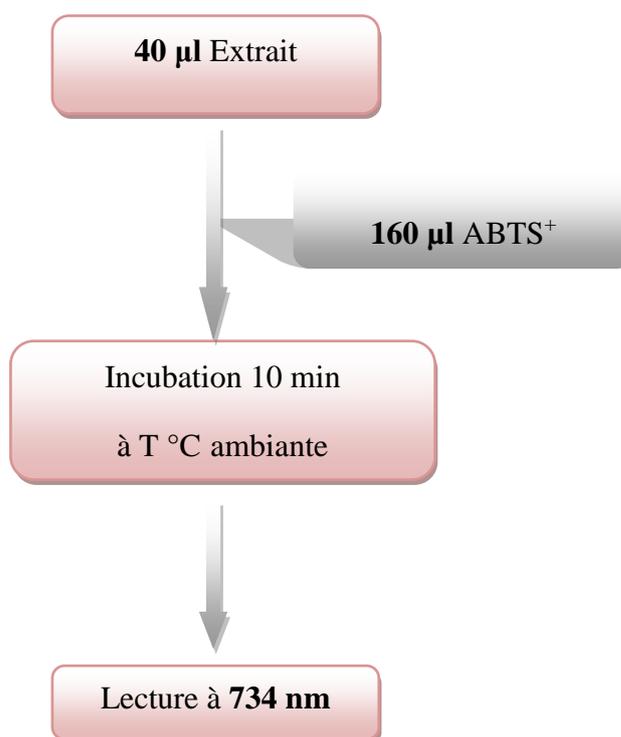


Figure 25 : Schéma du protocole de l'activité du piégeage de l'ABTS^{•+}.

Source : (Re et al., 1999).

✚ La capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée en utilisant la même équation précédemment utilisée pour la méthode du DPPH.

3. Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)

L'activité de piégeage de radical libre Galvinoxyl est déterminée par la méthode décrite par Shi *et al.*, (2001).

❖ Protocole expérimental

40 µl des trois extraits sont mis dans les puits de microplaque, suivis par 160 µl du radical Galvinoxyl à 0,1mM (4 mg dans 100 ml MeOH). Le tout est incubé pendant 120 minutes, ensuite une lecture à 428 nm à été réalisée.

- Un contrôle négatif a été fait, en remplaçant les extraits par le méthanol.
- Le BHT et BHA à différentes concentrations, ont été utilisés comme standards antioxydants.

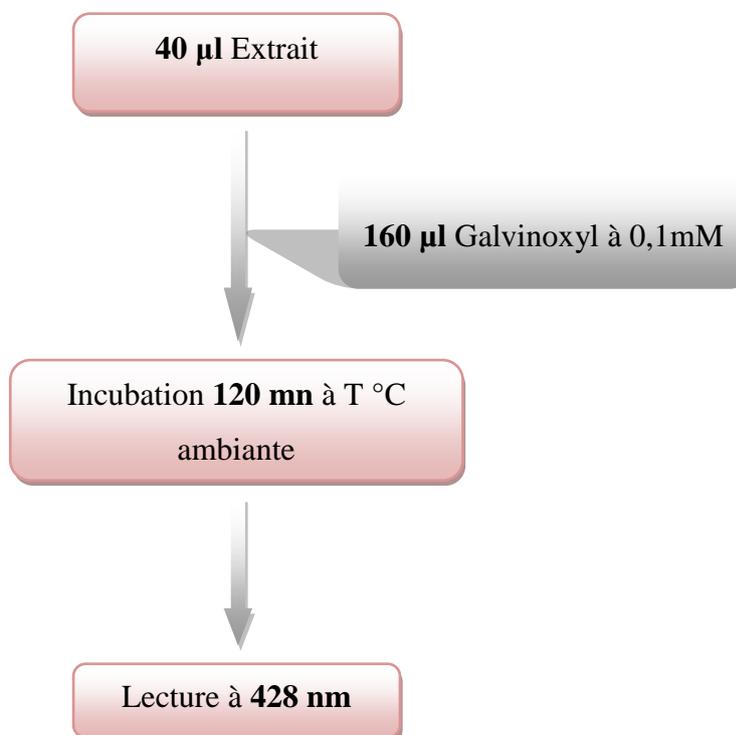


Figure 26 : Schéma du protocole du Test GOR.

Source : Shi *et al.*, (2001).

✚ La capacité de piégeage du radical Galvinoxyl a été déterminée en pourcentage d'inhibition et calculée en utilisant la même équation que les deux méthodes précédentes.

4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par **Apak et al., (2004)**.

❖ Protocol experimental

Une solution (S1) à PH=7.0 a été préparée à partir de 1,927g d'Acétate d'ammonium (ACNH₄) et 25 ml d'H₂O, une deuxième solution (S2) a été réalisée avec 0,039g de Neocupronin dissoute dans 25 ml de MeOH, et une troisième solution (S3) a été préparée avec 0,042625g de (Cu Cl₂, 2H₂O) dissoute dans 25 ml d'H₂O.

Puis, 60 µl de(S1), 50 µl de (S2) et 50 µl de (S3), ont été ajoutés respectivement à 40 µl des différentes concentrations d'extraits. La microplaque a été mise à l'abri de la lumière, et après 1 h d'incubation l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

- Le contrôle négatif a été effectué en remplaçant les extraits par le méthanol.
- Le BHA et le BHT ont été pris comme standards antioxydants pour ce test.

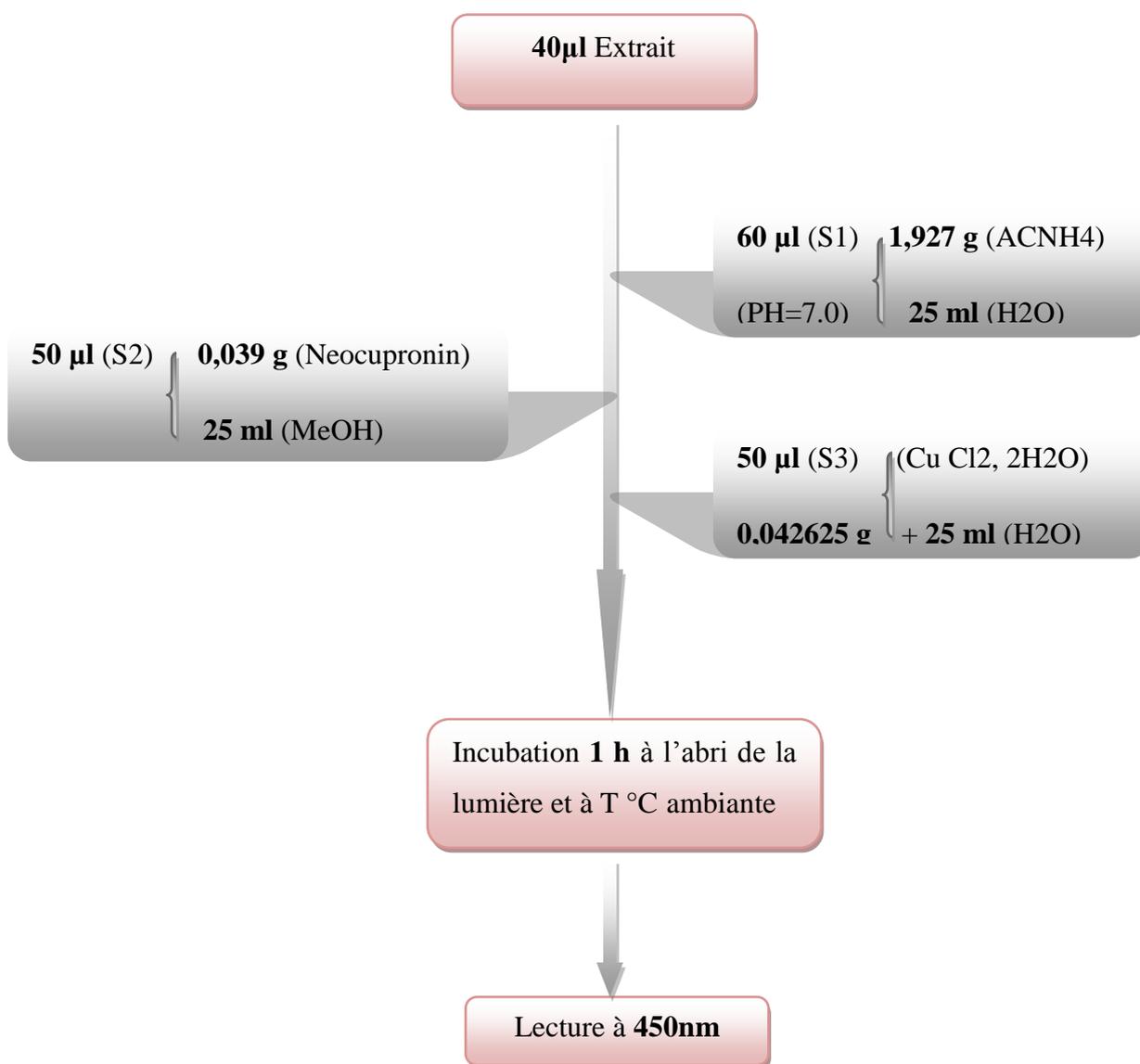


Figure 27 : Schéma du protocole du Test **CUPRAC**.

Source : Apak *et al.*, (2004).

❖ Expression des résultats

Une absorbance élevée correspond à un pouvoir supérieur. D'autre part, les résultats sont exprimés en concentration effective (CE_{50} , $\mu\text{g/ml}$), qui est la concentration de l'extrait indiquant 0,50 d'absorbance. La valeur de CE_{50} est obtenue par interpolation de la courbe de régression linéaire, (Mau *et al.*, 2004).

5. Test du pouvoir réducteur du fer (reducing power)

L'activité Reducing power a été déterminée par la méthode d'**Oyaizu, (1986)** avec une légère modification.

❖ Protocol experimental

10 µl de chaque dilution des trois extraits sont mis dans les puits de microplaque auxquels sont ajoutés 40 µl de tampon phosphate à pH (6.6), puis 50µl de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1% (1 g de $K_3Fe(CN)_6$ dans d'H₂O).

Après 20 minutes d'incubation à 50⁰C, 50µl d'acide trichloracétique (TCA) à 10%, puis 40 µl d'H₂O et finalement 10 µl de chlorure ferrique FeCl₃ (0.1% dans d'H₂O) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 700 nm.

- Le contrôle négatif a été réalisé en remplaçant les extraits par le méthanol.
- L'acide ascorbique, l'acide Tannique et l'acide α-Tocophérol à différentes concentrations ont été utilisés comme contrôle positif.

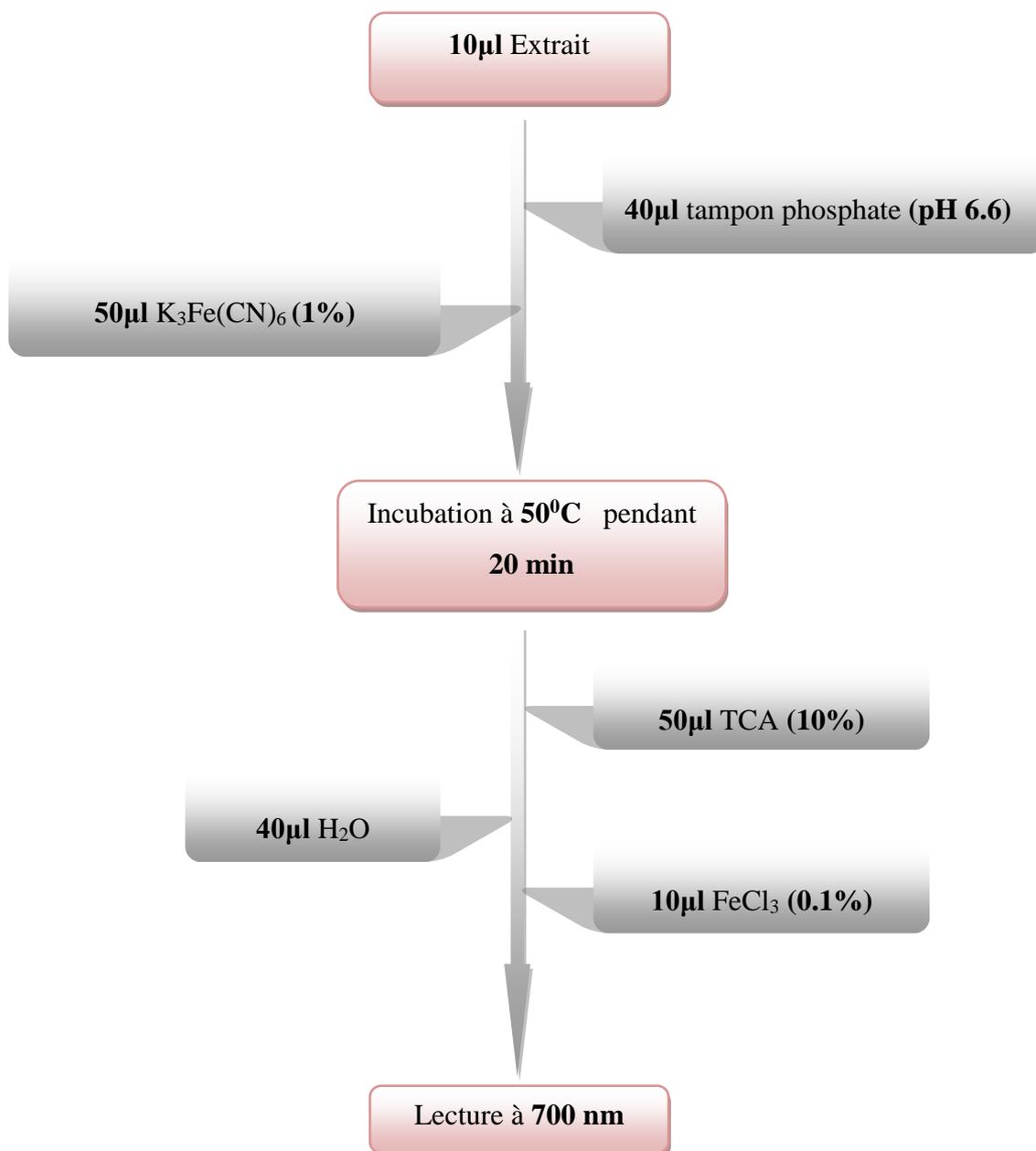


Figure 28 : Schéma du protocole du test **Reducing power**.

Source : Oyaizu, (1986).

✚ les résultats ont été calculés tel que pour le test précédent.

6. Activité de Phenanthroline

L'activité de phenanthroline est déterminée par la méthode de **Szydłows Czerniaka, (2008)**.

❖ Protocole expérimental

Un volume de 50 μl de FeCl_3 à 0.2%, 30 μl de la solution méthanolique de Phenanthroline (0.5%) et 110 μl de méthanol MeOH, sont respectivement ajoutés à un volume de 10 μl de chaque extrait.

↳ L'incubation a été faite à 30°C pendant 20 min dans l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 510 nm.

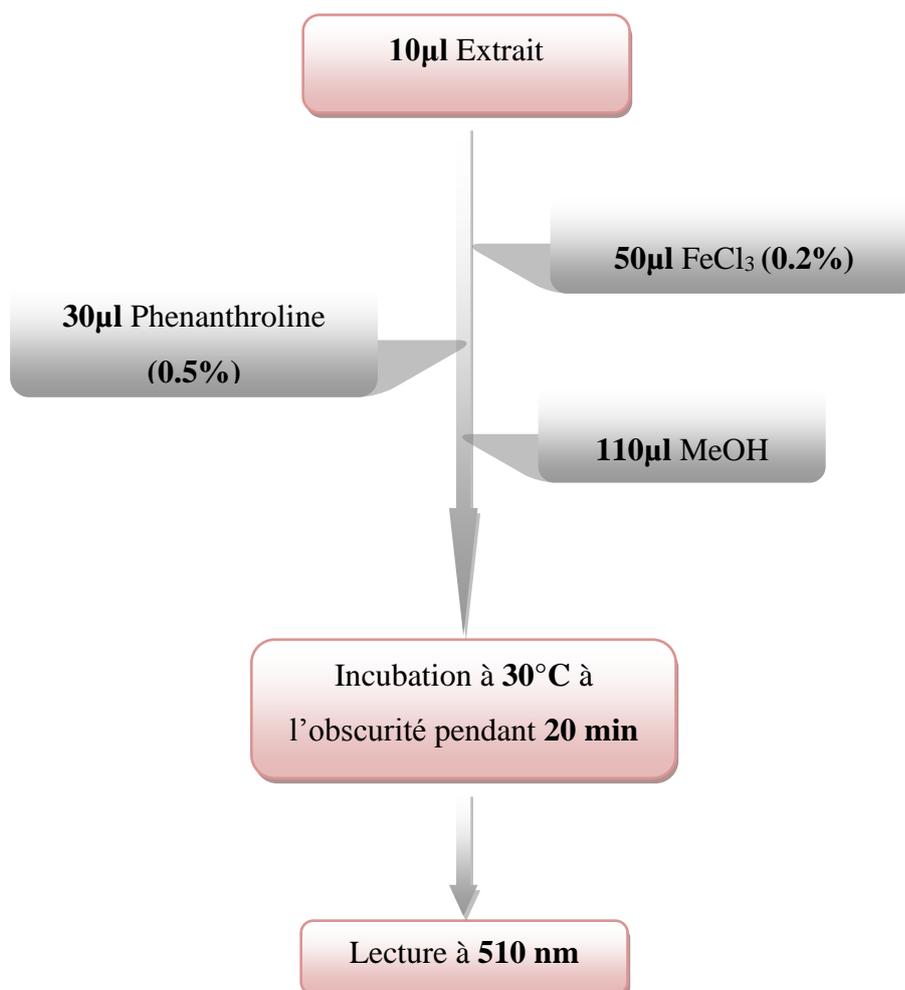


Figure 29 : Schéma du protocole l'activité de Phenanthroline.

Source : Szydłows Czerniaka, (2008).

- Le contrôle négatif a été parallèlement préparé dans les mêmes conditions et avec les mêmes solutions, en remplaçant seulement les extraits par le solvant de dilution le méthanol.
- Le contrôle positif est réalisé avec une solution d'un antioxydant standard le BHT, l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions expérimentales.

✚ Les résultats ont été calculés tels que pour les deux tests précédents.

I. 4. 2. Etude de l'activité enzymatique

1. Activité anti-Alzheimer ou Anti-cholinestérase (AChE)

L'estimation de la capacité d'inhibition de Acétylcholinestérase a été déterminé avec une modification légère de la méthode spectrophotométrique décrite par **Ellman et al., (1961)**.

❖ Protocol expérimental

150 µl de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 µl d'une solution d'extraits à différentes concentrations et un volume de 20 µl de solution d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 25⁰ C. Puis 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 10 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM).

↳ Deux lectures sont réalisées :

- ✓ La première a été faite à un temps 0 minute, juste après la manipulation
- ✓ La deuxième, après 15 minutes d'incubation à 37°C.

L'hydrolyse de ces substrats a été suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 412 nm. La formation d'une couleur jaune de l'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, est le résultat de la réaction de DTNB avec la thiocholine libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine.

- Le contrôle négatif a été préparé par la substitution de chaque extrait par le méthanol (Méthanol avec le tampon phosphate, pH 8).

- Le galantamine est utilisé comme composé de référence.

