

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم بيولوجيا وايكولوجيا النبات.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et physiologie de la reproduction.

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Evaluation de l'effet analgésique et gastro protecteur d'écorces de *Punica granatum* L. chez des rats *Wistar*

Présenté par : LOUAAR Naoual

Le 29/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : ZEGHAD Nadia (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : MAAMERI Zineb (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : MADI Aicha (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

Remerciements

Louanges et remerciements à ALLAH le tout puissant, le Miséricordieux qui m'a donné le courage et la force afin d'achever ce modeste travail.

Je tiens à remercier cordialement mon encadreur Dr ZEGHAD Nadia pour son assistance et son aide afin d'améliorer le contenu de ce mémoire.

Je remercie également les membres de jurys :

Dr MAAMERI Zineb et Dr MADI Aicha

Ma famille qui m'a encouragée tout le temps

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sans oublier Dr KAROUR Nacerine qui m'a beaucoup soutenue

Merci.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents

Mes frères Amine, Ahmed, Salah Eddine et Fouad.

Mes sœurs Chorouk et Amira

Ma petite princesse Line

Ma grand-mère Aïcha Talhi

Mon amie Nada Yekhelef

Toute ma famille, amis(es) et camarades ;

Khaled Mohamed Amine, Djouheina et Kamilia

Table des matières

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur *Punica granatum L* الرمان..... 03

1/Description botanique 03

2/Systématique botanique..... 04

3/Origine et distribution géographique..... 05

4/Usages traditionnels et empiriques de *Punica granatum L*..... 05

5/Composition chimique de grenade..... 08

5.1/ Jus de grenade..... 08

5.2/ Graines de grenade..... 08

5.3/ Ecorce de grande..... 09

6/ Activités biologiques des écorces de grenade..... 10

6.1/ Activité antioxydante..... 10

6.2/ Activité anti inflammatoire..... 11

6.3/ Activité antimicrobienne..... 11

6.4/ Activité antifongique..... 11

6.5/ Activité antidiabétique..... 12

6.6/ Activité anticancéreuse..... 12

Chapitre II : Synthèse bibliographique sur l'effet analgésique et gastroprotecteur 14

1/ Effet analgésique..... 14

1.1/ Définition d'une douleur..... 14

1.2/ Physiologie de la douleur..... 14

1.3/ Les antalgiques..... 14

1.3.1/ Antalgiques opiacés (morphiniques)..... 14

1.3.2/ Antalgiques non morphiniques..... 15

1.3.3/ Antalgiques naturels 15

1.4/Mécanisme d'action des substances analgésiques..... 15

2/ Effet gastro protecteur(Estomac)..... 16

2.1/ Généralités..... 16

2.2/ Anatomie..... 16

2.3/ Histologie et physiologie gastrique..... 17

2.4/ Ulcère gastrique..... 18

2.5/ Facteurs d'agression de la muqueuse gastrique.....	18
2.6/ Mécanismes physiologiques de défense contre l'ulcère gastrique.....	19
2.7/ Traitement des ulcères.....	19
2.7.1/ Traitement par substances chimiques	19
2.7.2/ Traitement par substances biologiques.....	20
Matériel et méthodes	
1/ Matériel végétal.....	21
2/ Méthode d'extraction	21
3/ Evaluation des activités biologiques <i>in vivo</i>	22
3.1/ Matériel animal.....	22
3.2/ Activité analgésique.....	22
3.2.1/ Activité analgésique périphérique (Test de torsion).....	22
3.2.2/ Activité analgésique centrale (Test de la plaque chauffante).....	24
3.2.3/ Activité analgésique centrale (Test d'immersion de la queue).....	25
3.3/ Activité gastroprotectrice.....	25
3.3.1/ Détermination d'effet gastroprotecteur.....	26
3.3.2/ Examen microscopique des coupes histologiques	27
Résultats et discussion	
1/ Evaluation de l'effet antalgique d'extrait d'écorce de <i>Punica granatum</i> L.....	28
1.1/ Test de torsion.....	28
1.2/ Tests d'immersion de la queue et de la plaque chauffante.....	29
2/ Evaluation de l'effet gastroprotecteur d'extrait d'écorce de <i>Punica granatum</i> L...	33
2.1/ Examen macroscopique.....	36
Conclusion	38
Références bibliographiques	40
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des figures

Figure 1 : Présentation de <i>Punica granatum</i> L.....	03
Figure 2 : Anatomie d'estomac.....	16
Figure 3 : Ecorce du <i>Punica granatum</i> L.....	21
Figure 4 : Mouvements d'étirement de la patte postérieure et torsion de la musculature dorso-abdominale (crampes abdominales).....	23
Figure 5 : Activité analgésique centrale par le test de la plaque chauffante.....	24
Figure 6 : Activité analgésique centrale par le test d'immersion de la queue.....	25
Figure 7 : Temps de réaction à une excitation thermique (immersion de la queue) pour les lots traités et non traités (contrôle).....	30
Figure 8 : Temps de réaction à une excitation thermique (plaque chauffante) pour les lots traités et non traités (contrôle).....	31
Figure 9 : Analyse macroscopique des ulcères induits par le mélange éthanol/HCl..	34
Figure 10 : Coupes histologiques des estomacs chez les groupes traités et non traités.....	37