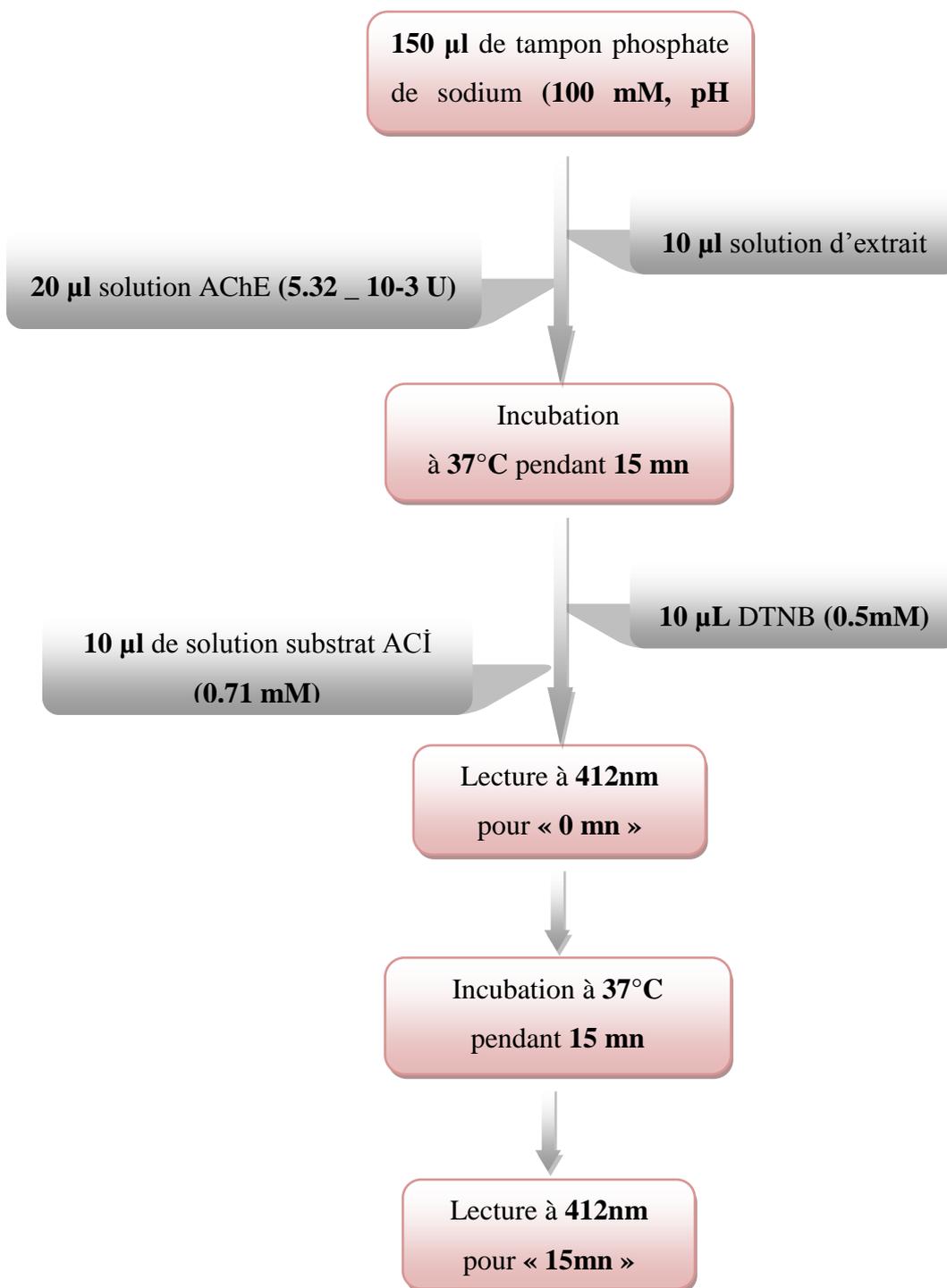


Figure 30 : Schéma du protocole de l'activité AChE.

Source : (Ellman et *al.*, 1961).

✚ Le pourcentage d'inhibition de l'ACHé a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction des solutions d'extraits par rapport à un contrôle négatif en utilisant la formule suivante :

$$I\% = (E - S) / E$$

Où

E : l'activité de l'enzyme sans extrait.

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

2. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase est déterminée selon la méthode de **Sinéad et al., (2013)**.

❖ Protocole expérimental

100 μ l de solution d'enzyme α -glucosidase (0,1U/ml) (1mg/ 9,8 ml de tampon phosphate (100mM, pH 6,9)) ont été ajoutés à 50 μ l d'extrait dans chaque puits, puis la réaction a été initiée par l'ajout de 50 μ l de solution de substrat p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (5 mM) (15,06 mg/ 10 ml du même tampon phosphate).

La lecture des absorbances à 405 nm est faite à 0 min et dans un deuxième temps, après 30 min à 37°C.

- Le contrôle négatif a été préparé tel que précédemment.
- L'acarbose a été utilisé comme standard pour ce test.

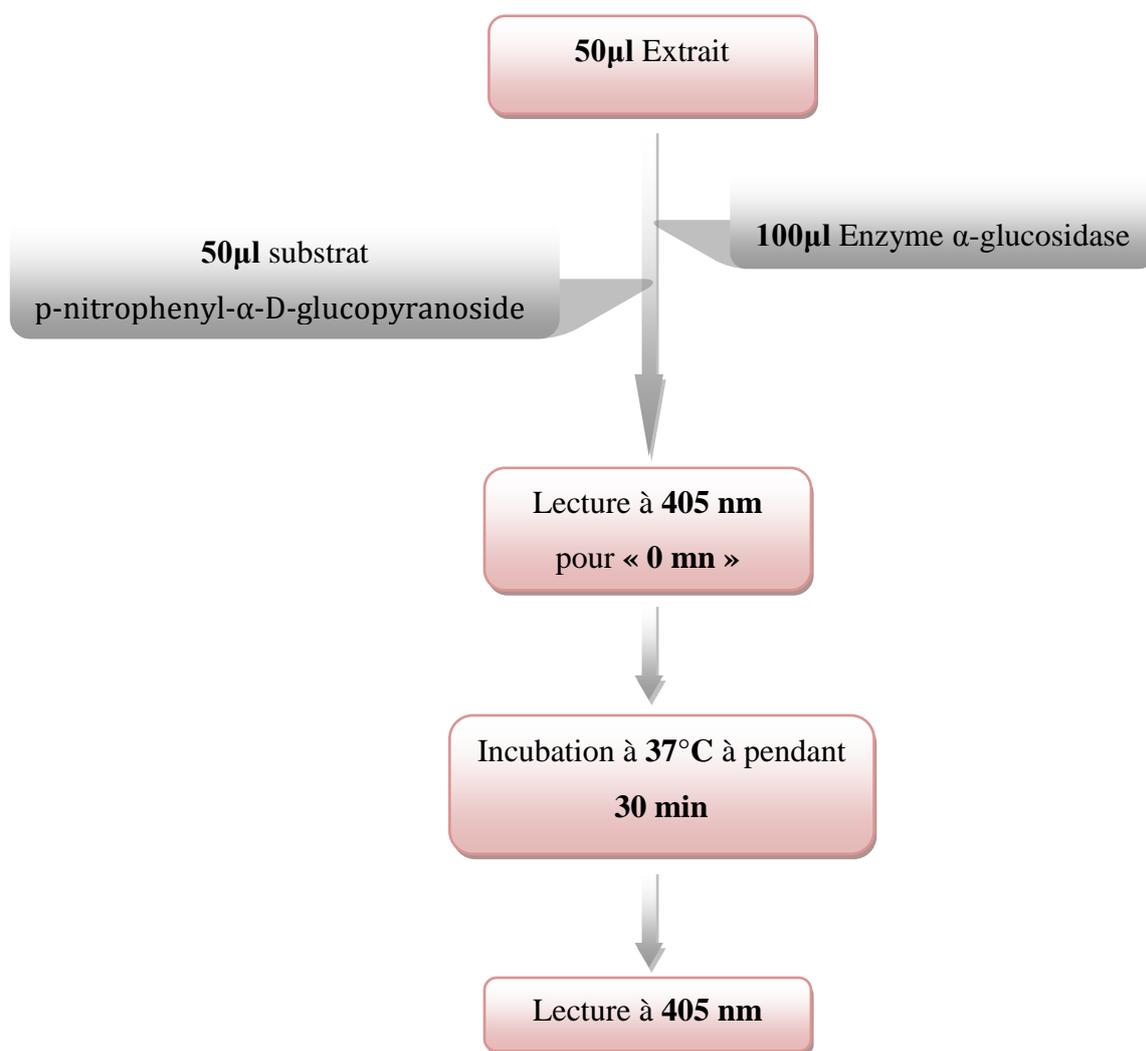


Figure 31 : Schéma du protocole de l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase.

Source : Sinéad *et al.*, (2013).

❖ Calcul de résultats

Le pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase a été déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{\% d'inhibition} = [(\text{Abs Extrait} - \text{Abs Blanc}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Où

Contrôle : l'activité de l'enzyme sans extrait.

Blanc : l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

3. Activité inhibitrice de la tyrosinase

L'activité inhibitrice de la tyrosinase est déterminée selon la méthode décrite par **Deveci et al., (2018)**.

❖ Protocol expérimental

150 µl de Tampon à PH (6.8) sont mis dans une microplaque multi-puits, ensuite un volume de 10 µl d'extraits et 20 µl d'enzyme Tyrosinase ont été ajoutés, le tout est incubé durant 10 mn à 37.

La réaction a été initiée par l'ajout de 20 µl de substrat L-DOPA, et une dernière incubation a été faite à 37° C durant 10 minutes. L'absorbance est lue à 475nm.

- Un contrôle négatif a été préparé, comme pour les tests précédents.
- Un volume de 10 µl de MeOH a été utilisé comme contrôle positif.

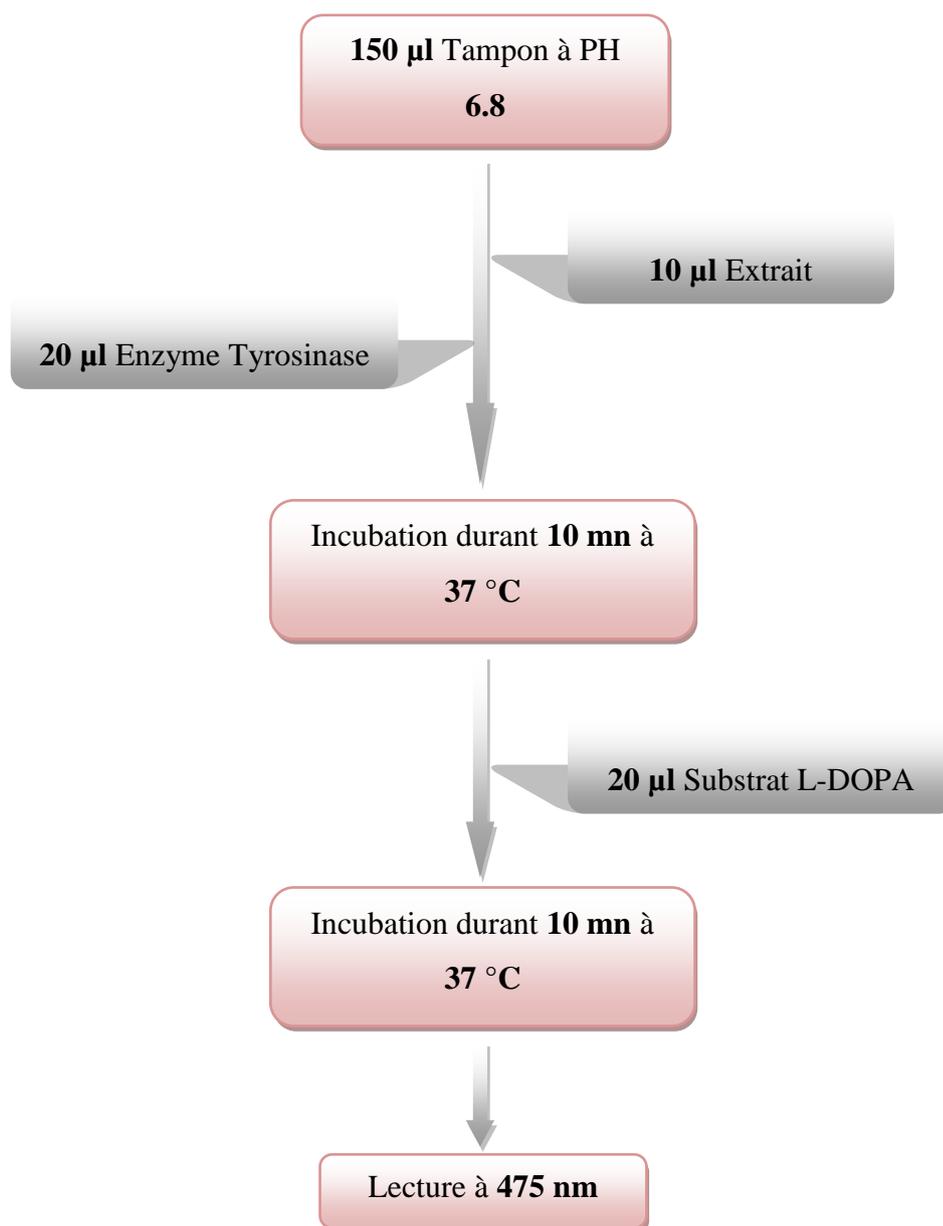


Figure 32 : Schéma du protocole de l'activité inhibitrice de la Tyrosinase.

Source : EbruDeveci et *al.*, 2018).

Etudes statistiques

Toutes les données expérimentales du dosage et l'évaluation des activités biologiques obtenues représentent la moyenne de trois essais \pm écart type (SD), réalisés à l'aide du logiciel Excel 2016 de régression linéaire.

Les coefficients de corrélation des courbes ont été déterminés avec le logiciel Microsoft Office Excel 2016, ainsi que les histogrammes et les courbes.

Chapitre 2 :

Résultats et discussion

II. 1. Analyse quantitative

II. 1. 1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

Les valeurs des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des trois extraits de grenade : épluchures (E), jus (J), graines (G), respectivement sont exprimés en μg équivalent :

- ❑ D'acide gallique par milligramme d'extrait sec (μg EAG/mg ES), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Fig. N°33**) pour le dosage des polyphénols.
- ❑ Et de quercétine (EQ) par milligramme d'extrait sec (μg EQ/mg ES) (**Fig. N°34**) pour le dosage des flavonoïdes.

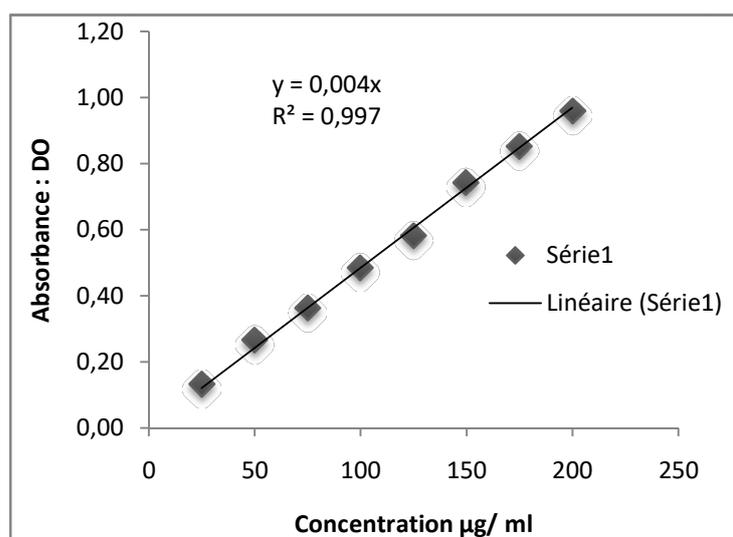


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'acide galique (μg EAG/mg ES).

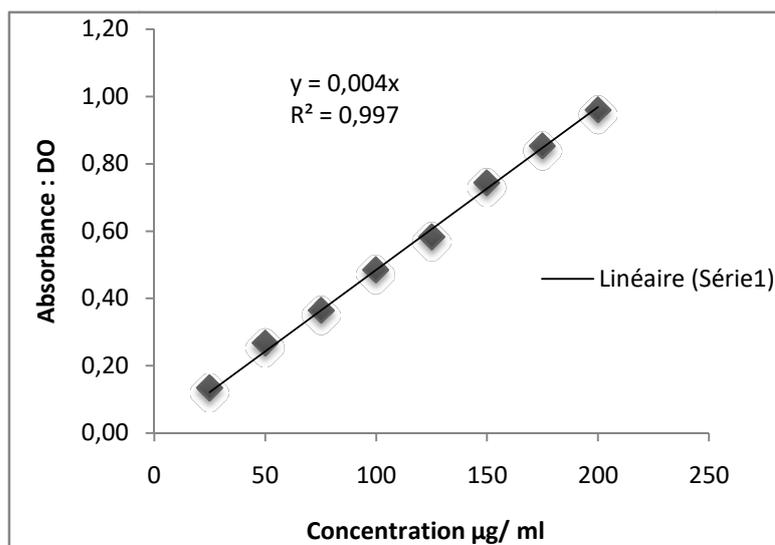


Figure 34 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine ($\mu\text{g EQ/ mgES}$).

↳ Les résultats obtenus sont reportés **table 8**.

Tableau 8 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des trois extraits de grenade.

Extrait	Total phenolic compounds content ($\mu\text{g GAE/ mg of extract}$)	Flavonoids content ($\mu\text{g QE/ mg d'extract}$)
E	699,29±0.00	95,41±3.53
J	60.27±23.42	12.08±0.58
G	28.01±11,53	12.84±1.03

* Les composés phénoliques totaux sont exprimés au μg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec de partie de grenade ($\mu\text{g GAE/ mg ESG}$).

** Les flavonoïdestotaux sont exprimés au μg équivalent de quercétine par mg d'extrait secde partie de grenade ($\mu\text{g QE / mg ESG}$).

- ✚ La teneur en composés phénolique totaux illustrée (**Fig. N°35**), montre une concentration en polyphénols fortement élevée dans l'extrait d'épluchure avec une valeur de $(699,29 \pm 0.00)$ $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$, suivie par une valeur relativement faible de $(60,27 \pm 23.42)$ $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$ pour l'extrait de jus, puis celle des graines avec $(28,01 \pm 11,53)$ $\mu\text{g EGA}/\text{mg ES}$.

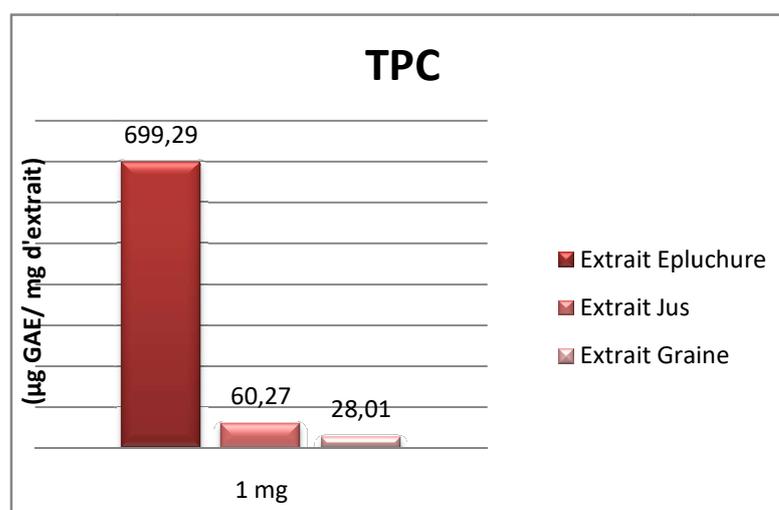


Figure 35 : Teneur en composés phénolique totaux.