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de <i>Punica granatum</i> L.....	04
Tableau II : Utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle	06
Tableau III : Composés phénoliques présents dans l'écorce de grenade	10
Tableau IV : Réduction du nombre de crampes induites par l'acide acétique chez les lots traités et non traité (contrôle).....	28
Tableau V : Temps de réaction à une excitation thermique (immersion de la queue) pour les lots traités et non traités (contrôle).....	29
Tableau VI : Temps de réaction à une excitation thermique (plaque chauffante) pour les lots traités et non traités (contrôle).....	31
Tableau VII : Réduction des ulcères induits par l'éthanol/HCl chez les rats traités	33

Liste des abréviations

LDL :	Lipoprotéine de basse densité
COX 2 :	Cyclo-oxygénases 2
COX :	Cyclo-oxygénases
COX 3 :	Cyclo-oxygénases 3
COX-1 :	Cyclo-oxygénases 1
HCL :	Acide chlorhydrique
HCO-3 :	Les ions bicarbonates
H+	Ion hydrogène
USc :	Surface du contrôle.
USt :	Surface ulcérée du test
Tr/min :	Tour par minute
V :	Volume
AINS :	Anti inflammatoires non stéroïdiens
IP :	Intra-péritonéale

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité jusqu'à nos jours, l'environnement naturel fournit toujours à l'être humain des remèdes efficaces à base des plantes pour combattre la douleur et traiter plusieurs maladies (Ghnimi, 2015 ; Kada, 2018). À la recherche d'un traitement curatif de différentes pathologies, de nombreux médicaments tirent leur origine des plantes médicinales, qui sont depuis toujours une source essentielle de médicaments car elle représente l'unique trésor inépuisable, puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants et de molécules différents (Benkhennich et Hamaida, 2014).

De nombreuses recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation des substances naturelles douées d'activités biologiques afin d'établir des règles scientifiques pour leur usage. Dans ce contexte, le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une évaluation des propriétés analgésiques et gastro-protectrices d'extrait d'écorce de *Punica granatum* couramment utilisées en médecine traditionnelle, dont l'écorce de grenade, a été souvent utilisée contre les ulcères gastriques, les vers intestinaux et les brûlures. Comme puissant antioxydant, la grenade contient toute une variété de flavonoïdes et de tanins hydrolysables qui sont responsables de plus de 85% de leurs activités biologiques (Jurenka, 2008 ; Jacinto, 2018).

Notre étude, s'inscrit dans le cadre d'une étude phytochimique et une évaluation des activités biopharmacologiques d'écorce de grenade (*Punica granatum* L.), en se fixant comme objectif sur :

- Extraction et caractérisation du profil en composés phénoliques des extraits de la plante étudiée ;
- Evaluation *in vivo* d'effet analgésique et gastroprotecteur, d'extrait hydroalcoolique d'écorce de *Punica granatum* L. chez des rats *Wistar*.

La première partie du manuscrit traite des données bibliographiques regroupant dans un

premier chapitre les aspects botaniques, taxonomiques et pharmacologiques sur l'espèce étudiée. Un deuxième chapitre s'intéresse aux propriétés pharmacologiques ; activité analgésique et gastro-protectrice.

La deuxième partie est organisée en deux sous parties ; la première sous partie présente le matériel et les méthodes, alors que la seconde sous partie englobe les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui permettra de dégager quelques perspectives de prolongement à ce travail, les références bibliographiques.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur *Punica granatum* L. گران**1/ Description botanique**

La grenade (*Punica granatum* L.), est un petit arbre monoïque, appartient à la famille des Punicaceae à port arbustif qui peut atteindre de 1.5 à 5m de hauteur, avec des branches plus ou moins irrégulières, épineuses et des feuilles brillantes et caduc, qui se développent dans les régions tempérées et à feuilles persistantes dans les régions froides (Lairini *et al.*, 2014) (Bakhtaoui *et al.*, 2019)

La grenade peut vivre jusqu'à 200 ans mais est le plus productif en fruits dans ses 20 premières années de fructification. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Elles apparaissent en trois vagues de mai à août. Les fruits de la première floraison sont ceux ayant un meilleur taux de nouaison (90 %) et qui donnent les plus gros fruits. Seul 1/3 des fleurs donne un fruit car les 2/3 des fleurs sont mâles. Ses fruits, sont des baies jaunes à rouge orangé contenant en moyenne 600 semences pulpeuses. La couleur des fruits n'indique pas le degré de maturité des semences. En effet, certaines variétés donnent des épidermes bien rouges bien avant la maturité. Selon les variétés, la maturité des fruits est atteinte entre 5 et 8 mois après la première floraison (Fawole et operat, 2013) .



Figure 1 : Présentation de *Punica granatum* L. (wikipidia,2022)

La grenade peut s'adapter à différents types de sols. Cependant, cette plante est sensible aux sols qui ont un faible drainage et sa croissance dans ces conditions est faible donc la qualité du produit est diminuée. Les meilleures conditions de sol pour cultiver la grenade sont les sols argileux profonds et c'est dans les régions aux étés chauds et longs que la croissance de grenade se caractérise par une meilleure qualité. Certaines espèces de cette plante sont bien cultivées à basse altitude et d'autres à haute altitude (Miloud, 2019).