- ✚ La teneur en flavonoïdes totaux présentée (**Fig. N°36**), montre également que l'extrait d'épluchure présente une teneur plus élevée en flavonoïdes $(95,41 \pm 3,53)$ $\mu\text{g EQ}/\text{mg ES}$, comparée à l'extrait de jus $(12,08 \pm 0,58)$ $\mu\text{g EQ}/\text{g ES}$, suivis par l'extrait de graines $(12,84 \pm 1,03)$ $\text{mg EQ}/\text{g d'ES}$.

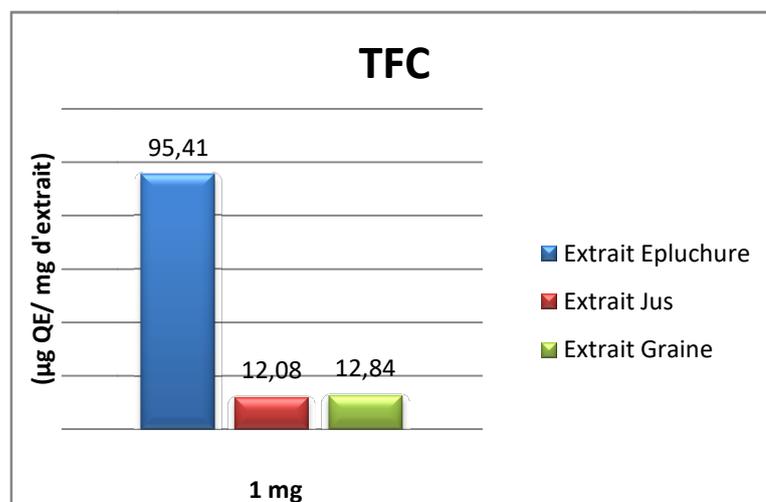


Figure 36 : Teneur en flavonoïdes totaux.

Ces résultats concordent avec ceux de **Parashar et al., (2014)** qui rapporte que la concentration totale en polyphénols et flavonoïdes serait plus importante dans l'écorce du grenadier, par rapport aux autres parties du même fruit. Même chose pour **Mirdehghan et al., (2007)** qui a montré que l'écorce de grenade est plus riche que les graines en polyphénols totaux.

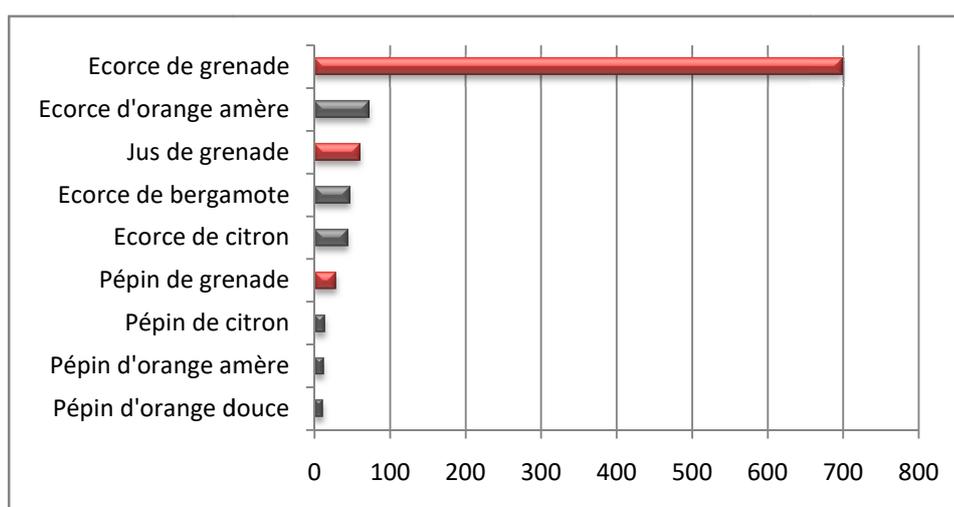


Figure 37 : Teneur en composants phénoliques totaux des trois extraits de grenade étudiés en comparaison avec quelques extraits méthanoïques d'agrumes, source (**Sarni –Manchado et Chevrier, 2006**).

II. 2. Évaluation des activités biologiques

Pour une évaluation et comparaison préliminaires des actions qui se produisent à l'intérieur des systèmes biologiques lors de la consommation des différentes parties du fruit de *Punica granatum* L. une batterie de tests *in vitro* a été initiée portant sur leur potentiel antioxydant et anti enzymatique.

II. 2. 1. Étude de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différentes parties du fruit de *Punica granatum* L. a été évaluée par les différentes méthodes suivantes : **DPPH, ABTS, GOR, CUPRAC, Reducing power, Phen essay.**

1. Le teste DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Le principe est de mesurer la capacité à inhiber le radical stable 1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl ou DPPH. Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité antioxydante de nombreux composés, dont les composés phénoliques des trois extraits étudiés ici. Les résultats obtenus sont présentés **Table.9** :

Tableau 9 : Inhibition du radical DPPH par les extrais des différentes parties du fruit de *Punica granatum* L. en fonction de leurs concentrations.

Extraits	% Inhibition de DPPH									
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC50 µg/ml
E	2,96±1,4 8	13,40± 1,62	30,39±2, 09	60,86±0, 80	82,69±1, 30	85,35±1, 24	86,85±2, 4	NA	NA	20,53±0.52
J	NA	NA	NA	NA	NA	2,54±1,2 8	10,74±0, 76	27,94±1, 62	55,53±3,7 4	>400
G	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7,23±3,6 6	17,56±1,3 8	>800
BHT	11,69±1, 88	22,21±1, 30	37,12±1, 80	52,63±2, 70	56,02±0, 53	83,60±0, 23	87,28±0, 26	95,38±0, 41	95,02±0,2 3	22,32±1.19
BHA	28,95±1, 16	54,33±1, 59	76,76±1, 65	84,09±0, 35	87,53±0, 82	87,73±0, 15	88,43±0, 23	89,36±0, 19	90,14±0,0 0	5.73±0.41

*NA : non attribué.

↪ Les résultats obtenus sont par la suite convertis en courbes comparatives **fig.38**.

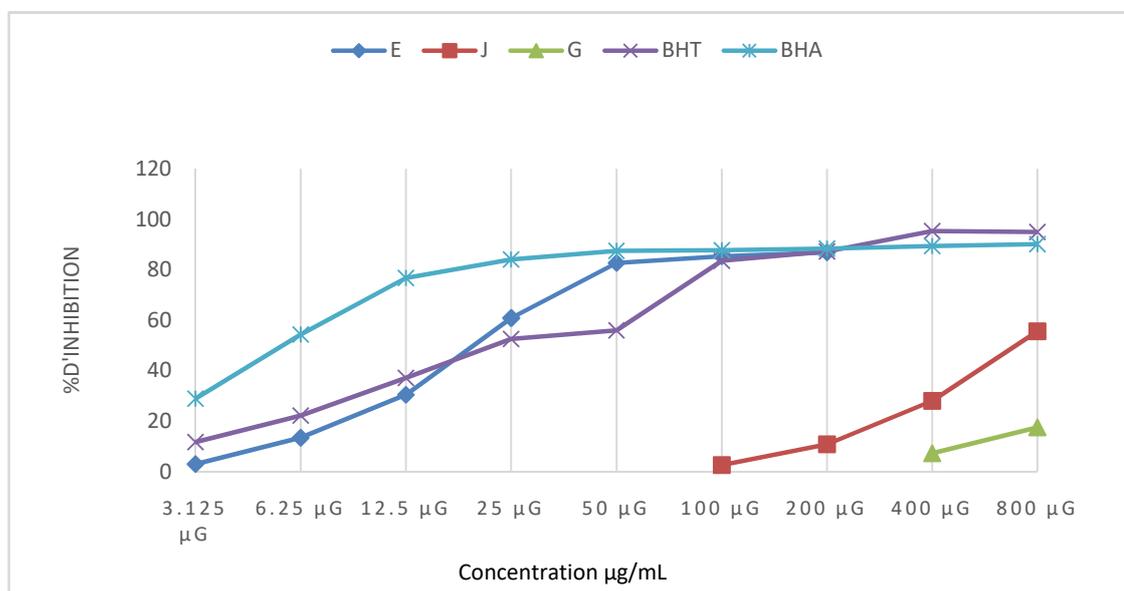


Figure 38 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de fruit de *Punica granatum* L.

Les profils de l'activité anti-radicalaire obtenue grâce à l'allure des courbes comparatives des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de *Punica granatum* L.

En fonction de leurs concentrations respectives (**fig.38**), révèlent que l'extrait éthanolique de l'écorce commence à donner son effet à une concentration relativement faible de 3.125 µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 2.96, atteint son IC₅₀ à une concentration de (20.53±0.52) µg/ml et plafonne à une concentration de 200 µg avec 86.85% de pourcentage d'inhibition. À noter également une cinétique de réaction quasiment identique à celle du standard commercial utilisé le BHT et très proche de celle du BHA.

Comparativement, l'extrait de jus donne un effet de piégeage plus faible que le premier et débute son effet d'inhibition de 2.54% à une concentration de 100 µg/ml, et n'atteint son IC₅₀ qu'à une concentration supérieure à 400 µg/ml, et stagne pratiquement après pour ne donner que 55.53% d'inhibition à 800 µg/ml.

L'extrait éthanolique des graines reste le plus faible, car il ne commence son effet qu'à une concentration de 400 $\mu\text{g/ml}$ avec un pourcentage d'inhibition de 7.23 et continue son faible pouvoir réducteur jusqu'à 800 $\mu\text{g/ml}$ en ne donnant que 17.56% d'inhibition, avec une IC_{50} négligeable supérieure à 800 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs des IC_{50} issus des trois extraits de grenade en comparaison avec des antioxydants existants sur le marché : BHA et BHT sont résumées dans l'histogramme (fig. N°39).

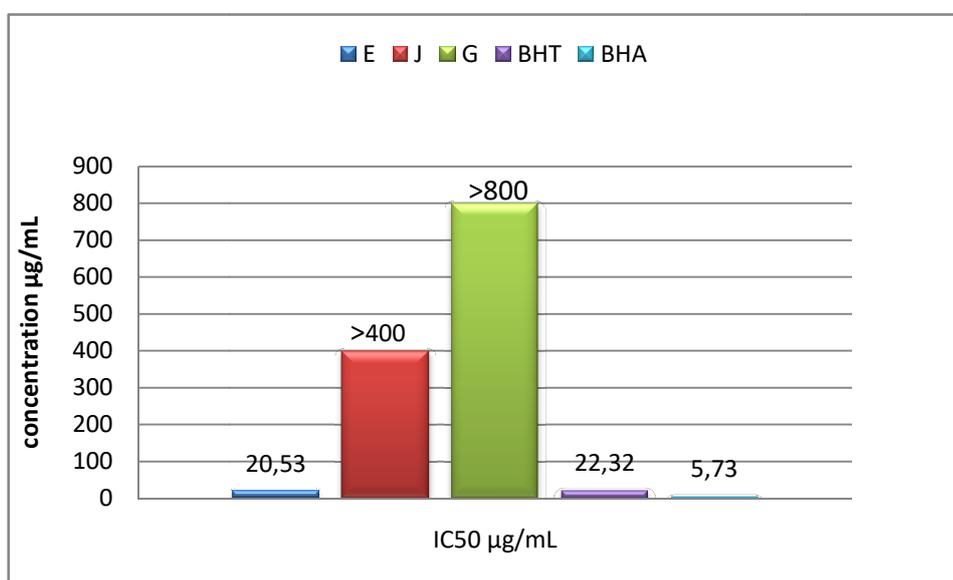


Figure 39 : Valeurs des IC_{50} issus des trois extraits de grenade comparativement aux standards.

L'effet anti-radicalaire des extraits étudiés représenté par leurs IC_{50} , montre des valeurs pour l'extrait d'épluchure presque identique à celle du standard utilisé le BHT et proche de celle du BHA.

En ce qui concerne les deux autres extraits (jus et graines), ils restent très inférieures comparativement aux standards employés BHT et BHA.

Ces résultats sont en accord avec **Negi et Jayaparakasha, (2003)**, qui ont rapporté que l'extrait d'écorces de la grenade présente une forte activité antioxydante pour le test de DPPH.

Une étude de **Zahin et al., (2010)** conduite sur l'extrait éthanolique de la peau de grenade donne pratiquement le même résultat avec 83.2% d'inhibition du radical DPPH avec une IC50 de 35 µg/ml.

Et d'après **Wang et al. (2011)**, il existe une corrélation forte entre l'activité antioxydante estimée par le test de DPPH et la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes de la peau de grenade avec un facteur de corrélation $R^2 = 0.98$.

2. Le test du piégeage du radical ABTS

Dans ce test, l'ABTS est oxydé par des oxydants à son radical $ABTS^+$, qui a une couleur intense. La neutralisation de ce dernier, pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire, se traduit par la décoloration de la solution, qui est considérée comme étant la capacité des composés à diminuer directement la couleur de radical $ABTS^{\circ+}$ (**Gulcin, 2010**).

↳ Les résultats obtenus exprimés en termes de concentration inhibitrice sont présentés dans **Table 10** :

Tableau 10 : Activité anti-radicalaire de l'ABTS par les extraits de fruit de *Punica granatum* L.

Extraits	% Inhibition ABTS									IC ₅₀ µg/mL
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	
E	19,69±3.87	33,37±1,77	69,28±2,13	91,85±0,31	92,25±0,12	Sat	Sat	-	-	9,51±0.48
J	NA	NA	NA	2,92±2,79	9,25±1,07	18,82±1,98	40,31±2,69	70,22±4,28	89,15±4,08	265,26±0.21
G	NA	NA	NA	NA	4,06±2,61	10,26±3,51	23,47±1,52	47,18±1,35	75,01±2,39	448,02±1.83
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.0	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	96.68±0.39	90.95±0,51	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

*NA : non attribué.

**Sat : saturé.

↳ Les résultats obtenus sont illustrés sous forme de courbes de pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait des différentes parties de la grenade.

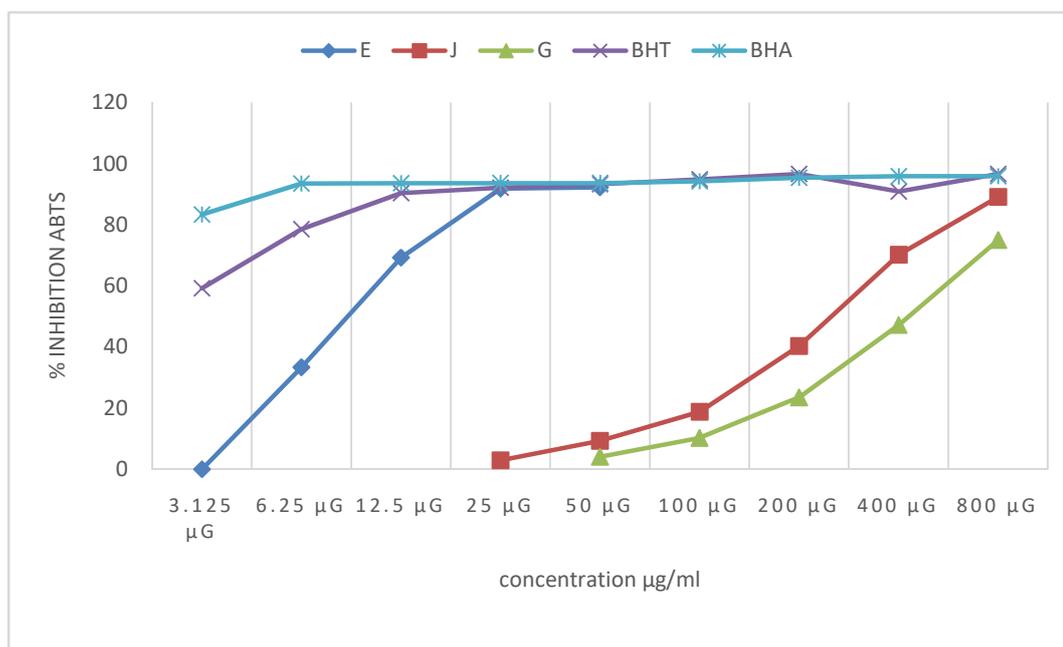


Figure 40 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de grenade.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait d'épluchure a un pouvoir inhibiteur du radical libre ABTS le plus significatif, avec un départ d'activité à la concentration de 3.125 µg/ml et une inhibition de 19.96%, il atteint son IC₅₀ à (9,51±0.48) µg/ml et plafonne son activité de 92.25% à une concentration de 50 µg/ml, il affiche également une cinétique très rapide proche de celle des standards commerciaux utilisés pour cette étude.

Pour l'extrait de jus il ne commence son effet qu'à la concentration 25µg/ml avec seulement 2.92% d'inhibition et donne son activité maximale de 89.15% à la concentration de 800 µg/ml, avec une IC₅₀ de (265,26±0.21) µg/ml.

L'extrait de graines quant à lui affiche une activité tellement faible qu'il débute son effet plus tardivement à 50 µg/ml avec 4.06%, atteint son maximum d'effet de 75.01% à 800 µg/ml. Et inhibe 50% des radicaux ABTS à (448.02±1.83) µg/ml.

↳ Les valeurs comparatives des IC₅₀ obtenus sont présentées à l'aide d'un l'histogramme (fig. 41) :

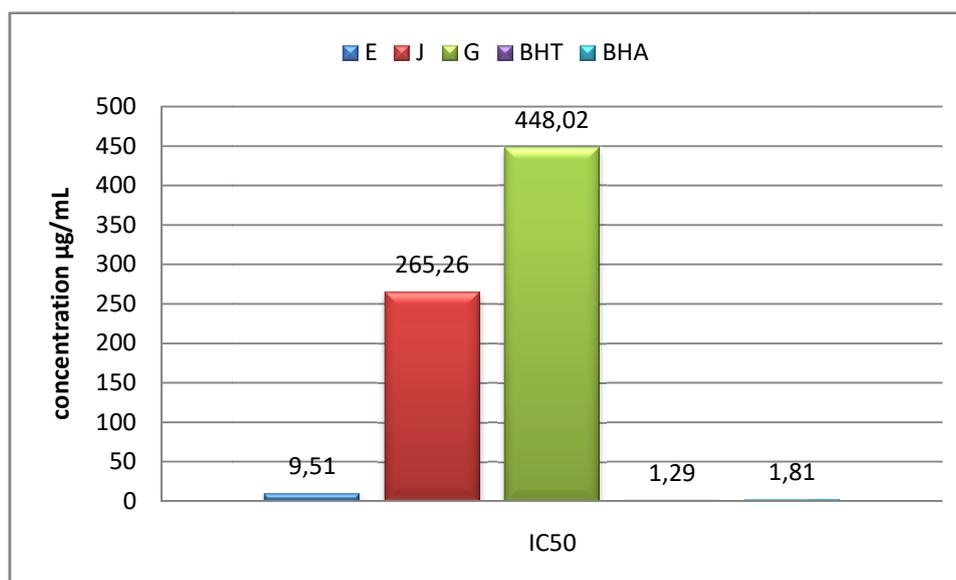


Figure 41 : Valeurs des IC₅₀ issu des trois extraits de grenade comparativement aux standards pour le test ABTS.

En conclusion, L'activité antioxydante des extraits des différentes parties de fruit de *Punica granatum* L. évaluée par le test ABTS, est présentée par la valeur IC₅₀ qui est la concentration nécessaire de l'extrait pour inhiber 50 % du radical ABTS, ces résultats sont comparés avec les deux standards utilisés BHA et BHT qui ont des IC₅₀ de (1.81±0.10) µg/ml et (1.29±0.30) µg/ml respectivement. Ce qui donne une estimation proche de (9,51±0.48) µg/ml pour l'extrait éthanolique d'épluchures, et faible pour l'extrait de jus (265,26±0.21) µg/ml et l'extrait de graines (448,02±1.83) µg/ml.