2/ Systématique botanique

La classification de *Punica granatum* L. a été décrite au 19^{ème} siècle le père de taxonomie Carl Von Linnee. Une nouvelle classification a été créée en 1998 par un groupe de chercheurs botanistes en se basant sur les critères moléculaires notamment à l'ADN (classification phylogénétique), cette classification a été révisée en 2003 dont il convient de retenir que pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales il est nécessaire de modifier leur position. Cependant, pour le cas de *Punica granatum* L. la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées (Tableau I) comportant 30 genres et 600 espèces (Spichiger *et al.*, 2004 ; Zeghad, 2018).

Tableau I : Classification botanique de *Punica granatum* L. (Spichiger *et al.*, 2004)

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

3/ Origine et distribution géographique

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est originaire du moyen orient, il s'est propagé à travers la mer méditerranéenne, vers l'extrême orient en Chine et en Inde et dans le nouveau monde en Californie et Mexique (Lansky et Newman, 2007). Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. On le rencontre déjà plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique (Wald, 2009).

En Algérie, il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées surtout dans le nord d'Algérie qui est caractérisée par le climat subhumide ; dans les petits jardins en Kabylie, le plaine de Mitidja (Chelif, Tipaza, Blida, Ain Defla) et on le trouve aussi au sud du pays (Ouargla, Adrar...etc.) (Kaci Meziane *et al.*, 2015). Le pays occupe donc une place prépondérante parmi les pays producteurs de grenade malgré les difficultés techniques et économiques. Comme les exportations rencontrées dans ce secteur. (Kaci Méziane *et al.*, 2015).

4/ Usages traditionnels et empiriques de *Punica granatum*

La grenade est utilisée depuis des centaines d'années dans la médecine traditionnelle. L'utilisation des différentes parties du grenadier varie d'une région à l'autre selon la portion utilisée, fraîche ou sèche. Son intérêt thérapeutique a été reconnu par la communauté médicale dans de nombreux pays à travers le monde (Tableau II).

Tableau II: Utilisation des différents organes du grenadier en médecine traditionnelle (Wald, 2009)

Organes utilisés	Fins thérapeutiques	Région / Pays
Fleurs	<ul style="list-style-type: none"> - Anthelminthique et astringent. - Soulager les épistaxis, otites et hémorragies. - Toniques et astringentes. - Traiter la diarrhée et la dysenterie, les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée, le gonflement atonique des amygdales et le relâchement de la luvette et des gencives. 	Chine et Egypte
Racines	<ul style="list-style-type: none"> - En décoction pour traiter le ténia, les diarrhées chroniques, les dysenteries chroniques et les pertes blanches ou hémorragiques 	Chine
Feuilles et écorce des rameaux	<ul style="list-style-type: none"> -Tonique agréable. - La débilité de l'estomac, le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, la chlorose, l'anémie, la migraine 	Chine
Écorce de grenade	<ul style="list-style-type: none"> - Effets vermifuges. - Anthelminthique. -Toniques et astringentes 	

	- Traiter la diarrhée et la dysenterie, les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée, le gonflement atonique des amygdales et le relâchement de la luette et des gencives	
Jus de grenade	- Réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité.	Afrique du Nord et Inde
Peau de grenade	- Effets astringents pour l'intestin, pour "arrêter le sang" et pour "chasser les parasites", diarrhée et dysenterie chroniques, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée, hyperménorrhée, pertes blanches, accumulation de parasites, douleurs abdominales.	Chine
Graines de grenade	-Soulager les ulcères atoniques.	Chine
Suc de grenade	-Rafraîchissant, diurétique, adoucissant	Chine

5/ Composition chimique de la grenade

La composition chimique de grenade varie selon les espèces et au sein d'une même espèce. Elle dépend des conditions de culture, de la qualité du sol, du climat, des irrigations, et de la période de récolte (Özkan, 2002). La grenade contient dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arbres, et graine.

5.1/ Jus de grenade

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose. D'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. De nombreuses études ont montré également que le jus de grenade contient un pourcentage élevé de vitamines soluble dans l'eau, dont es plus importantes sont la vitamine C et la vitamine A avec des concentrations variant entre 4 et 6 mg/100g. La grenade a aussi une concentration assez importante en minéraux (Hmid *et al.*, 2013), entre les différents composés qui pourraient servir de marqueurs sans équivoque dans un produit de jus de fruits, les acides organiques et les composés phénoliques qui sont potentiellement les plus utiles en raison de leur ubiquité, leur spécificité et leur multiplicité (Hmid *et al.*, 2013)

Le grenadier contient aussi des flavanols et des indole-amines comme la tryptamine, la sérotonine, neuroméiateur qui intervient dans la régulation du sommeil, de l'appétit et de l'humeur ainsi que la mélatonine, connue sous le nom « d'hormone du sommeil » qui intervenant dans la régulation des rythmes chronobiologiques (Lansky *et al.*, 2007). Enfin, sa teneur en composés phénoliques et surtout en anthocyanines, puissantes molécules antioxydantes fournissant au jus de grenade sa couleur brillante, augmente jusqu'à maturité du fruit et diminue après la pression du fruit (Hernandez *et al.*, 1999).