3. Test de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)

Les résultats obtenus pour ce test sont présentés dans **Table 11**.

Tableau 11 : Activité anti-radicalaire de Gor par les extrais de fruit de *Punica granatum* L.

Extracts	% inhibition de radical Galvinoxyl (GOR) scavenging assay									
	3.125µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
E	25,17±6,89	42,06±4,54	67,05±3,61	73,55±1,96	75,32±1,14	92,94±0,82	Sat			7.42±0.84
J			NA	NA	NA	NA	NA	NA	13,23±4,26	>800
G			NA	NA	NA	NA	9,32±2,40	26,33±2,36	53,09±0,15	753.47±6.24
	1.5625	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg			
BHT	34,66±2,62	49,23±0,77	61,29±0,69	8,89±0,26	70,02±0,50	70,49±0,55	71,13±0,74			3.32±0,18
BHA	25.99±2,56	39.15±0.88	54.16±0.27	65.02±1,26	70,19±0,51	70.32±0.65	70.60±0,10			5.38 ±0,06

*NA : non attribué.

Les résultats sont illustrés sous forme de courbe de pourcentage d'inhibition du radical Galvanoxyl en fonction des différentes concentrations pour chaque extrait des trois extraits de grenade.

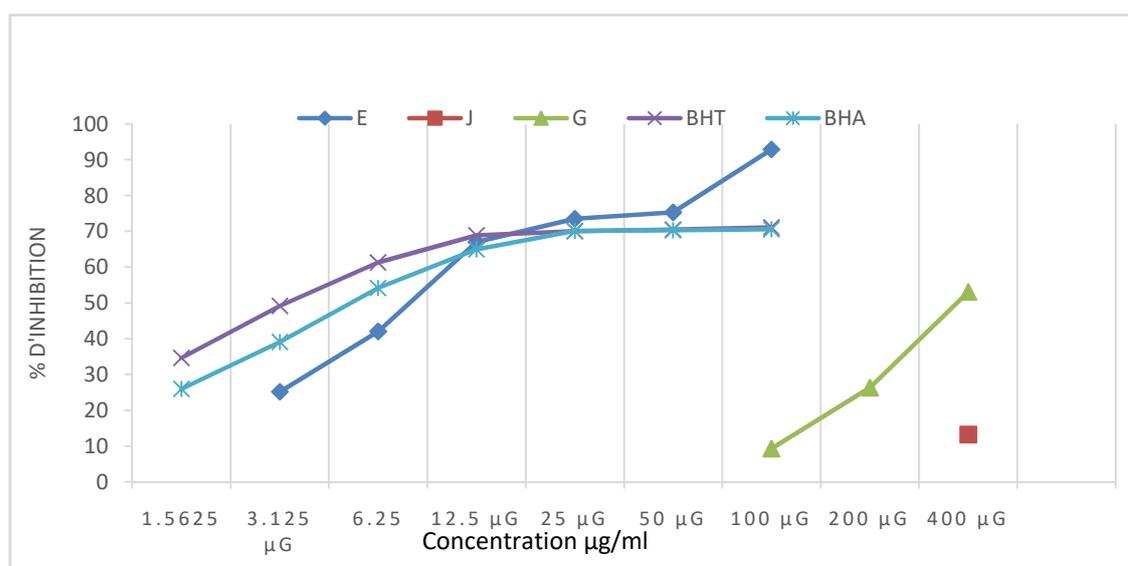


Figure 42 : Pourcentages d'inhibition du radical GOR des différents extraits de *Punica granatum* L. et standards utilisés.

L'activité antioxydante de fruit de *Punica granatum* L. évaluée par le test GOR est représentée par les différents pourcentages d'inhibition de chaque extrait en commençant par l'extrait le plus puissant qui présente l'activité la plus forte qui est l'extrait éthanolique d'épluchure qui débute son activité à une concentration 3.125 µg/ml et présente un pouvoir inhibiteur de 25.17%, atteint son IC50 à une concentration de (7.42±0.84) µg/ml pour avoir son effet maximal de 92.94% à la concentration 100 µg/ml.

Ce qui est tout à fait comparable à l'activité des deux standards utilisés pour ce test le BHT et BHA avec des IC50 de (3.32±0,18) µg/ml et (5.38 ±0,06) µg/ml respectivement, cela prouve l'importance du pouvoir antioxydant du radical GOR des épluchures de grenade.

Pour extraits de jus une faible activité est notée avec 13% d'inhibition à 800µg/ml, même chose pour l'extrait de graines qui débute l'inhibition du radical GOR à 9% pour une concentration de 200µg/ml et n'atteint son IC50 qu'à une concentration de (753.47±6.24) µg/ml ce qui est considérée comme une activité négligeable.

↳ L'effet antioxydant présenté par les valeurs des IC50 obtenus pour chaque extrait est en comparaison avec les IC50 des standards, est illustré **figure 43**.

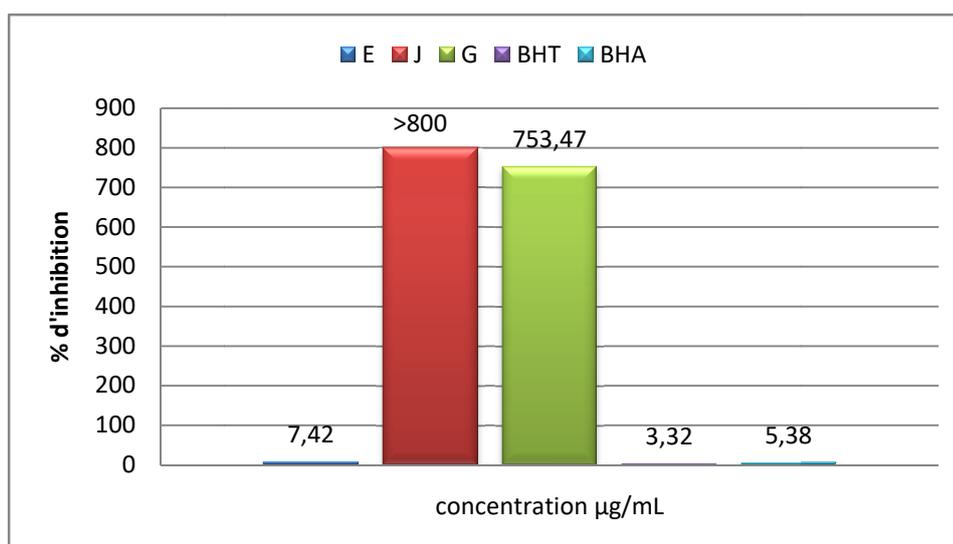


Figure 43 : Valeurs des IC50 issu des trois extraits de grenade comparativement aux standards.

L'évaluation de l'activité antioxydante pour l'inhibition du radical GOR par le standard BHT présente la valeur d'IC50 la plus faible ($3.32 \pm 0,18$) $\mu\text{g/ml}$ l'équivalent de l'effet le plus efficace, suivit par le deuxième standard le BHA avec un IC50 de ($5.38 \pm 0,06$) $\mu\text{g/ml}$ pas loin des deux standards vient l'extrait d'épluchure de grenade avec (7.42 ± 0.84) $\mu\text{g/ml}$ ce qui révèle un bon effet antioxydant naturel. Les extraits de jus et des graines présentent des valeurs d'IC50 de : (>800) et (753.47 ± 6.24) $\mu\text{g/ml}$ respectivement ce qui est très faibles vis-à-vis de l'inhibition du radicale GOR.

4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le test sert à évaluer la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), les résultats sont par la suite calculés à titre de A0.5 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. Ils sont présentés dans **table 12** :

Table 12 : Réduction du cuivre par les trois extraits du fruit de *Punica granatum* L.

Extrait	Absorbance de CUPRAC									A _{0,50} ($\mu\text{g/mL}$)
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg	
E	0,46 \pm 0,02	0,86 \pm 0,04	1,51 \pm 0,06	2,88 \pm 0,02	3,02 \pm 0,03	3,37 \pm 0,12	3,42 \pm 0,06	NT	NT	3.44 \pm 0,10
J	NA	NA	0,09 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,16 \pm 0,06	0,26 \pm 0,02	0,38 \pm 0,02	>800
G	NA	NA	0,09 \pm 0,05	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,00	0,17 \pm 0,04	0,17 \pm 0,04	0,27 \pm 0,01	0,42 \pm 0,00	>800
BHT	0.19 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	1.41 \pm 0.03	2.22 \pm 0.05	2.42 \pm 0.02	2.50 \pm 0.01	2.56 \pm 0.05	2.86 \pm 0.07	3.38 \pm 0.13	8.97 \pm 3.94
BHA	0.46 \pm 0.00	0.78 \pm 0.01	1,12 \pm 0,05	1,95 \pm 0,31	3,14 \pm 0,46	3,58 \pm 0,42	3,35 \pm 0,20	3,77 \pm 0,19	3,92 \pm 0,13	5,35 \pm 0,71

*NT: non attribué.

**A0.50 : la concentration à l'absorbance 0,5.

↳ Les résultats obtenus sont par la suite convertis en une courbe comparative (Fig. 44).

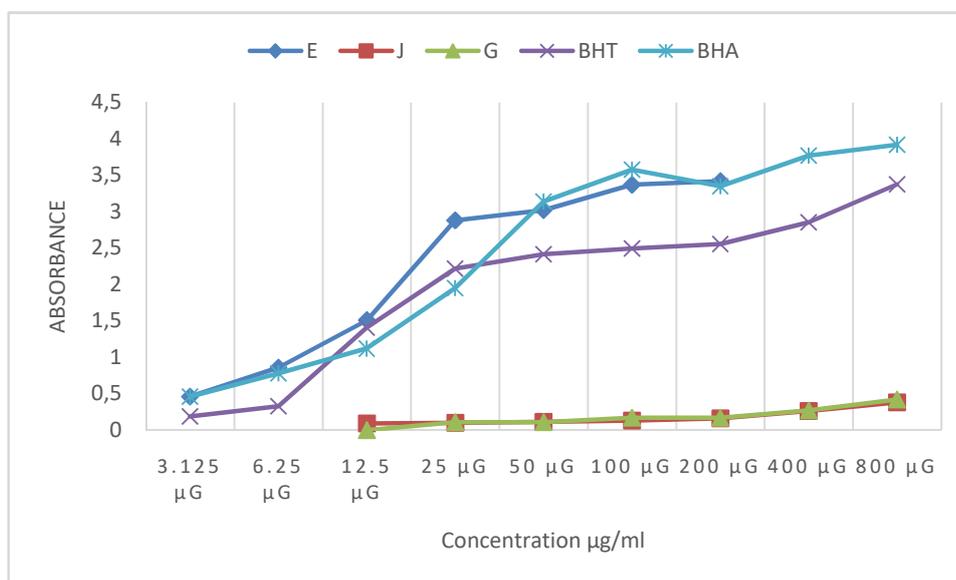


Figure 44 : Courbe comparative des pourcentages d'inhibition du test CUPRAC par les trois extraits de grenade.

La capacité de réduction des trois extraits du fruit de *Punica granatum* L. a été comparée à celles de BHA et du BHT. Une cinétique presque analogue est observée entre l'extrait d'épluchure et les deux standards utilisés. L'effet réducteur d'extrait éthanolique d'épluchure commence à une concentration de 3.125 µg/ml et présente déjà une absorbance de 0.46, pas loin de cette concentration il atteint son A0.5 avec une concentration de (3.44±0,10) µg/ml, pour aboutir à sa réduction maximale avec une absorbance de 3.42 à la concentration 200 µg/ml.

Pour l'extrait de jus et de graines, il ne présente pas un effet réducteur notable.

Pour évaluer l'effet antioxydant d'un composé, il faut le comparer avec les antioxydants les plus puissants existant au marché, l'histogramme suivant permet de faire cette comparaison.

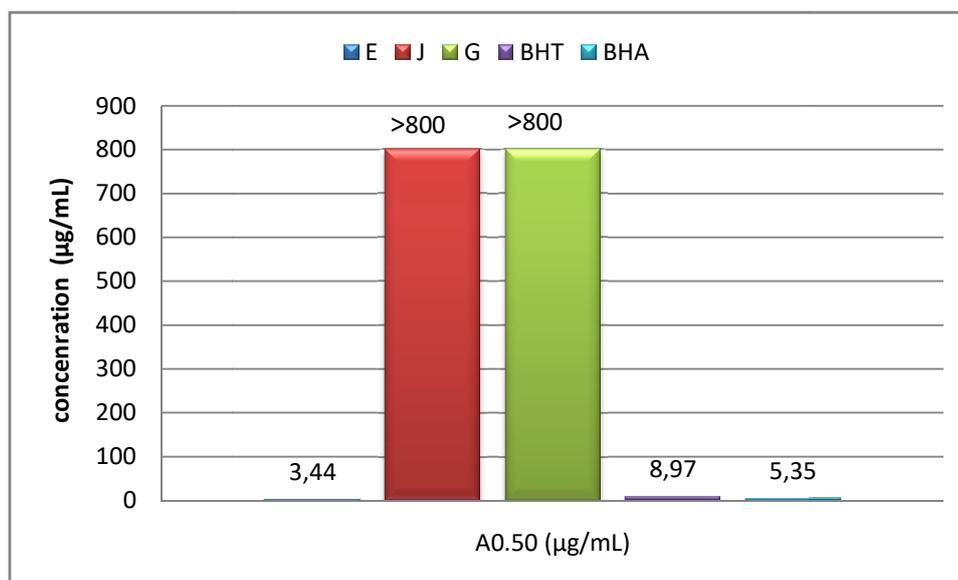


Figure 45 : Les concentrations des différents extraits et standards obtenus à l'absorbance 0.50.

L'effet réducteur des extraits est présenté par la valeur de concentration à l'absorbance 0.50, l'extrait éthanolique d'épluchure présente la concentration la plus petite avec une valeur de 3.44µg/ml comparativement aux standards, ce qui révèle un pouvoir réducteur le plus puissant qui dépasse même celui des deux standards BHT et BHA.

Ce qui permet de mettre à jour un nouvel antioxydant naturel avec un effet réducteur du cuivre aussi puissant et efficace que les antioxydants synthétiques présent sur le marché le BHA et BHT.

5. Test du pouvoir réducteur du fer (reducing power)

Le pouvoir réducteur Fe^{3+} et Fe^{2+} d'un composé est utilisé pour déterminer la capacité des antioxydants à donner les électrons et il est l'une des caractéristiques principales des composés phénolique (**Dorman et al., 2003**). Les résultats du pouvoir réducteur Fe^{3+} et Fe^{2+} exprimés en terme de A0.5 (µg / ml) sont présentés (**Table 13**) :

Tableau 13 : Absorbance de l'activité du pouvoir réducteur par les extraits de grenade.

Extracts	Absorbance d'activité reducing power							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0,5} µg/mL
E	0,05±0,00	0,14±0,03	0,22±0,03	0,41±0,05	0,72±0,08	1,00±0,03	1,14±0,44	32,20±3.43
J	0.06±0,01	0.06±0,00	0.06±0,01	0.06±0,01	0.06±0,01	0.07±0,00	0,10±0,01	>200
G	0.06±0,01	0.16±0,00	0.06±0,01	0.06±0,00	0.08±0,03	0.09±0,02	012±0,01	>200
Acide ascorbique	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6.77±1.15
Acide tannin	0.28±0.02	0,78±0,06	1,02±0,07	1,24±0,18	0,86±0,6	1,01±0,21	1,02±0,13	5.39±0.91
α-Tocophérol	0.11±0,00	0.16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34.93±2.38

*A_{0,50} : la concentration à l'absorbance 0,5.

↳ Les résultats calculés au titre de A0.5 pour l'ensemble des extraits et standards sont représentés à l'aide des courbes comparatives (**fig. 46**):

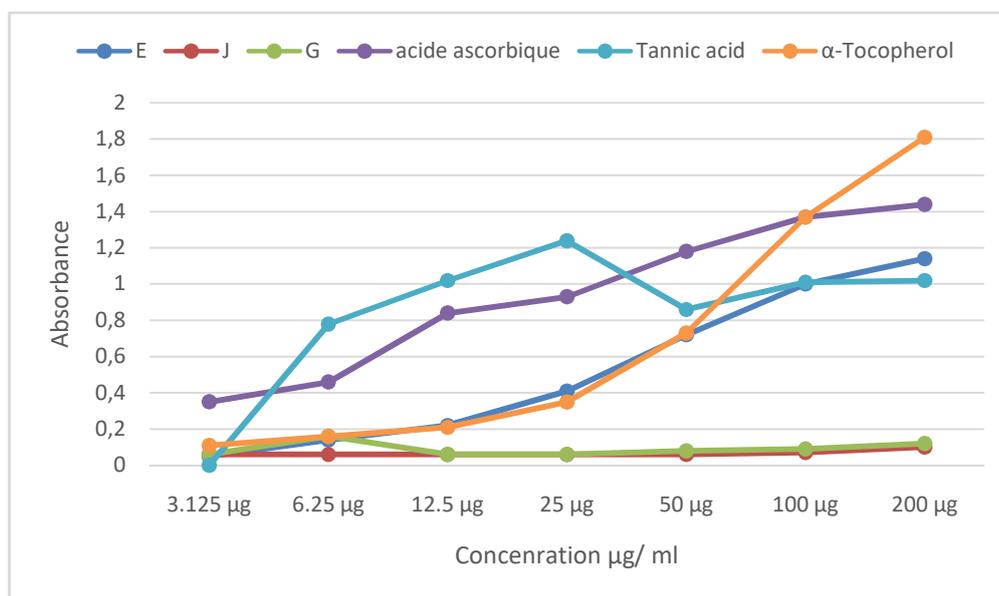


Figure 46 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'activité réductrice par les différents extraits et standards.

Pour le test du pouvoir réducteur Fe^{3+} et Fe^{2+} , trois standards industriels sont utilisés: acide ascorbique, acide tannique et α -Tocophérol, les courbes comparatives révèle une superposition de l'extrait d'épluchures et de l' α -Tocophérol jusqu'à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ce qui indique une cinétique identique, après cette concentration, elle rejoint celle de l'acide tannique. En effet cet extrait commence avec une faible activité de A 0.05 à une concentration de 3.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, continu son effet pour atteindre son A0.5 à (32,20 \pm 3.43) $\mu\text{g}/\text{ml}$ puis son maximum d'absorbance à 1.14 à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pour l'extrait de jus et des graines ils présentent également un effet faible pour ce test et n'aboutissent à leurs A0.5 qu'à des concentrations supérieures à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ce qui est considéré comme un effet négligeable.