5.2/ Graines de grenade

L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, acides gras présentant au moins une double liaison, essentiellement représentée par l'acide

punicique, acide cis-9, trans-11, cis- 15, octadécatriénoïque, mais également par les acides oléiques et linoléiques (Hornung *et al.*, 2002). Cette huile se compose aussi d'acides gras saturés, qui ne présentent aucune double liaison, comme les acides palmitiques et stéariques (Lansky *et al.*, 2007).

5.3/ Ecorce de grenade

Les écorces de grenade représentent environ 40% du fruit, elles sont riches en dérivés d'acide ellagique tels que les ellagitanins, la punicalagine et la punicaline. De plus, certains dérivés de l'acide ellagique (hexoside d'acide ellagique, pentoside d'acide ellagique) . Une étude a montré que la peau de grenade contient 79 composés phénoliques, dont 16 acides phénoliques, 12 flavonoïdes, 35 tanins hydrolysables, 8 proanthocyanidines et 8 anthocyanes (Ambigaipalan *et al.*, 2016). Les acides phénoliques étaient les principaux composés phénoliques de la peau de grenade, suivis des tanins hydrolysables, des proanthocyanidines et des flavonoïdes, principalement présents sous forme insoluble (Ambigaipalan *et al.*, 2016 ; Derakhshan *et al.*, 2018)

L'écorce du fruit contient également, deux importants acides hydroxybenzoïques ; l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, des molécules de coloration jaune et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitanins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la granatine A et la granatine B (Lansky *et al.*, 2007). La pelletierine pourrait aussi se trouver dans l'écorce de la grenade (Lansky *et al.*, 2007).

Tableau III : Composés phénoliques présents dans l'écorce de grenade (Singh *et al.*, 2018 ; Smaouia *et al.*, 2019).

Famille des composés phénoliques	Principaux composés identifiés
Acides phénoliques	Acides chlorogéniques, caféique, synergique, sinapique, <i>p</i> -coumarique, férulique, vanillique, éllagique, gallique et cinnamique
Flavonoïdes	Catéchine, épicatechine, quercétine, anthocyanes, procyanidines, flavonols et flavones
Tanins	Granatine A, granatine B, punicaline, punicalagine, corilagine, gallagydilactone, pédonculagine et tellimagrandine

6/ Activités biologiques des écorces de grenade

La grenade est l'un des végétaux les plus riches en antioxydants (polyphénols solubles, tanins, anthocyanes) qui détruisent les espèces réactives et aident à protéger l'ADN contre diverses dégradations à l'origine de nombreuses pathologies sévères comme les maladies cardiovasculaires et le cancer.

6.1/Activités antioxydante

Les antioxydants sont fortement présents dans l'extrait aqueux de l'écorce de grenade. Les principaux polyphénols antioxydants présents dans le jus de grenade sont les ellagitanins et les anthocyanines. Les ellagitanins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce (Seeram *et al.*, 2006). Cette activité antioxydante des polyphénols est conférée par leurs structures dont ces derniers sont des donneurs d'atomes d'hydrogène ; Ils peuvent interagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote. A la fin de la réaction, le nouveau cycle de génération de radicaux est interrompu, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, avec une plus grande stabilité chimique du radical initiale (Spiller, 2007).

Une étude distincte chez des rats atteintes de lésions hépatiques a montré que le prétraitement avec extrait de l'écorce de grenade a amélioré l'activité de piégeage des radicaux libres des enzymes hépatiques : la catalase, la superoxyde dismutase, et la peroxydase, et a abouti à 54% de réduction des valeurs de la peroxydation lipidique par rapport aux témoins (Chidambara *et al.*, 2002). D'autres études ont montré que l'extrait d'écorce de grenade réduit la peroxydation lipidique dans les tissus du foie, du cœur et des reins (Parmar et Carr, 2008).

6.2/ Activité anti inflammatoire

Les troubles inflammatoires sont causées par la production excessive de médiateurs inflammatoire qui sont due à l'activité des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, et à la production excessive d'espèces d'oxygène réactives (ROS). Une étude a montré que l'extrait aqueux de l'écorce de grenade est largement utilisé pour traiter les troubles de l'inflammation, les ulcères et les infections (Bachoual *et al.*, 2011). Une étude d'un groupes de chercheurs a montré que l'administration de l'extrait de *Punica granatum* (6 mg/ jour/souris) durant 4 semaines réduit la cholestérolémie (cholestérol total et LDL), et réduit l'expression de gènes inflammatoires (COX-2 et les interleukines 1b et 6) dans le colon et le tissu adipeux viscéral. Ces résultats assurent l'importance de la consommation d'extrait de grenade riche en polyphénols dans le contrôle des troubles métaboliques et inflammatoires associés à l'obésité (Neyrink *et al.*, 2012).