Une meilleur connaissance du pouvoir réducteur Fe^{3+} et Fe^{2+} des trois extraits étudiés des histogrammes comparatifs de leurs A0.5 vis-à-vis les standards utilisé sont présentés **fig 47**:

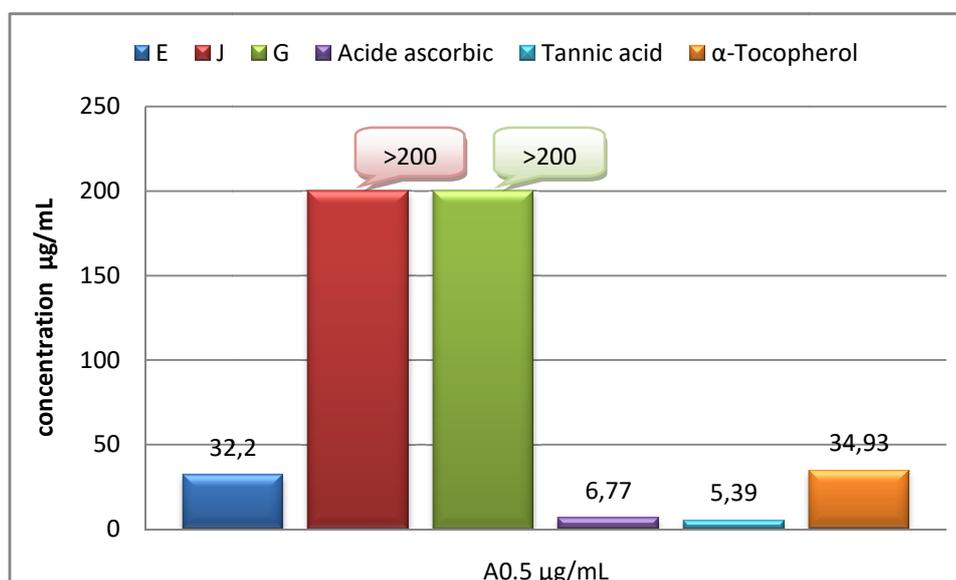


Figure 47 : Histogramme des valeurs IC50 des différents standards et extraits.

L'extrait d'écorce de grenade possède un potentiel intéressant de la réduction du fer oxydé avec une valeur de l'ordre de 32.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, meilleur à celle du α -Tocophérol avec 34.93

$\mu\text{g/ml}$ mais reste supérieur à celle de l'acide tannique et l'acide ascorbique qui présentent des valeurs de $6.77 \mu\text{g/ml}$ et $5.39 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

6. Activité de Phenanthroline

Tableau 14 : Absorbances des extraits de grenade par l'activité de phenanthroline.

Extracts	Absorbances de l'activité phenanthroline							
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	$A_{0.5} \mu\text{g/mL}$
E	0,32±0,01	0,37±0,03	0,46±0,06	0,71±0,09	1,22±0,22	1,95±0,09	3,93±0,44	14.04±2.35
J	0.24±0,00	0.25±0,01	0.27±0,02	0.27±0,01	0.28±0.01	0.29±0,01	0.35±0,11	>200
G	0.25±0,01	0.26±0,01	0.26±0,01	0.27±0,01	0.28±0,00	0.32±0,04	0,36±0,01	>200
	0.78125	1.5625	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	$A_{0.5} \mu\text{g/mL}$
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

* $A_{0.50}$: la concentration à l'absorbance 0,5.

Les résultats obtenus sont par la suite présenté **figure 48**.

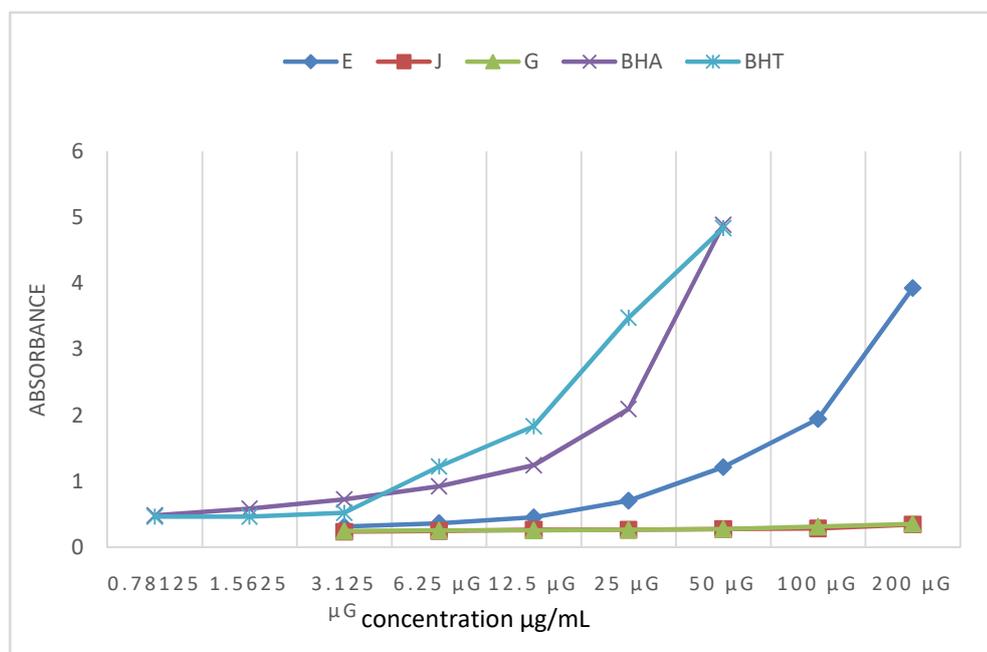


Figure 48 : Courbe comparative des absorbances de l'activité phenanthroline.

Il existe des différences hautement significatives entre les trois extraits testés, pour l'extrait d'écorce, il possède la meilleure activité réductrice du complexe ferroïne avec une absorbance de 0.32 à la concentration de 3.125 $\mu\text{g/ml}$, abouti à son A0.5 à la concentration de 14.04 $\mu\text{g/ml}$ et continue son effet réducteur avec une absorbance de 3.93 à la concentration 200 $\mu\text{g/ml}$.

Concernant l'extrait de jus et des graines, ils ne présentent pas un effet remarquable.

↳ Les résultats obtenus sont par la suite exprimés en terme de A0.5 ($\mu\text{g/ml}$).

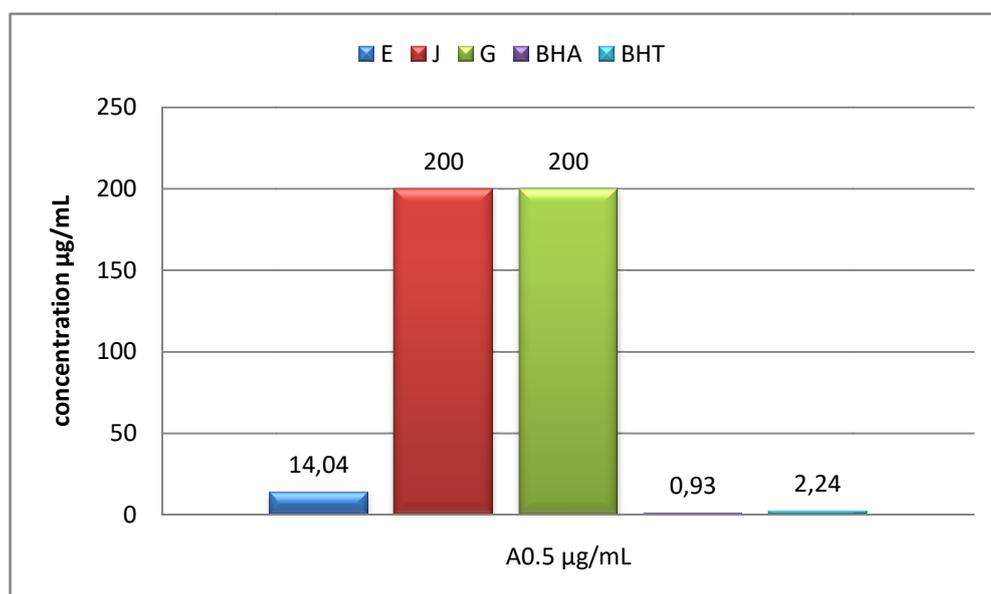


Figure 49 : Présentation des valeurs des IC50 des extraits de grenade en comparaison avec les standards.

L'extrait d'écorce de grenade présente un effet réducteur proche des deux standards utilisés le BHA et le BHT.

II. 2. 2. Evaluation de l'activité enzymatique

D'après l'effet démontré dans de nombreuses études cliniques sur la grenade, un potentiel promoteur dans le domaine de la prévention contre certaines maladies telles que la maladie de Parkinson, l'Alzheimer et le diabète, est envisagé.

1. Activité anti-Alzheimer ou anti cholinestérase AChE

La grenade développe une capacité antioxydante protectrice sur le cerveau et le système nerveux en influençant les métabolismes enzymatiques.

Des études *in vitro* afin de déterminer le rôle de la grenade sur l'activité de la cholinestérase cérébrale une étude par **Amri et al., (2017)** a présenté une approche sur l'influence des régimes alimentaires sur la santé cérébrale celle-ci est faite par l'évaluation du statut oxydant du cerveau, le poids corporel et cérébral et le profil lipidique plasmatique.

Ces paramètres ont été mesurés chez des rats témoins, des rats alimentés par un régime alimentaire riche en graisse et en fructose (HFD) et des rats alimentés par le même régime alimentaire (HFD) mais traité par des extraits de grenade (huile de pépin de grenade, extrait des feuilles, jus de grenade et la poudre d'écorce de grenade).

Les résultats ont montré que le régime (HFD) a entraîné une augmentation significative du stress cérébral, du poids du cerveau et du corps et des troubles du profil lipidique dans le sang. Par contre, les profils lipidiques dans le sang modulés par les extraits de grenade empêcheraient l'accumulation de lipides dans le cerveau et le corps, mis en évidence par la diminution de leur poids par rapport aux rats alimentés par le régime (HFD) non traités. En outre, l'administration de ces extraits a protégé le cerveau des oxydants de stress, comme en témoignent la diminution des taux de malondialdéhyde (MDA) et de la carbonylation des protéines (PC) et l'augmentation des taux de superoxyde dismutase (SOD) et de glutathion peroxydase (GPx).

Une autre étude réalisée *in vitro* selon la méthode utilisée dans le présent travail (**Ellman et al., 1961**), a montré que l'extrait de feuilles a donné l'activité inhibitrice la plus élevée par IC₅₀ de 151,85 mg / ml par contre l'épluchure de grenade montre un effet très faible et considéré comme effet négligeable. Ce qui est tout à fait compatible avec nos

résultats car les trois extraits étudiés dans ce travail à savoir l'extrait de pelures, de jus et de grenade ne présente aucune activité significative pour cette application.

2. Activité inhibitrice de la tyrosinase

Une étude *in vivo* menée par **Jatinder et al., (2013)** a permis de démontrer que les extraits de fruit de grenade et leurs composants bioactifs tels que le punicalagins ont une capacité inhibitrice de l'enzyme tyrosinase qui est responsable à la biosynthèse de la mélanine dans les mélanocytes. La dispersion de la mélanine au niveau de l'épiderme est responsable de la pigmentation de la peau.

Une autre étude réalisée *in vitro* par **Fawole et al., (2012)** a démontré que l'extrait méthanolique d'épluchures de grenade à un effet enzymatique sur la tyrosinase en l'inhibant.

Dans le but de confirmer l'effet inhibiteur de la tyrosinase par les extraits de grenade, on a réalisé un test en se référant à la méthode de **Deveci et al., (2018)**.

Malgré la teneur remarquable en composés phénoliques des extraits étudiés surtout celle de l'épluchure, le test a donné des résultats négatifs, dus peut être à l'utilisation d'une méthode différente peut être moins sensible.

3. Activité antidiabétique (activité inhibitrice de l' α -glucosidase)

L' α -glucosidase est une enzyme digestives glucidiques principalement située dans les cellules épithéliales de la membrane de bordure en brosse de l'intestin grêle, peut hydrolyser davantage les disaccharides (par exemple, le saccharose et le maltose) en glucose et autres monosaccharides pour l'absorption gastro-intestinale (**Li et al., 2005**).

Tableau 15 : Inhibition de l' α -glucosidase par les différents extraits de grenades.

Extraits	% d'inhibition							IC ₅₀ (μg/ml)
	15,625μg/ml	31,25μg/ml	62,5μg/ml	125μg/ml	250μg/ml	500μg/ml	1000μg/ml	
E	1.57±1.10	24.02±0.75	69.98±0.36	81.04±6.0	90.86±0.06	NA	NA	44.65±5.77
J	NA	NA	38.72±2.51	40.94±4.41	54.25±0.43	60.99±1.23	NA	208.45±14.61
G	NA	NA	NA	5.92±0.37	47.61±0.12	62.06±1.11	NA	402.83±3.29
	7.8125	15.625μg	31.25μg	62.5 μg	125 μg	250 μg	500μg	IC₅₀ μg/ml
Acarbose	27,43±2,18	38,91±3,20	54,86±1,79	67,29±2,63	80,19±1,66	85,54±0,45	91,05±0,72	275,43±1,59

*NA : non attribué

↳ Les résultats sont présentés dans la courbe des pourcentages d'inhibitions de l'enzyme alpha-glucosidase au titre de la gamme de concentrations utilisée.

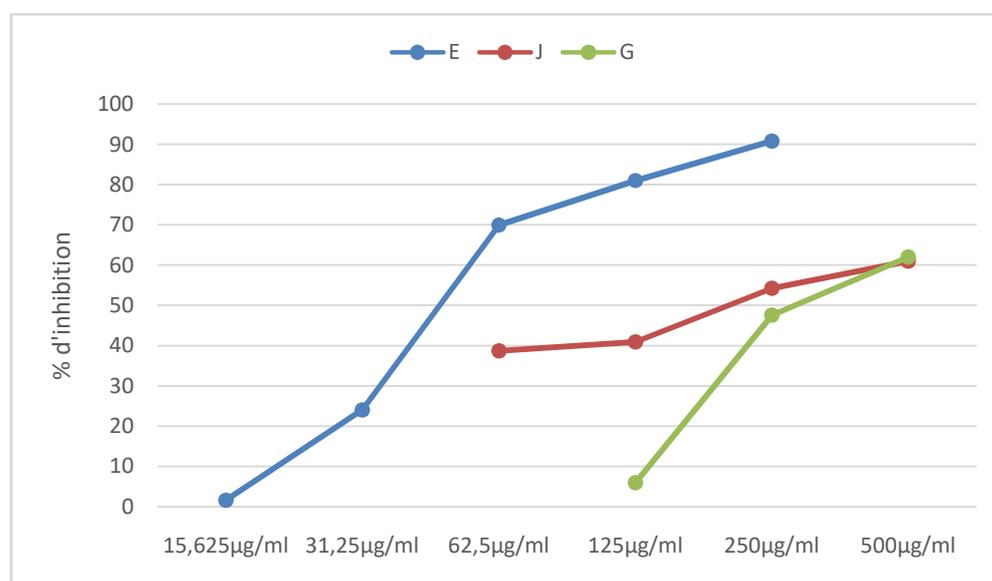


Figure 50 : Pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha glucosidase sous l'action des différents extraits de grenade.

↪ En comparaison avec le standard présent sur le marché : l'Acarbose.

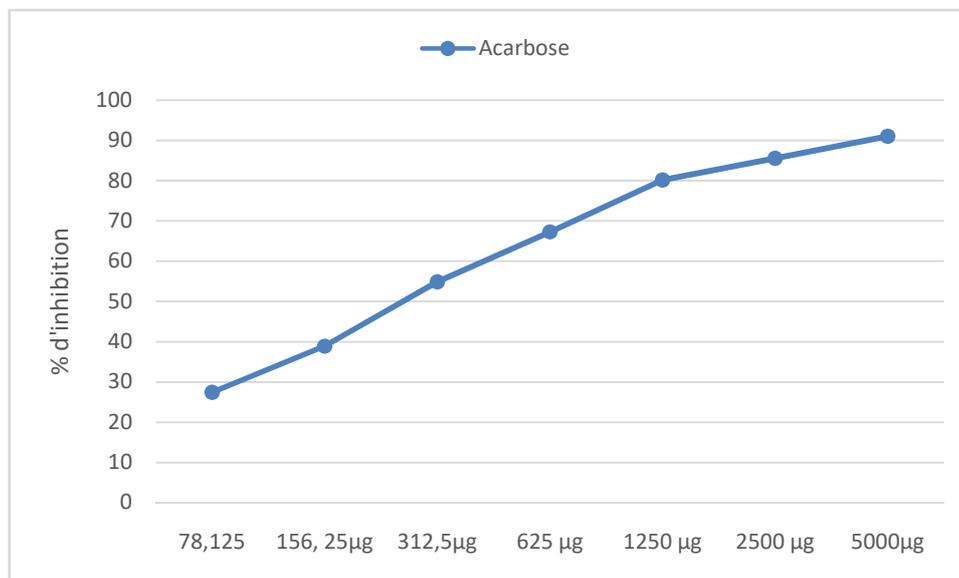


Figure 51 : Pourcentage d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase exercé par le standard Acarbose.

Le profil inhibiteur de l'activité de l'alpha glucosidase par les différents extraits de *P.granatum* révèle un effet très prononcé de l'extrait d'épluchures qui dévoile une activité très importante et plus significative que le standards utilisé l'acarbose.

L'extrait commence à inhiber l'enzyme alphaglucosidase à la concentration de 15.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avec pourcentage très faible de 1.57 atteint son IC50 rapidement à la concentration de 44.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et continue son effet jusqu'à une inhibition de 90.86% à la concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

L'extrait de jus présente également un effet important, tardivement à la concentration de 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avec 38.72 comme pourcentage d'inhibition continu pour avoir son IC50 à la concentration de 208.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et atteint son maximum d'effet de 66.99% à la concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

L'extrait d'épluchures et de jus présente un effet inhibiteur de l'enzyme alphaglucosidase meilleur que celui du standard utilisé sur le marché : l'acarbose.

L'extrait des graines quand à lui, commence une inhibition faible de 5.92% à 125µg/ml, atteint son IC50 à 402.83 µg/ml, et continue son inhibition de l'enzyme jusqu'à 62% à une concentration de 500 µg/ml.

↳ Une comparaison des IC50 des extraits de grenade par rapport au standard afin de les classer selon leurs puissances inhibitrices de l'enzyme alpha-glucosidase.

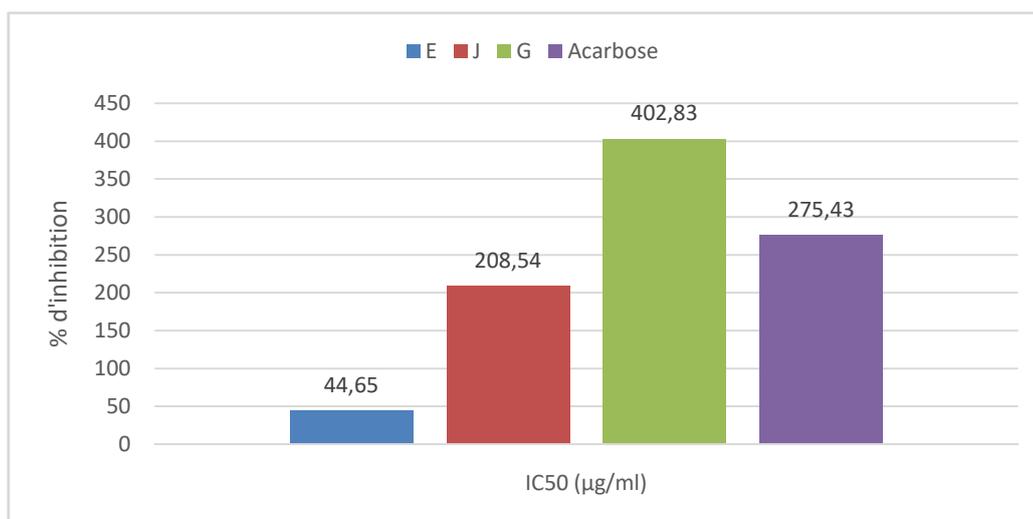


Figure 52 : Histogramme comparative des IC50 des trois extraits de *Punica Granatum* L. avec le standard Acarbose.

Un étude *in vitro* menée par **Kam et al., (2013)** sur les trois parties de la grenade ; l'épluchure, le jus brut séché et les graines, qui a montré l'effet inhibiteur de l'activité enzymatique de l'alpha-glucosidase intestinal du rat par l'extrait d'épluchure, avec une IC50 de 835 mg / ml, par contre, l'extrait de pépins et le jus brut séché ont montré des effets inhibiteurs faibles ou nuls.

De même, une étude *in vivo* par **Parmar et Kar., (2007)**, ont montré que l'extrait préparé à partir de l'épicarpe de *Punica granatum* administré par voie orale à une dose de 200 mg/kg p.c. provoque une diminution de la glycémie et une augmentation du taux d'insuline plasmatique chez les rats ayant une athérosclérose.

Ce qui va dans le sens des résultats obtenus dans ce travail les différences peuvent être dues à la nature de la méthode utilisée *in vitro* ou *in vivo*.

II. 3. Relation structure - activité « RSA »

Les relations structure – activité (RSA), constituent la relation existant entre structure chimique et activité pharmacologique pour une série de composés (**Wermuth, 1998**).

Elles ont été abondamment utilisées de manière intensive dans les industries pharmaceutiques, chimiques et cosmétiques, tout particulièrement pour la conception rationnelle de nouveaux principes actifs et de nouvelles entités chimiques. Ces relations ont également prouvé leur utilité dans l'évaluation des risques en toxicologie ainsi que des risques environnementaux.

Le vocable « RSA » recouvre en fait différentes approches, allant de simples considérations de similarité ou de diversité des molécules à l'établissement de relations mathématiques liant la structure chimique à une activité mesurable.

Cette recherche se consacre au fruit du grenadier en tant qu'usine de principes actifs, en étudiant ses propriétés pharmacologiques *in vitro*, spécifiquement l'activité antioxydante et enzymatique.

Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Popovici et al., 2009**). Cette réaction est favorisée par multiples facteurs en produisant des radicaux libres et perturbant le fonctionnement des cellules (**Sarni –Manchado et Chevrier, 2006**). Cette activité est due à des substances dites antioxydants.

Les antioxydants synthétiques, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Plusieurs antioxydants synthétiques comme le TBHQ, le THBP, le DTHMP, le PG, l'OG et l'NDGA, notamment le Butylhydroxytoluène (B.H.T) et le Butylhydroxyanisole (B.H.A), qui sont actuellement utilisés dans les cosmétiques et les huiles végétales (**Guo et al., 2006**), cependant ces composés ne seraient pas dépourvus de toxicité.

Le butylhydroxyanisole BHT et BHA sont des antioxydants phénoliques synthétiques appartenant au groupe des monopénols, qui peuvent être utilisés seuls ou en synergie,

généralement le BHA est considéré comme plus puissant que le BHT quoique dans les produits de cuisson-extrusion, l'inverse ait été démontré.

Ces antioxydants sont fortement lipophiles, insolubles dans l'eau, assez thermostables (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**), hautement actifs, et volatils, qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant la peroxydation des acides gras insaturés (**Xiang et al, 2007**).

La valorisation des ressources naturelles telles que des extraits végétaux et produits du métabolisme secondaire de plantes, est notée d'un grand intérêt, en raison de leur potentiel d'antioxydants naturels et composés biologiquement actifs notamment de nature polyphénolique. Si bien qu'ils sont devenus les molécules préférées des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels de l'agroalimentaire et des laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques (**Melgarejo et Valero, 2012**).

Ces antioxydants naturels regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes qui sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres et des inhibiteurs d'enzymes (antidiabétiques).

Parmi les antioxydants naturels les plus largement répandus dans la nature, les Tocophérols (E 307) plus particulièrement le D- α -tocophérol (Vitamine E). Ils sont considérés comme de bons antioxydants alimentaires, surtout pour leur rôle physiologique chez l'homme, aussi bien pour lutter contre le stress oxydant ou comme protecteurs des structures membranaires et des LDL.

En se basant sur le mécanisme d'action des antioxydants naturels en particulier celui des tocophérols, ainsi que les BHA et BHT synthétiques utilisés comme standards de référence, on peut supposer que les principes actifs du fruit de grenadier ont le même mécanisme antiradicalaire que ces derniers, ce qui implique que ceux sont des donneurs d'hydrogènes et leur potentiel antioxydant est probablement dû à un transfert de proton (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Cette hypothèse peut être confortée par **Chung et al. (2006)**, qui a rapporté que l'activité par les extraits peut être accordée à la présence d'un groupement hydroxyle, dans la structure moléculaire du composé, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique, et à la

possibilité de la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène. Elle pourrait également être due aux effets synergiques entre diverses classes d'antioxydants présentes dans l'extrait (composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes.....).

D'après la quantification des composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) et l'évaluation de l'activité antioxydante par les différentes méthodes, il est constaté que l'extrait d'épluchure testé est celui qui a donné la quantité la plus élevée des composés phénoliques ainsi que la meilleure activité anti-radicalaire, cela laisse à penser qu'il existe une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante, cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydante, autrement dit, plus la molécule phénolique est riche en groupement hydroxyle plus son pouvoir antioxydant est supérieur (Curtay, 2014).

Pour étayer cette hypothèse voici l'exemple du punicalagin, qui est parmi les composés les plus importants responsables de l'activité biologique dans l'écorce de grenade, par la présence dans sa structure de 16 groupes OH dissociables (Reddy et al., 2007).

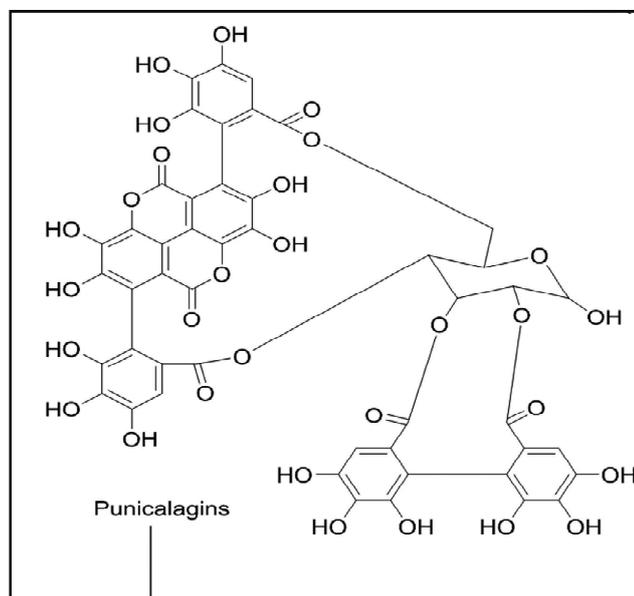


Figure 53 : Structure chimique de punicalagins de la grenade (Redy, 2018).

❖ Mécanisme d'action

A. Mécanismes d'action générale des antioxydants naturels

Certains antioxydants présentent plus d'un mécanisme d'action

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme « capteurs » de radicaux libres. Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par **Sherwin** : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus au moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire stabilisé de ses structures mésomères conjuguées (**figure 54**).

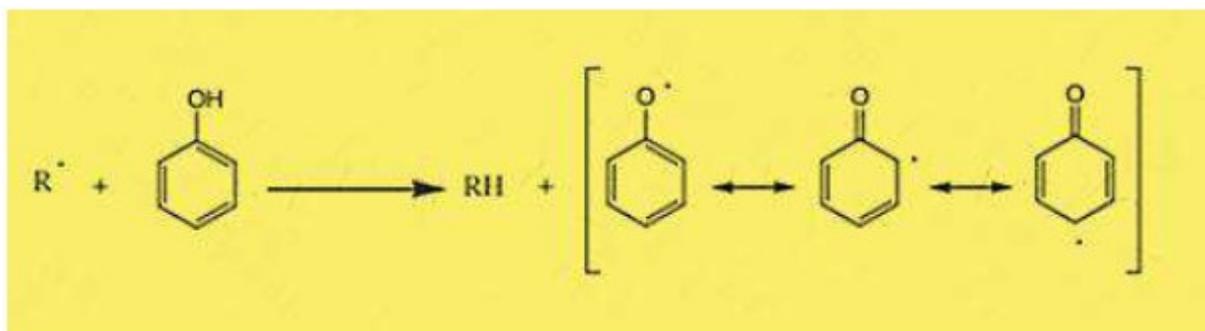


Figure 54 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (**Berset et Cervelier, 1996**).

Selon (**Polu, 2017**), les composés phénoliques agissent comme antioxydants en piégeant les radicaux libres en raison de la présence de groupes hydroxyles et agissent également comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, chélateurs de métaux et des activateurs d'oxygène singulet en raison de leurs propriétés rédox.

B. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relations structure-activités (RSA) dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que les activités des flavonoïdes et

de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs (**Wolfe et Liu., 2008; Mercader et al., 2008 ; Khlebnikov ; 2007 ; Sroka et al., 2005 ; Afanas et al., 2001 ; Van Acker et al., 1996**) et sont présentés dans la figure N°55.

En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les quatre critères suivants :

- ✓ La présence d'une fonction catéchol (structure ortho-dihydroxy) sur le cycle B : la configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif d'activité antioxydante des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- ✓ La présence d'un motif énone au niveau du cycle c : une double liaison entre C2 et C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.
- ✓ La présence de groupement hydroxyle en position 3 en combinaison avec la double liaison C2-C3.
- ✓ La O-méthylation.

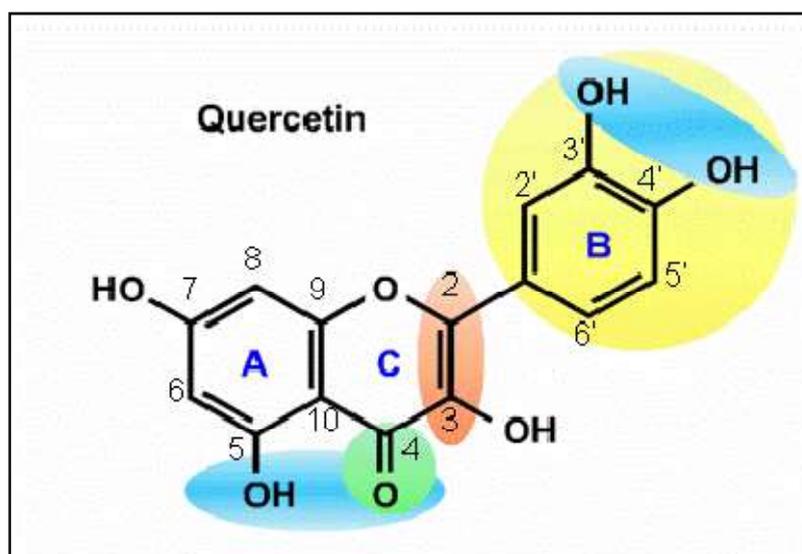


Figure 55 : Eléments structuraux nécessaires a l'obtention d'une activité antioxydante.

C. Mécanisme d'action des tocophérols

L'activité antioxydante de ces tocophérols repose sur le système redox tocophérol-tocophérylquinone (**figure 56**). Selon ce mécanisme, une molécule de tocophérol est capable de réduire successivement deux radicaux lipidiques (L°), en formant une méthyle-tocophéryl quinone instable (MTQ) qui se réarrange en tocophéryl quinone (TQ) plus stable.

Les tocophérols peuvent aussi agir en désactivant l'oxygène singulet et en produisant des hydroxydinones ou des endoperoxydes (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

L' α -tocophérol agit dans l'organisme en synergie avec la vitamine C (acide ascorbique) qui le régénère (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

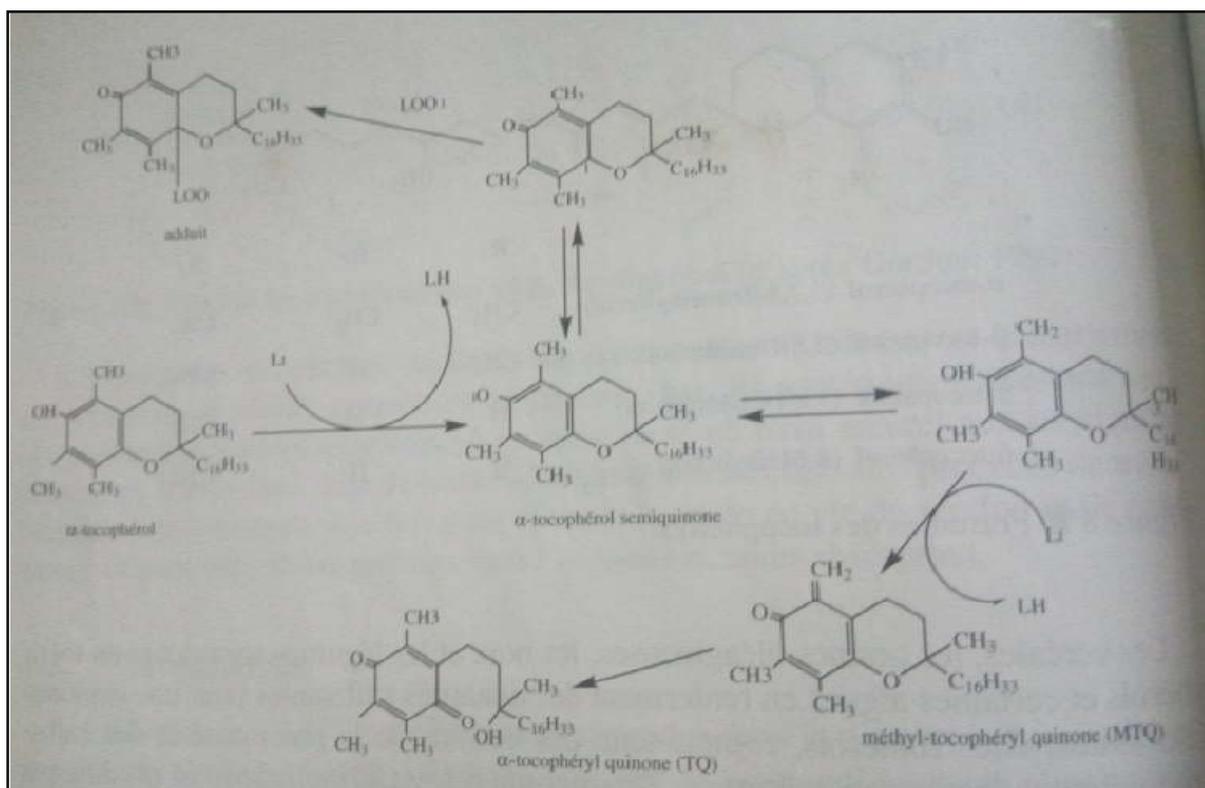


Figure 56 : Mécanisme des tocophérols (Vitamine E) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

D. Mécanisme d'action des Antioxydants synthétiques de référence

✓ Le BHT

La stœchiométrie de la réaction (**figure 57**) indique que seulement une molécule est capable de réduire plusieurs radicaux libres (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

La ci dessous, présente le mécanisme d'action pour le BHT dans la réduction des radicaux libres.

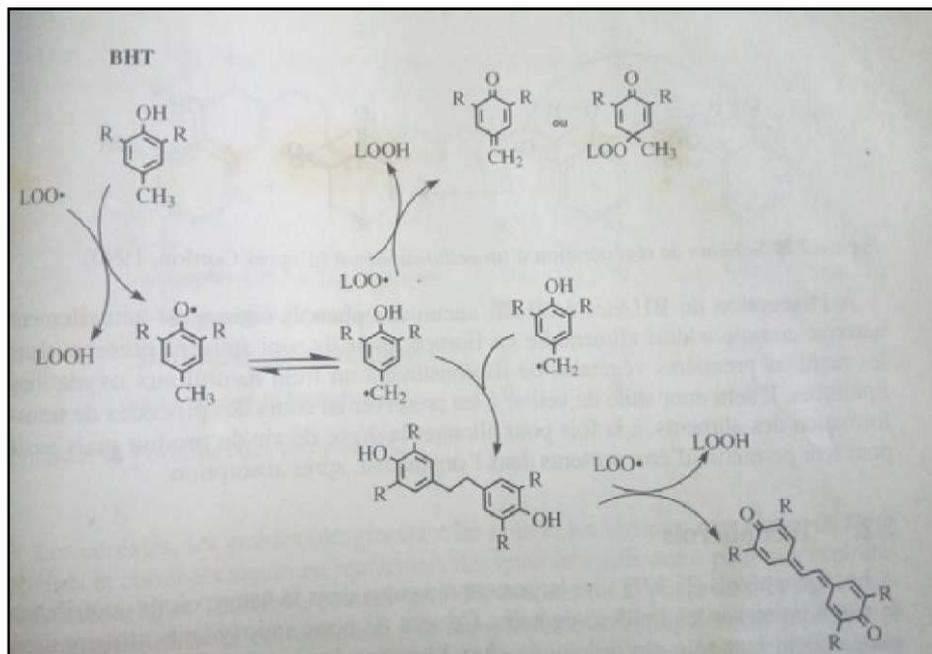


Figure 57 : Mécanisme antiradicalaire du BHT avec le radical libre $R = C-C(CH_3)_3$ (Pokorny, 1987).

✚ Activité enzymatique

Actuellement, une grande importance est donnée aux inhibiteurs de l' α -glucosidase dans l'objectif d'enrichir cette classe thérapeutique. Malheureusement, le manque d'informations détaillées sur le mécanisme d'inhibition de l' α -glucosidase d'origine humaine, le coût et l'indisponibilité de cette enzyme sur le marché, ont poussé les chercheurs à utiliser les outils de la modélisation statistique et moléculaire pour développer de nouvelles structures de base afin d'enrichir cette classe thérapeutique d'inhibiteurs et minimiser le coût financier des tests expérimentaux (Oprea, 2005 ; Ghose et Viswanadhan, 2001).

La quantification de la relation existante entre la structure moléculaire et l'activité biologique (QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship) est devenue, actuellement, un outil indispensable dans le domaine de la conception de médicaments, notamment dans le cas d'absence d'information sur le site actif de l'enzyme.

Les glycosidases catalysent la dégradation hydrolytique des polysaccharides en oligosaccharides et en hydrates de carbone monomères (Ouairy, 2011) (Figure 58).

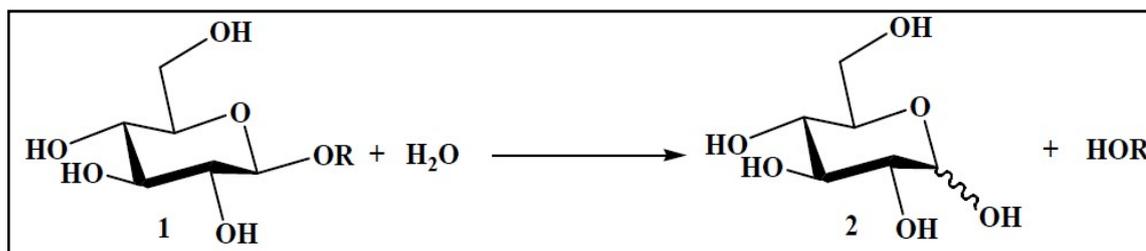


Figure 58 : Hydrolyse simplifiée de la liaison glycosidique.