6.3/ Activité antimicrobienne

L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède une activité antibactérienne considérable. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes. Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressant (Neurat *et al.*, 2004). Prashanth et ses collaborateurs (2001) ont étudié, en laboratoire, l'action d'extrait des écorces de grenade sur six types de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les résultats de cette étude ont montré qu'il y a une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Cependant, l'extrait de méthanol semble avoir une plus grande activité antibactérienne par rapport aux autres solvants surtout vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*.

6.4/ Activité anti fongique

Les études montrent que l'écorce de grenade a des principaux composés bioactifs ayant une activité antifongique parmi lesquelles on note principalement les ellagitanines et les punicalagines (Gil *et al.*, 2000). Certains travaux ont aussi montré que l'extrait éthanolique a un effet inhibiteur contre les deux souches *Ascochyta rabiei* Pass Labr et *Fusarium oxysporum* en fonction de la relation dose- effet (Kanoun *et al.*, 2014). Les chercheurs ont trouvé que les extraits aqueux de l'écorce de grenade a des effets sur les taux de croissance de six champignons filamenteux pourris ; *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Stemphylium botryosum*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium spp* (Glazer *et al.*, 2012). Une autre étude a montré l'efficacité de l'extrait éthanolique de l'écorce de grenade dans le traitement des plaies infectées par des champignons chez les lapins (Al-Saeed *et al.*, 2015).

6.5/ Activité anti diabétique

La consommation de jus de grenade réduit considérablement le stress oxydatif chez les patients diabétiques sans affecter les indicateurs du diabète. Esmailzadeh et ses collaborateurs (2006) ont montré que les fleurs de grenade ont un bon effet sur le diabète. Certaines études ont été menées ces dernières années sur ces fleurs, afin de déterminer scientifiquement s'ils ont de véritables pouvoirs hypoglycémiant. En fait, Jafri et son équipe (2000) ont déterminé que l'extrait éthanolique des fleurs de grenade a une réelle capacité à faire baisser la glycémie en travaillant sur la glycémie après avoir mangé avec un mécanisme similaire à l'acarbose (inhibiteur de l'alpha-glucosidase) et sur la base de la composition chimique des fleurs de grenade, ils pensent que les ingrédients actifs de ces extraits sont l'acide gallique et/ou l'acide asiatique.

6.6/ Activité anti cancéreuse

Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et d'écorce de grenade étant les plus efficaces (Kawaii et Lansky, 2004). L'acide ellagique, l'acide caféique, la luteoline et l'acide punique sont tous des composés phénoliques avec des actions anticancéreuses connues (Lansky *et al.*, 2005). D'autre part, ils semblent présenter d'intéressantes et multiples propriétés contre le cancer de la prostate (Malik *et al.*, 2005), cancer du sein (Kim *et al.*, 2002), cancer du poumon

(Syed *et al.*, 2007), cancer du côlon (Heber *et al.*, 2006) et le cancer de la peau (Syed *et al.*, 2007).

Chapitre II : Synthèse bibliographique sur l'effet analgésique et gastroprotecteur

1/ Effet analgésique

1.1/ Définition d'une douleur

La douleur est définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. La transmission douloureuse est un phénomène complexe, impliquant des mécanismes électrophysiologiques et neurochimiques (Den Hoogen *et al.*, 2019). Une douleur chronique est une douleur qui a une durée d'évolution de plus de 3 mois. Elle persiste et devient résistante aux antalgiques usuels; elle représente pour le patient l'essentiel de sa maladie avec un fort retentissement psychologique et social (Laroche, 2014).

1.2/ Physiologie de la douleur

La douleur trouve son origine dans la stimulation de différents nocicepteurs correspondant aux extrémités des neurones sensoriels afférents dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la racine dorsale. Il est également nécessaire de rappeler que la douleur représente une modalité sensorielle complexe accompagnée de plusieurs aspects : affectifs et cognitifs et aussi associée à des réponses neurovégétatives (Almeida *et al.*, 2014); d'où la complexité des différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif.

1.3/ Les antalgiques

Un antalgique est un médicament utilisé dans la lutte contre la douleur. Il existe plusieurs sortes d'antalgiques qui sont dispensés en fonction du type de douleurs rencontrées. Ils sont repartis en deux classes: les antalgiques opiacés et les antalgiques non opiacés (Monassier, 2005).

1.3.1/ Antalgiques opiacés (morphiniques)

Les opiacés sont des substances naturelles ou synthétiques dérivées de l'opium. Ce sont des médicaments qui se lient aux récepteurs opioïdes du système nerveux central. Ils sont utilisés en médecine comme antalgiques puissants pour soulager les douleurs sévères ou chroniques (Roulet *et al.*, 2007). Ils sont classés en :

- Peptides opioïdes endogènes produits dans le corps: endorphines, dynorphines et enkephalines ;
- Alcaloïdes de l'opium: morphine, codéine et thébaine.
- Opioïdes semi-synthétiques: héroïne, oxycodone, hydrocodone, dihydrocodeine, hydromorphone, oxymorphone et nicomorphine.
- opioïdes totalement synthétiques: pethidine ou demerol, methadone, fentanyl, propoxyphene, pentazocine, buprenorphine, butorphanol, tramadol...etc (Kumar *et al.*, 2010)

1.3.2/ Antalgiques non morphiniques

Ce sont les traitements antalgiques simples souvent couplés à une action antipyrétique. Les antalgiques non morphiniques regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques des douleurs dont le mécanisme d'action est indépendant des récepteurs opioïdes (Perrot *et al.*, 2013).