Le mode d'action de l'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques le plus commun s'opère par une catalyse au cours de laquelle une paire d'acides aminés, provenant des résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme, est mise en jeu. Dans ce cas, un acide aminé joue le rôle du donneur de proton acide/base et l'autre agit en tant que base/nucléophile

L' α -glucosidase est une enzyme intestinale de type glucosidase, agissant sur les liaisons α 1-4 en dégradant les glucides en monosaccharides (glucose) permettant ainsi leur absorption au niveau de la bordure intestinale (**Subramanian, 2008**)

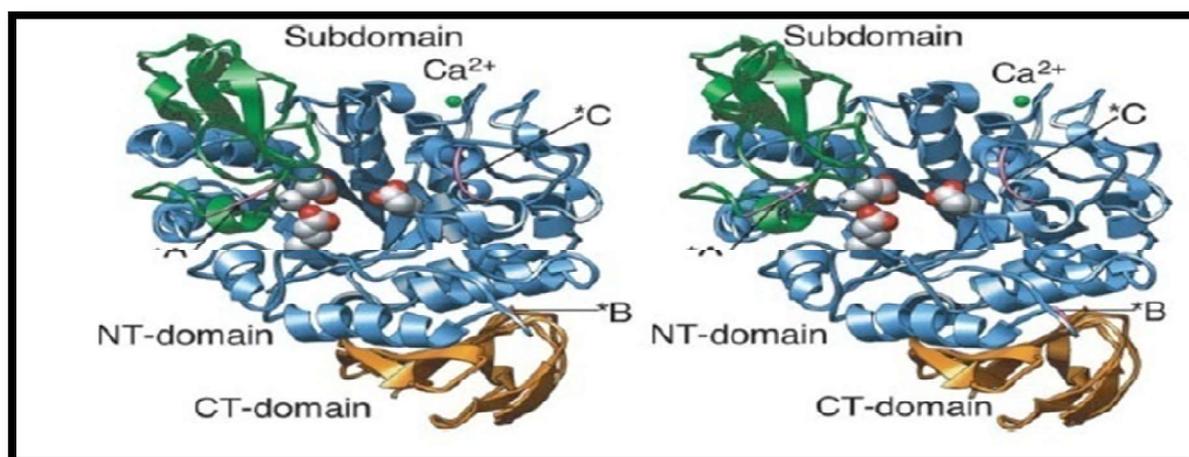


Figure 59 : Structure de l' α glucosidase (Shirai et *al.*, 2008).

En référant au mécanisme inhibiteur de l' α -glucosidase par l'acarbose, l'hypothèse de substances inhibitrices naturelles existantes dans nos extraits, fonctionnant de la même manière que l'acarbose synthétique peut être lancée, à savoir la probable présence de résidus

glucosidiques dans ces substances qui induisent une similarité structurale avec les oligosaccharides, et permet l'occupation du site actif de l'enzyme de façons covalente et par conséquent le rendre inactif réversiblement.

Cette hypothèse a été confirmée par la littérature, **Katz, (2007)** raporte que les mécanismes hypoglycémiques de l'extrait de fleurs de grenadier sont similaires à ceux de l'acarbose, 10- α -glucosidase inhibiteur utilisé dans le traitement du diabète de type 2.

Aussi **kurtay, (2014)** a montré l'existence de molécules de sucre naturel liées en grande partie à des polyphénols antioxydants dans la grenade,

Ducobu, (2003) a montré que les inhibiteurs des α -glucosidases inhibent de façon réversible les α -glucosidases de la bordure en brosse.

L'inhibition des α -glucosidases par divers flavonoïdes a été rapporté comme une inhibition mixte et presque non-compétitive par **Tadera, (2006)**.

A. Mécanisme d'inhibition enzymatique de l' α -glucosidase

Les inhibiteurs des α -glucosidases inhibent de façon réversible les α -glucosidases de la bordure en brosse qui interviennent dans le clivage de nombreux disaccharides alimentaires et des résidus de la digestion de l'amidon. Il en résulte un retard à l'absorption des glucides alimentaires et ainsi une réduction du pic d'hyperglycémie postprandiale et une moindre stimulation de l'insulino-sécrétion prandiale. L'effet sur la glycémie à jeun est en revanche modeste (**Ducobu, 2003**).

Parmi les nombreux médicaments antidiabétiques, l'acarbose (**figure 60**) est un inhibiteur puissant d'enzymes digestives tel que l' α -glucosidase, est le plus largement utilisé pour le traitement du diabète type 2 (**Balfour et Tavish, 1993**), commercialisé par la société Bayer sous le nom Glucor ou Glycobay.

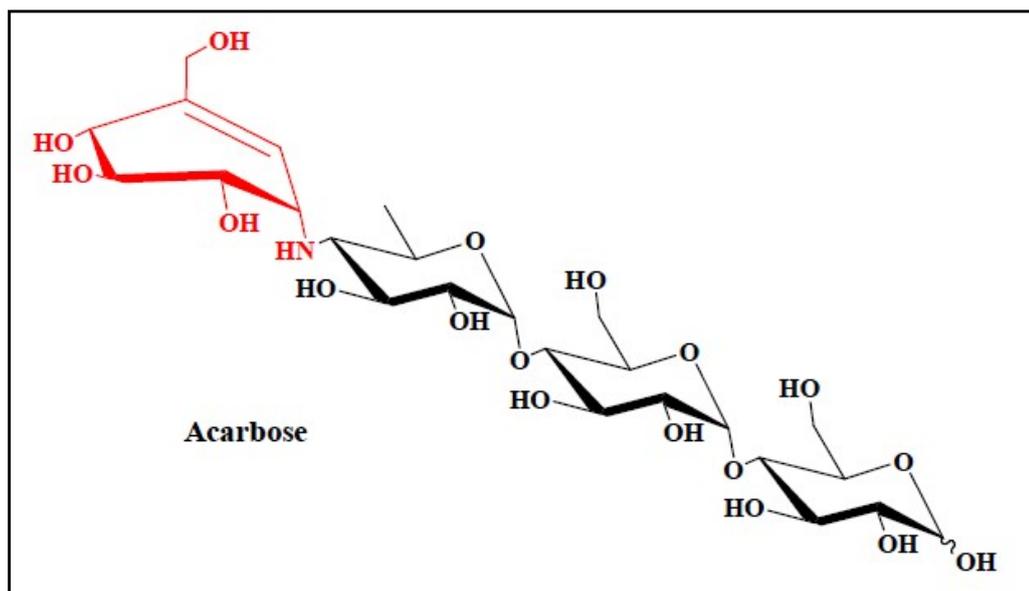


Figure 60 : Structure chimique de l'acarbose.

La similarité structurale de l'acarbose à des oligosaccharides, en raison de ses résidus de glucose, est considérée comme étant responsable de la liaison de haute affinité pour les sites actifs des α -glucosidases. L'incapacité des enzymes digestives à hydrolyser l'acarbose est due à la présence d'un pont amine, qui est considéré comme le facteur déterminant de son effet inhibiteur.

L'unité (A) notée en rouge sur l'acarbose dans la figure N°60, appelée valiénamine, est également un bon inhibiteur d' α -glucosidases intestinales (Chen *et al*, 2003).

Conclusion

Le présent travail a pour objectif la valorisation d'une plante médicinale qui est le *Punica granatum* L. Le grenadier possède une vaste histoire dans les traitements traditionnels, et représente un réservoir phytochimique de valeur médicinale heuristique. Cependant, cette plante compte parmi les plantes médicinales les moins fréquemment utilisées dans notre pays en raison de l'ignorance de sa valeur thérapeutique. C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés à la valorisation d'une variété locale et de ses sous produits par l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : la quantification de ses principaux métabolites secondaires, l'activité antioxydante et enzymatique des extraits d'épluchures, de jus et de graines.

En premier lieu, le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé l'extrait d'écorces comme étant l'extrait le plus riche en polyphénols, suivi par le jus et enfin les graines, avec des valeurs respectives de : $(699.29 \pm 0.0 \mu\text{g EAG/mg ES})$, $(60.27 \pm 23.42 \mu\text{g EAG/mg ES})$ et $(28.01 \pm 11.53 \mu\text{g EAG/mg ES})$, des valeurs tout à fait comparables à celles relevées dans la littérature.

De même, Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes totaux par la méthode au chlorure d'aluminium montrent également que l'extrait d'écorces présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux $(95.41 \pm 3.53 \mu\text{g QE/mg ES})$, suivis par les graines et le jus avec des valeurs respectives de : $(12.84 \pm 1.0353 \mu\text{g QE/mg ES})$ et $(12.08 \pm 0.58 \mu\text{g QE/mg ES})$.

Par la suite, une série de tests biologiques a été réalisée *in vitro* afin d'évaluer le potentiel antioxydant des trois extraits étudiés par six méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le test ABTS, le piégeage du radical GOR, le test CUPRAC, le pouvoir réducteur et la méthode phénanthroline.

L'ensemble des résultats collectés par les différents tests réalisés, révèle que l'activité la plus prononcée revient à l'extrait d'épluchure qui présente les meilleurs pouvoirs antioxydant présenté par les valeurs IC50 qui sont parfois même meilleur que les standards employés.

	DPPH	ABTS	GOR	CUPRAC	Red power	Phen essay
IC50 µl/ ml	20,53±0.52	9,51±0.48	7.42±0.84	3.44±0,10	32,20±3.43	14.04±2.35

Les résultats de cette étude ont montré que le fruit du grenadier qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans l'activité antioxydante.

Enfin, l'activité enzymatique a été évaluée pour l'inhibition de trois enzymes : la tyrosinase, la cholinestérase et l'alpha-glucosidase. Les résultats obtenus ont montré une forte inhibition de l'enzyme alpha-glucosidase par l'extrait d'épluchures suivie par le jus de grenade, le standard Acarbose et par la suite l'extrait des graines.

	E.E. épluchure	E.E. Jus	E.E. Graines
IC50 (µg/ml)	44.65±5.77	208.45±14.61	402.83±3.29
α-glucosidase			

A la lumière de ces résultats, le fruit de grenade et l'extrait d'épluchure en particulier peut être utilisé comme source naturelle d'antioxydants et présente une forte activité antidiabétique.

Et comme perspectives de recherches il faut prévoir de :

- ❁ Faire un fractionnement bioguidé ainsi qu'un isolement de molécules bioactives afin d'identifier les métabolites secondaires responsables de ce remarquable effet thérapeutique.
- ❁ Faire des études précliniques in vivo afin de prouver les résultats obtenus in vitro.
- ❁ Essayez d'ajuster les doses surtout en ce qui concerne l'extrait de pelures et son activité régulatrice du diabète.
- ❁ Vérifiez si les procédés industriels : chauffage, conservation..., ont un impacte sur l'effet antioxydant et inhibiteur de l'alpha-glucosidase.
- ❁ Proposer des formulations agroalimentaires et cosmétiques à base des trois extraits étudiés comme antioxydants.

Références

Bibliographiques

Afanas'ev, I. B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid with transition metals. *Biochem. Pharmacol*, 61(6) : 677-684.

AFAQ, F., MALIK, A., (2005). Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*, (81) : 38-45.

Albrecht, M., Jiang, W., Kumi-Diaka, J, Lansky, E.P, Gommersall, L.M., Patel, A. (2004). Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. "*J Med Food*", 7(3) : 274-83.

Alhijna, O., Salih, A., Bourich, E. (2017). Grenade de Beni Snous : étude et caractérisation chimique des extraits de pépins, évaluation de l'activité microbiologique. Mémoire de fin d'étude du diplôme de docteur en pharmacie. Université Abou Bekr Belkaid (Faculté de Médecine), TLEMCEM.

Al-Maiman, S. A., Ahmad, D. (2002). "Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit maturation. "*Food chemistry*", 76 : 437-441.

Al-Said, F.A., Opara, A.C., Al-Yahyai, R.A., (2009). Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, (90) : 129–134.

Amri, Z., Ghorbel, A., Turki, M., Messadi Akrouf, F., Ayadi, F., Elfeki, A., Hammami M. (2017). Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. *BMC Complementary and alternative medicine. BMC series*, 17 : 339.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 : 7970–7981.

Aviram, M., Dornfeld, L.(2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure.*Atherosclerosis*,158(1) : 195-198.

Balfour, J.A., McTavish, D. (1993). *Drugs*. 46(6) : 1025–1054.

Bdoudjenah, M., Merzouge, L. (2016). Étude quantitative des polyphénols et le pouvoir antibactérien des extraits de l'écorce de fruit de grenadier (*Punicagranatum L.*) Mémoire de de Master en Biologie Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, (Mostaganem, Algerie).

Berset, C., Cervelier, M.E. (1996). Methods of estimating the degree of lipide oxidation and of measuring antioxidizing power. *Science des Aliments*, 16 : 219-245.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181) : 1119-1200.

Calin, S.A., Carboneli, B., Angel, A., (2005). La grenade cultivée en Espagne Punicalogineanti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Naturalontioxydantgranatum et université Miguel Hernandez, (Murcia Espagne), 69 P.

Chen, X., Fan, Y., Zheng, Y., Shen, Y. (2013). Properties and Production of Valienamine and Its Related Analogues. *Chem. Rev*, 103 : 1955-1977.

Chung, M.I., Ming, M., Stahl, R.J., Chan, E., Parkinson, J., and Keeley, F.W. (2006). equences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biol*, 25(8): 492-504.

Curtay, J.P. (2014). Jus de grenade fermenté (4e édition). Marco pietteur, Embourg (Belgique), 189 P.

Deveci, E., Gulsen, T.C., Duru, M.E. (2018). Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferulaelaechytris* and *Sideritis stricta* *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES*, 21(1) : 771-783.

Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem*, 51 : 4563–4569.

Ducobu, J. (2003). [Oral antidiabetic drugs in 2003]. *Revue medicale de Bruxelles*, 24(4): A361-8.

Edeas, M., (2010). Polyphénols et jus de grenade. *Phytothérapie*, (8) : 16-20.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, 7: 88–95.

Ercisli, S., Agar, G., Orhan, E., Yildirim, N. and Hizarci, Y. (2007). Interspecific variability of RAPD and fattyacid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in Southern AnatoliaRegion in Turkey. *Biochem. Syst. Ecol* , 35 : 764-769.

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

Fawole, O.A., Makunga, N.P., Opara¹, I.L. (2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12 : 200.

Fourasté, I. (2002). Etude botanique “Le Grenadier”. Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, 14 P.

Ghose, A.K. Viswanadhan, V.N. (2001). “Combinatorial Library Design and Evaluation: Principles, Software Tools, and Applications in Drug Discovery” *Ed. Marcel Dekker, Inc, Etats Unies.*

Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. et Kader, A.A., (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, 48(10) : 4581-4589.

Gozlekci, S., Ercisli, S., Okturen, F., Sonmez, S. (2011). Physico-chemical characteristics at three development stages in pomegranate cv. ‘Hicaznar’. In: *Not Bot HortAgrobot Cluj*, 39(1) : 241-245.

Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y. (2010). Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Tannic Acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3 : 43-53.

Guo, L., Xie, M.Y., Yan, A.P, Wan, Y.Q., Wu, Y.M. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC- MS analytical and bioanalytical and bioanalytical. *Chemistry*, 386(6) : 1881-1887.

Hartmann, R.E., Shah, A., Fagan, M.A., Schwetye, K.E. (2006). Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 24 : 506-515.

INRAA, (2006). Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture.

Jatinder, R., Ganesh, D., Saito, L., Jeffery, D.S., Mulder, T. (2013). Inhibition of melanin content by Punicalagins in the super fruit pomegranate (*Punicagranatum*). *Journal of cosmetic science*, 64(6) : 445-53.

Jeun, J.M., Annie, F., Chrystian, J.A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes, Suisse, 192 P.

Kam, A., Li, K.M, Razmovski-Naumovski, V.M., Nammi, S., Shi, J., Chan, K., Li, G.K. (2013). A Comparative Study on the Inhibitory Effects of Different Parts and Chemical Constituents of Pomegranate on α -Amylase and α -Glucosidase. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 27 : 1614–1620.

Kanoun, K., Abbouni, B., BENIGNE, M.L., Benmahdi, F.Z., Marouf, B., (2014). Étude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica Granatum* Linn sur deux souches phytopathogènes: *Ascocyhta Rabiei* (Pass.) Labr. Et *Fusarium Oxysporum* F.sp. *Radicis –Lycopersici*. *European Scientific Journal*, 10(12) : 1-15.

KATZ, S. (2007). *Punicagranatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *Journal of medicinal food*, 10(2) : 213-217.

Kelawala, N.S., Ananthanarayan, L. (2004). Antioxidant activity of selected food stuffs. *Int J Food Sci Nutr*, 55(6) : 511-516.

Khalil, A.M ., (2014). Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Égyptien Journal of Hospital Medicine*, 16 : 92 –99.

Khlebnikov, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorgan. Med. Chem*, 15(4) : 1749-1770.

Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *“Food chemistry”*, 93 : 319-324.

Lansky, E.P. and Newman, R. A., (2007). Punicagranatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *JEthnopharmacol*, 109(2) : 177 - 206.

Larousse encyclopédie des plantes médicinales (2e édition) (2001): Identification, préparation, soins. Dorling Kindersiey Limited, Londres, 335 P.

Li, Y., Wen, S., Kota, B.P., Peng, G., Li, G.Q., Yamahara, J.y., Roufogalis, BD. (2005). Punicagranatum flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabeticfatty rats. *J Ethnopharmacol*, 99 : 239-244.

Lordan, S., Smyth, T.J., Soler-Vila, A., Stanton, C., Ross, R.P., (2013). The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141 (2013) : 2170–2176.

Loren, D.J., Seeram, N.P., Schulman, R.N., Holtzman, D.M. (2005). Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr*, 57(6) : 858-64.

Mansour, E., Khaled, A.B., Haddad, M., Abid,M.,Bachar, K., Ferchichi, A. (2011). Selection of pomegranate (*Punica granatum* L.) in south-eastern Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(46) : 9352-9361.

Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J., Chen, C.C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87(1) : 111–118.

Meftah, T., (2003). Cosmétologie au naturel cosmétologie au naturel. Programme UICN d’Afrique du Nord, Algérie, 12 P.

Melgarejo, P., Salazar, D.M., Artes, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol*, (211) : 185-190.

Melgarejo, P., Valero, D., (2012). Series A: Mediterranean Seminars. International symposium on the pomegranate N° 103, Espagne.

Mercader, A.G., Duchowicz, P.R., Fernandez, F.M., Castro, E.A., Bennardi, D. O., Autino, J.C., Romanelli, G. P. (2008). QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorgan. Med. Chem.*, 16 : 7470–7476.

Mirdehghan, S.H., Rahemi, M. (2007). "Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit." *Scientia Horticulturae*", 111 : 120-127.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *Journal Science Technology*, 27 : 152-159.

Morton, J.F. (1987). Pomegranate In: Fruits of warm climates. Creative resources systems, (Miami, Florida), 2997 P.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT. Food Science and Technology*, 43: 992–999.

Negi, P. and Jayaprakasha, J., (2003). Antioxidant and Antibacterial Activities of Punicagranatum Peel Extracts. *Journal of Food Science*, 68 : 1473-1477.

Oprea, T. I. (2005). "Chemoinformatics in Drug Discovery". Ed. *WILEY-VCH Verlag*. Allemagne.

OUIRY, C. (2011). « Synthèse de nouveaux glycoimidazoles, inhibiteurs potentiels de glycosidases préparation et utilisation en synthèse de glutaconaldéhydes oxydés en position 2 et de *n*-acylaminopentadiénals » Thèse de doctorat. Université Paris-sud, France.

Oukabli, A. (2004). Le grenadier : Des variétés performantes pour la culture. Bulletin mensuel d'information et de liaisons du PNTTA. MADRPM/DERD, N° 123, 4 P.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 : 307–315.

Parashar, S., Sharma, H., Garg, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1) : 160-164.

Parmar, H.S., Kar, A. (2007). Protective role of Citrus sinensis, Musa paradisiaca and Punicagranatum peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunction in rats. *Nutrition Research*, 27: 710-718.

Polu, P.R., Nayanbhirama, U., Maheswari, R. (2017). Assessment of free radical scavenging and anti-proliferative activities of *Tinospora cordifolia* Miers. *Altern Med*, 17: 457.

Popovici, C., Saykova, T., Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de genieindustriel*, 4 : 25- 39.

Prakash, C.V.S. Prakash, I. (2011). Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (Punicagranatum) Juice, Seed and Peel-A Review. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, (1) : 1-18.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. *Free Radical Bio. Med*, 26 : 1231–1237.

Reddy, K.M. (2018). Phenolic Compounds in Pomegranate (Punicagranatum L.) and Potential Health Benefit, toxicology Technical Director, Core Laboratory, Pathology and Laboratory Medicine Service, Edward Hines Jr. VA Hospital, 5000 S, 5th Ave. Hines, Illinois 60141, United States, 23 P.

Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., Ferreira, D. (2007). Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. *Planta Med*, 73(5) : 461-467.

Ribéreau, G.P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie. Edition Dunod, Paris, 254 P.

Sánchez-Monge, E. (1974). *Fitogenética (mejora de plantas)*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio de Agricultura. Madrid, 456 pp.

Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier, Paris, 398 P.

Schubert, S.Y., Lansky, E.P., Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*, 66(1) : 11-17.

Schwartz, E., Tzulker, R. (2009). Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J Agric Food Chem*, 57(19) : 9197-9209.

Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Wiesman, Z., Tripler, E., Bar Ilan, I., Fromm, H., Borochoy-Neori, H., Holland, D., Amir, R. (2009). "Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits." *J Agric Food Chem*, 57(19) : 9197-9209.

Sherwin HW. (1976). Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany*, 78 : 703-710.

Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*, 335 : 157-166.

Shirai, T., Hung, V.S., Morinaka, K., Kobayashi, T., Ito, S. (2008). Crystal structure of GH13 α -glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. *Proteines*, 73: 126-133.

Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 : 144-158.

Souci, S.W., Fachman., W., Krant, H. (1994). Pomegranate. Food composition and nutrition tables. CRC Press, London.

Spichiger, R.E., Savolainen, V. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales, Presses polytechniques et universitaires romandes, Suisse, 413 P.

Sroka, Z. (2005). *Antioxidative and Antiradical Properties of Plant Phenolics. Zeitschrift Für Naturforschung C*, 60(11-12) : 833–843.

Subramanian, R., Asmawi, M.Z & Sadikun, A. (2008). *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *ABP*, 55 : 391-398.

Swarnamoni, D., Sarajita, B., (2012). Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic extract of leaves of *Punicagranatum* in alloxan-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus albino rats. *Indian J Pharmacol*, 44(2) : 219-224.

Szydłowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76 : 899-905.

Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52 : 149-153.

Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 42 : 218-235.

Topçu G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103 : 816–822.

USDA (2006) : United States Department of Agriculture. National Nutrients Database for Standard.

Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg Dj., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med*, 20 : 331-342.

Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., Atungulu G. G., (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*, 5 : 17-25.

Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., Mitscher, L.A.(1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem*,70 :1129-43.

Wolfe, K.L., Liu, R.H. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agricult. Food Chem*, 56: 8404-8411.

Wong, J.G., Anderson, R.A., Graham, G.M., Chu, M.C., Sauer, M.V., Guarnaccia, M.M., Lobo, R.A., (2006). The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study, 88(1) : 240-243.

Xiang, Q., Gao,Y., cXu.,Y.H. (2007). Capillary electrophoresis-amperometric de termination of antioxidant propyl gallate and butylate dhydroxyanisolein foods. *Analytical Science*, 23(6) : 713-717.

Zadzo, K., Schulman, R., AVIRAM, M., SIROKY, M.B. (2005). Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction prophylactic role of antioxidants. *The journal of urology*, 174(1) : 386 –393.

Zahin, M., Aqil, F., Ahmad, I., (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punicagranatum L. peel extracts. *Mutation Research*, 703 : 99–107.

Annexes

Annexe I :

Matériel de laboratoire

Appareillage

- **Lecteur de microplaque multi-mode Enspire^R PerkinElmer**

Le lecteur à plusieurs modes de fonctionnement de plat d'EnSpire est une Platform très accessible à la recherche :

- ✓ Pour la détection quantitative de l'émission et/ou l'absorbance de la lumière.
- ✓ A utilisateurs multiples de recherches qui exigent la technologie à rendement élevé, bien que la flexibilité pour une étendue des applications large tout en donnant la priorité à la sensibilité.
- ✓ Permettant des données plus appropriées au sujet des systèmes biochimiques et de la cellule.



Figure 1 : Lecteur de microplaque.

- **Rotavapeur**

L'évaporateur rotatif est un système permettant de vaporiser le composé le plus volatil d'un mélange.



Figure 2 : Evaporateur rotatif.

- **ETUVE**

Enceinte de chauffage fonctionnant, dans la majorité des cas, dans l'air parfois sous vide ou gaz neutre, permettant d'effectuer des traitements thermiques à températures réglée de l'ordre de 500 °C maximum.



Figure 3 : Etuve Memmert.

D'autres appareils ont été aussi utilisés tels que :



Figure 4 : Bain-marie.



Figure 5 : Plaque magnétique agitateur.



Figure 6 : pH mètre.



Figure 7 : Balance de précision.

- **Verrerie**

- ✓ Flacons.
- ✓ Béchers.
- ✓ Erlenmeyers.
- ✓ Entonnoirs.
- ✓ Eppendorfs.
- ✓ Barreaux magnétiques.
- ✓ Spatules.
- ✓ Portoirs.
- ✓ verres de montre.
- ✓ Ambons.
- ✓ Boites de pétries en verre.
- ✓ Micropipettes.

Produits et réactifs chimiques

Les réactifs chimiques et solvants utilisés sont de qualité analytique.

Tableau 1 : Réactifs et produits chimiques.

Solution DPPH	
DPPH	6 mg.
MeOH	100 ml.
↳ -20 °C à l'abri de la lumière.	
Solution ABTS⁺	
ABTS (7 mM)	19,2 mg.
H ₂ O	5 ml.
K ₂ S ₂ O ₈ (2.45 mM)	3,3 mg.
H ₂ O.....	5 ml.
↳ 16 heure à l'abri de la lumière.	
Galvinoxyl à (0,1mM)	
Galvinoxyl	4 mg.
MeOH	100 ml.
Acetate d'ammonium (ACNH₄, PH=7.0)	
ACNH ₄	1,927 g.
H ₂ O	25 ml.
Chlorure de cuivre (II) (Cu Cl₂, 2H₂O)	
(Cu Cl ₂ , 2H ₂ O)	0,042625 g.
H ₂ O	25 ml.
Neocupronin	
Neocupronin	0,039 g.
MeOH	25 ml.
Ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%	
K ₃ Fe(CN) ₆	1 g.
H ₂ O	100ml.

Trichloracétique (TCA) à 10%

TCA	1 g.
H ₂ O	10 ml.

Chlorure ferrique FeCl₃ à (0.1%)

FeCl ₃	0,1 g.
H ₂ O	100 ml.

Phenanthroline à (0.5%)

1,10-Phenanthroline	0.05g.
MeOH	10 ml.

Chlorure ferrique FeCl₃ à (0.2%)

FeCl ₃	0.02 g.
H ₂ O	10 ml.

Solution DTNB

DTNB	16 mg.
Tampon (PH=7)	1 ml.
NaHCO ₃	7,5 mg.
↳ Tampon (PH=7) 1 ml + 2 ml Tampon (PH=7) + 4 ml Tampon (PH=8).	

Solution de substrat ACĪ

ACĪ	16 mg.
H ₂ O	4 ml.
Tampon (PH =8)	4 ml.

Solution d'enzyme AChE• Solution A

AChE	0,2 mg.
Tampon (PH=8)	4 ml.
↳ solution A	20 µl.
Tampon (PH = 8)	3 ml.

Solution d'enzyme α-glucosidase (0.1U/ml)

α-glucosidase	1 mg.
Tampon phosphate (100 mM, pH 6,9)	9.8 ml.

Solution de susbstrat p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (5 mM)

p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	15.06 mg.
Tampon phosphate (100mM, pH 6,9)	10 ml.
Acétate de Potassium (CH₃COOK, 1 M)	
CH ₃ COOK	9.80 g.
H ₂ O	100 ml.
Nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) à 10%	
(Al(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O)	10g.
H ₂ O	100 ml.
Carbonate de sodium (Na₂CO₃, 7,5%)	
Na ₂ CO ₃	7,5 g.
H ₂ O	100 ml.
Folin Ciocalteu (FCR) (2M) dilué 10 fois	
FCR	1ml.
H ₂ O	9 ml.

Annexe II :

Résultats des activités biologiques

✚ Etude quantitative des composés phénoliques

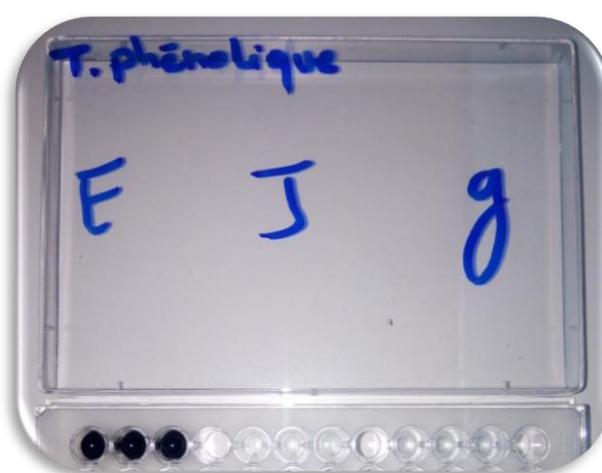


Figure 7: Dosage TPC.



Figure 8 : Dosage TFC.

✚ Etude de l'activité antioxydante



Figure 9 : Test DPPH.



Figure 10 : Test ABTS.

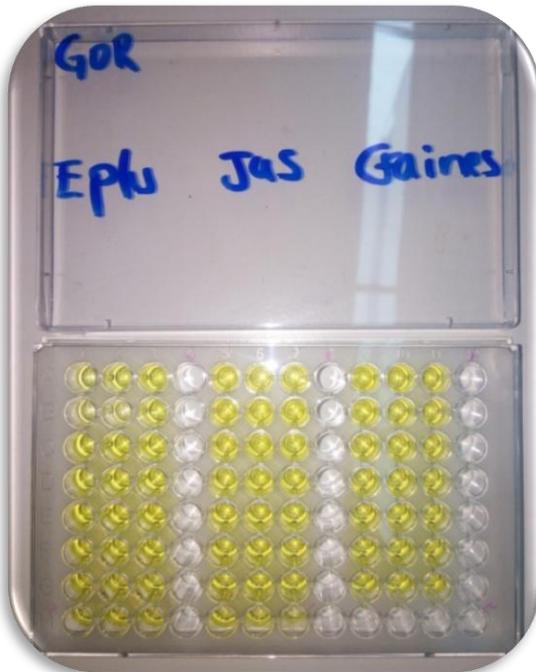


Figure 11 : Test GOR.



Figure 12 : Test CUPRAC.



Figure 13 : Test Reducing power.

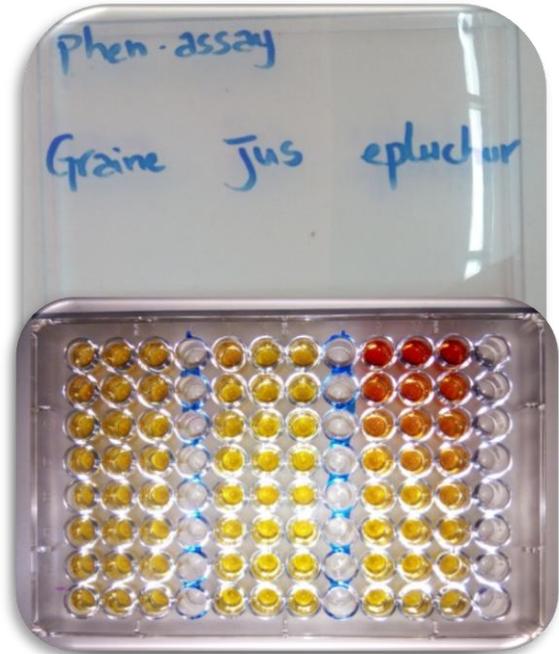


Figure 14 : Test Phenanthroline assay.

✚ Etude de l'activité enzymatique



Figure 15 : Activité inhibitrice de l'ACHE.



Figure 16 : Activité inhibitrice de la Tyrosinase.

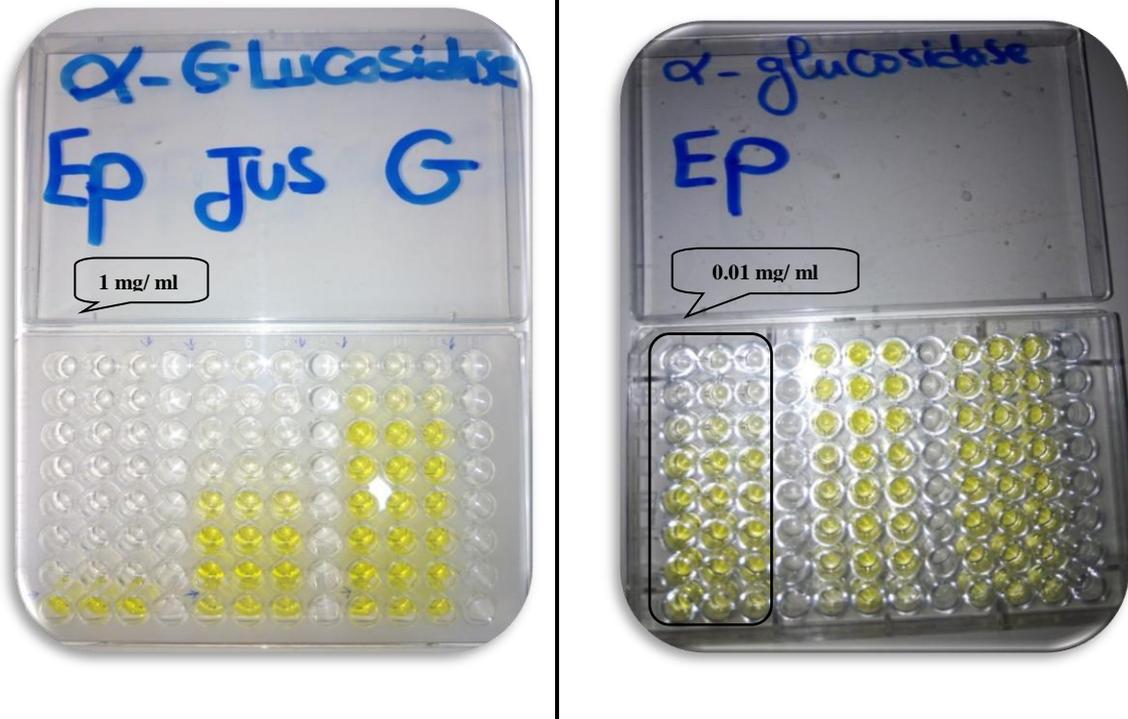


Figure 17 : Activité inhibitrice de l' α -glucosidase.

Résumés

Résumé

La présente étude contribue à la valorisation d'une plante médicinale "*Punica granatum* L." par l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : l'activité antioxydante et enzymatique des extraits d'écorces, de jus et de graines. Le criblage phytochimique de ces trois extraits a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires : les polyphénols et flavonoïdes totaux. Une considérable activité antioxydante des extraits éthanoliques d'écorce et de graines plus, le jus a été révélée par l'utilisant de six méthodes ; le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS, le piégeage du radical GOR, la réduction du cuivre par la méthode CUPRAC, le teste du pouvoir réducteur et le test de Phenanthroline. D'autre part l'activité enzymatique des extraits de grenade est testée par trois activités inhibitrice de : la tyrosinase, le cholinestérase, et l'alphaglucosidase, et qui ont démontré une excellente activité anti-alphaglucosidase.

Mots clés : *Punica granatum* L., polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité enzymatique.

Abstract

The present study contributes to the valorization of a medicinal plant "*Punica granatum* L." by the evaluation of its chemical and biological properties namely: the antioxidant and enzymatic activity of the extracts of peels, juice and seeds. Phytochemical screening of these three extracts revealed the presence of the main secondary metabolites: polyphenols and total flavonoids. Considerable antioxidant activity of ethanolic extracts of peels and seeds plus juice was revealed by using six methods; scavenging of the free radical DPPH, scavenging of the radical ABTS, trapping of the radical GOR, reduction of copper by the method CUPRAC, the test of the reducing power and the test phenanthroline. On the other hand, the enzymatic activity of pomegranate extracts is tested by three inhibitory methods: tyrosinase, cholinesterase, and alpha glucosidase, which have demonstrated excellent anti-alpha glucosidase activity.

Key words: *Punica granatum* L., polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, enzymatic activity.

ملخص

ساهمت هذه الدراسة في تمييز نبات طبي ينتمي إلى عائلة "*Punica granatum L.*" وذلك من خلال تقييم خواصه الكيميائية والبيولوجية والمتمثلة في : النشاط المضاد للأكسدة والإنزيمات لمستخلصات قشور الرمان والعصير والبذور. كشف الفحص الكيميائي النباتي لهذه المستخلصات الثلاثة عن وجود المركبات الثانوية: البوليفينول والفلافونيدات. تم الكشف عن نشاط كبير مضاد للأكسدة في المستخلصات الإيثانولية من القشور والبذور بالإضافة إلى عصير الرمان باستخدام ستة طرق؛ محاصرة الجذر الحر DPPH، محاصرة الجذر الحر ABTS، محاصرة الجذر الحر GOR، والحد من النحاس عن طريق CUPRAC، واختبار قوة الحد reducing power واختبار phenanthroline. من ناحية أخرى، يتم اختبار النشاط الإنزيمي لمستخلصات الرمان من خلال ثلاثة أنشطة مثبتة: التيروسينات، والكولينستراز، وألفاعلو كوسيداز، والتي أظهرت نشاطاً ممتازاً مضاداً للألفاعلو كوسيداز.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L.* ، البوليفينول ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط الأنزيمي.

**VALORISATION DES PRODUITS FORESTIERS DE LA RÉGION DE
CONSTANTINE : *Punica granatum* L.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master 2 en
Biochimie de la Nutrition.

La présente étude contribue à la valorisation d'une plante médicinale "*Punica granatum* L." par l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : l'activité antioxydante et enzymatique des extraits d'écorces, de jus et de graines. Le criblage phytochimique de ces trois extraits a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires : les polyphénols et flavonoïdes totaux. Une considérable activité antioxydante des extraits éthanoliques d'écorce et de graines plus, le jus a été révélée par l'utilisant de six méthodes ; le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS, le piégeage du radical GOR, la réduction du cuivre par la méthode CUPRAC, le teste du pouvoir réducteur et le test de Phenanthroline. D'autre part l'activité enzymatique des extraits de grenade est testée par trois activités inhibitrice de : la tyrosinase, le cholinestérase, et l'alphaglucosidase, et qui ont démontré une excellente activité antihyperglycémiant.

Mots clés : *Punica granatum* L., Polyphénols, Flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité enzymatique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire 02 de Biochimie « CRBt », Nouvelle Ville – Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : MAMMERY Zineb (MCA - UFM Constantine1),
Rapporteur : MOUAS T. Nardjes (MCA - UFM Constantine1),
Examineur : DJEDOUANI Amelle (Pr - ENS Constantine3).

Date de soutenance : 27/06/2019