Le paracétamol (acétaminophène) est un analgésique couramment utilisé, associé aux AINS (Anti inflammatoires non stéroïdiens), partageant des propriétés antipyrétiques et analgésiques, et utile pour soulager la douleur légère à modérée. Malgré son utilisation courante, le mécanisme d'action du paracétamol est mal compris. Le paracétamol partage des propriétés d'inhibition de la cyclooxygénase (COX) avec les AINS. L'inhibition de l'isoforme centrale COX-3 pourrait être responsable des effets du paracétamol (Smith, 2009 ; Oscier et Milner, 2009).

Les AINS constituent un groupe de composés qui partagent des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques, antipyrétiques et antiplaquettaires. Ils agissent par inhibition du système enzymatique COX, ce qui entraîne une réduction de la douleur inflammatoire, mais également des effets délétères par manque de prostaglandines et de prostacyclines (Ky *et al.*, 2018).

1.3.3/ Antalgiques naturels

Dans le domaine des analgésiques, la source de nouveaux médicaments était les plantes et leurs extraits. Chaque famille chimique de principes actifs (flavonoïdes, alcaloïdes, etc.) peut avoir un effet pharmacologique différent. La classification par propriété médicinale n'est pas exclusive. Les plantes médicinales qui ont la propriété d'être antalgique ont pour fonction de

soulager la douleur. Par exemple la morphine fait partie des médicaments antalgiques, qui ont été isolée depuis des sources naturelles (Bounihi, 2016).

1.4/ Mécanisme d'action des substances analgésiques

Les AINS sont généralement classés parmi les analgésiques à activité modérée. Leur action varie au type des douleurs, ils s'avèrent très efficaces dans le traitement de la douleur associée à l'inflammation (Bianco *et al.*, 2006). La principale mode d'action antalgique est liée à l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX-1) puisque les prostaglandines peuvent sensibiliser les récepteurs de la douleur aux stimulations mécaniques et chimiques (Bianco *et al.*, 2006).

2/ Effet gastro protecteur (Estomac)

2.1/ Généralités

L'estomac est un organe creux, son rôle principal est stocker les aliments, d'amorcer leur digestion et de les délivrer progressivement au duodénum. La production d'acide chlorhydrique est spécifique de l'estomac. Du fait de sa situation anatomique, l'estomac est aisément accessible à l'endoscopie (Elsevier, 2014).

2.2/ Anatomie

L'estomac est un segment dilaté du tube digestif, s'étend de l'œsophage au duodénum (Belhadj 2011). Situé entièrement dans l'abdomen entre le foie, la rate le diaphragme et le colon transverse (Oueld elhachemi, 2012). Classiquement Il a la forme d'un « j » divisé en quatre parties :

- Un orifice supérieur d'abouchement de l'œsophage « le cardia » ;
- Une portion supérieure délatée « le fundus » ;
- Une région centrale le corps ;
- Un orifice inférieur « le pylore » qui est l'extrémité de l'antrum (Bessede, 2012).

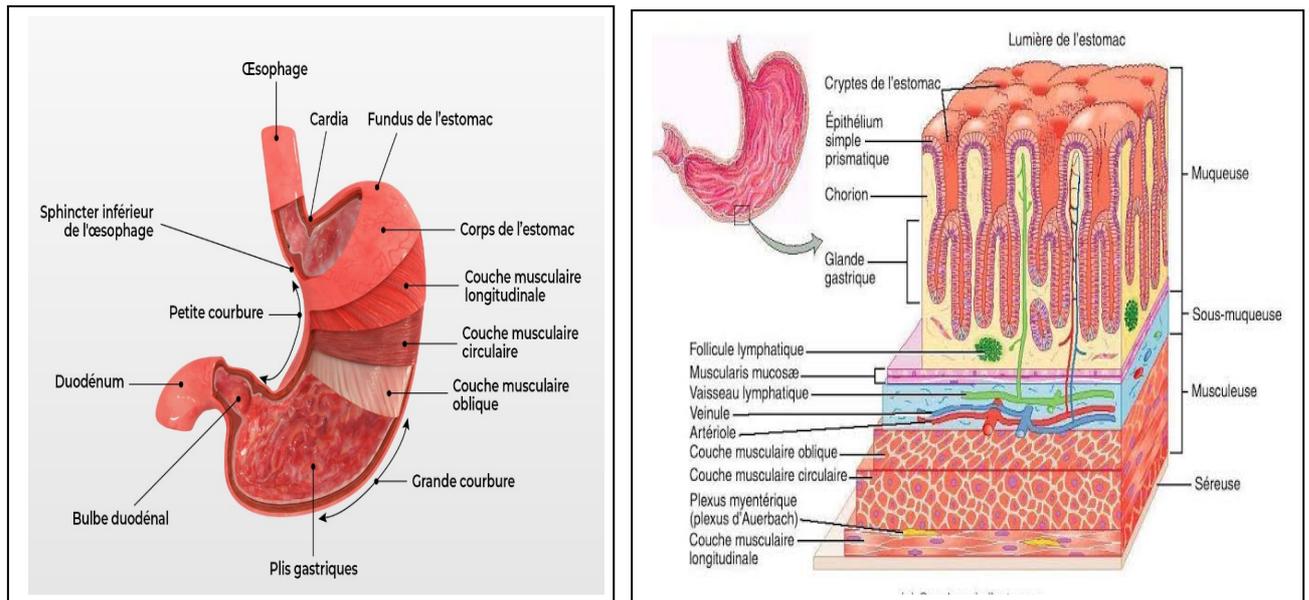


Figure 2 : Anatomie d'estomac

2.3/ Histologie et physiologie gastrique

La paroi gastrique présente quatre couches fonctionnelles distinctes, représentées, de l'intérieur vers l'extérieur par : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (péritoine viscéral).

- **La muqueuse** : Une couche profonde, épaisse de 0,3 à 1 mm, elle comporte un revêtement épithélial soutenu par un tissu conjonctif appelé chorion (Marieb et Hoehn, 2010). Cette couche possède quatre types cellulaires différents : les cellules principales qui produisent le pepsinogène et la lipase gastrique (Stevens et Lowe, 2006). Les cellules pariétales (cellules bourdantes) qui sécrètent de l'acide chlorhydrique et le facteur intrinsèque (Tortora et Derrickson, 2010). Les cellules à mucus (cellules du collet), qui ont le rôle de protection de la surface de l'estomac contre l'agressivité de l'acide chlorhydrique (Lacour et Belon, 2015). Les cellules neuroendocrines gastriques (cellules «G»), qui sécrètent la gastrine sous la stimulation du système parasympathique et des peptides gastriques (Heath *et al.*, 2008).
- La sous-muqueuse : est constituée d'un tissu conjonctif assez dense, riche en plasmocytes, mastocytes, lymphocytes isolés et polynucléaires éosinophiles. Elle

contient des vaisseaux sanguins, des neurofibres et follicules lymphatiques (Marieb et Hoehn, 2010).

- La musculuse: Elle contribue au processus de brassage et de progression du bol alimentaire. Elle comporte trois types de fibres musculaires lisses, longitudinales externes, circulaires moyennes et obliques internes (Lacour et Belon, 2015).
- La séreuse : Enfin, la tunique externe ou la séreuse, est formée de tissu conjonctif lâche recouvrant d'une seule couche de cellules aplaties et composant le péritoine viscéral (Marieb et Hoehn, 2010).

2.4/ Ulcère gastrique

L'ulcère de l'estomac connu aussi sous le nom ulcère gastrique, il est défini comme une lésion de la paroi digestive, avec destruction des cellules productrices de mucus (Chaibi 2009), caractérisé par une perte de ses substances localisées, profondes, arrondies ou ovalaires à bords nets recouvertes d'une fausse membrane jaunâtre atteignant en profondeur la musculuse (Petigars, 2015). Généralement accompagné avec des douleurs à l'abdomen qui résulte du contact de l'acide sécrété par l'estomac et les plaies (Nyilimana, 2007). Il est préférentiellement localisé au niveau de la petite courbure gastrique (90% de cas), et dans 60% des cas au niveau de l'antrum (Oued elhachemi, 2012). Il est favorisé par une diminution de la cytoprotection (Keïta, 2005). On distingue selon la profondeur de la lésion ; une abrasion, une érosion, un ulcère vrai (Keith *et al.*, 2006).

2.5/ Facteurs d'agression de la muqueuse gastrique

L'intégrité de la muqueuse gastrique est maintenue par un processus dynamique de la prolifération et la mort cellulaire, parmi les différents facteurs impliqués dans les lésions de la muqueuse gastrique, les dommages oxydatifs et l'apoptose provoquée par diverses ulcérogènes (Rostami-Motamed *et al.*, 2015). La muqueuse gastrique est continuellement exposée à des facteurs d'agression (Rozza *et al.*, 2013) :

- Alcool : l'alcool est un puissant agent ulcérologique, sa consommation excessive provoque des lésions hémorragiques aiguës, l'exfoliation de l'épithélium, infiltration de cellules inflammatoires et des érosions gastriques (Chen *et al.*, 2015; Jeon *et al.*, 2015). En outre, l'éthanol provoque des ulcères gastriques par abaissement des facteurs de protection de la muqueuse gastrique (Choi *et al.*, 2009) ;

- Acide chlorhydrique (HCl) : Cet agent est considéré comme un facteur agressif important dans l'estomac et connu pour son induction de dommages gastriques lorsqu'il est introduit de manière exogène en quantité excessive dans l'estomac normal. Le HCl endogène dénature les protéines dans la membrane plasmique et catalyse les groupements polysaccharidiques des protéoglycanes dans la couche de la muqueuse protectrice recouvrant la surface liminale de l'estomac induisant la fragilité de la muqueuse. Le HCl exogène quant à lui provoque de graves dommages nécrotiques par action nécrosante directe sur la muqueuse (Havsteen, 2002).
- Stress : qui entraîne une vagotonie conduisant à la diminution du flux sanguin de la muqueuse gastrique, et à l'augmentation de la sécrétion de pepsinogène et d'acide (Martins *et al.*, 2014).

2.6/ Mécanismes physiologiques de défense contre l'ulcère gastrique

Les mécanismes qui participent à la protection de l'estomac sont :

- Film muqueux: gélifié d'une épaisseur de 0,1 à 0,5 mm, il protège la surface de l'épithélium ;
- Ions de bicarbonate (HCO_3^-): sécrétés par l'épithélium, ils diffusent dans le film de mucus où ils vont tamponner les ions H^+ provenant de la lumière de l'estomac ;
- Cellules épithéliales: elles peuvent empêcher efficacement la pénétration des ions H^+ ou refouler vers l'extérieur ceux qui sont rentrés
- Flux sanguin: la dernière ligne de défense est l'irrigation sanguine de la muqueuse, le sang emporte rapidement les ions H^+ ou fournit un apport d'ions HCO_3^- et des substrats du métabolisme énergétique (Silbernagl et Lang, 2012).

2.7/ Traitements des ulcères

2.7.1/ Traitement par substances chimiques

La thérapeutique anti ulcéreuse repose sur deux volets : inhibition de la sécrétion acide (sécrétion chlorhydro-peptique gastrique) ou bien la protection de la muqueuse gastrique vis-à-vis des agressions en particulier l'hyperacidité. Mais avec la découverte de l'implication de *Helicobacter pylori* dans l'ulcère, l'éradication de cette dernière demeure un élément fondamental (Nyilimana, 2007). La multiplicité des spécialités anti-ulcéreuses rend très souvent difficile le choix d'un traitement par le praticien, pour cela, plusieurs substances sont utilisées :

- Anti-acides qui ont pour effet la neutralisation de l'acidité gastrique (le bicarbonate de soude, la magnésie calcinée) (Nyilimana 2007) ;
- Anti-sécrétoires, il existe aujourd'hui deux classes médicamenteuses inhibant la sécrétion d'acide gastrique : les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), on trouve l'oméprazole, lansoprazole, pantoprazole et rabéprazole. Ou bien les antihistaminiques H₂, on trouve la Cimétidine la Ranitidine, la Famotidine, la Nizatidine (Le Tourneur 2014) ;
- Agents cryoprotecteurs (Le nitrate basique ou sous-nitrate de bismuth, le carbonate basique). Dans le cas ou une infection à *Helicobacter pylori* est associée, le traitement consiste a l'éradication de cette bactérie en associant deux antibiotiques généralement l'amoxiciline et clarithromycine.

Dans le cas des ulcères gastriques, il est recommandé de poursuivre le traitement de 3 à 7 semaines (Le Tourneur 2014).

2.7.2/ Traitement par substances biologiques

Le traitement médicamenteux des ulcères gastriques par les substances chimiques peut être remplacé par la phytothérapie, l'art de traiter par les plantes médicinales. La phytothérapie a considérablement évolué ces dernières années notamment dans les pays en voie de développement, vue la sécurité présumé qu'il offre par rapport au traitement par les médicaments classiques (John-Africa, Yahaya *et al.*, 2014).

*Matériel et
méthodes*

1/ Matériel végétal

Le matériel végétal obtenu de source naturel est constitué des écorces des fruits matures de grenade (*Punica granatum* L.). Les écorces ont été lavés abondamment avec de l'eau du robinet, rincés à l'eau distillée et séchés à l'air libre et à l'ombre. Le matériel végétal sec a été transformé en poudre à l'aide d'une broyeuse électrique (Retsh SM 100, Allemagne) et stockés à basse température dans des bocaux en verre ambrés et fermés hermétiquement jusqu'à extraction.



Figure 3 : Ecorce du *Punica granatum* L.

2/ Méthode d'extraction

Le procédé d'extraction a été réalisé par macération. Les poudres des déchets de fruits broyés (400 g) ont été extraites par macération par le système solvant méthanol / eau (70/30) (3x1000 ml) sous agitation magnétique. L'extraction est assistée par ultrasons (Fisher scientific fb 15046, Leicestershire, Angleterre) pendant 60 minutes à une température ambiante, avec renouvellement du solvant chaque 24h. Les extraits combinés et filtrés sur papier filtre ont été concentrés dans un évaporateur rotatif sous vide à une température <40°C (Buchi R-200, Medellin, Colombia). Les extraits obtenus, sont stockés à basse température (-25°C) jusqu'à analyse (Zeghad, 2018).

3/ Evaluation des activités biologiques *in vivo*

3.1/ Matériel animal

L'étude expérimentale utilisée pour évaluer l'activité analgésique est réalisée sur des rats blancs de sexe mâle, *Wistar* pesant entre 112g et 198 g et âgées de 4 à 8 semaines. Les animaux proviennent de l'institut Pasteur d'Alger, et sont acclimatés au sein de l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie et toxicologie (Institut des Sciences Vétérinaire-Université Constantine 1). Les rats sont maintenus dans des cages en plastique transparentes et aérées, avec accès libre à une alimentation standard. Les animaux sont soumis à une alternance naturelle du jour et de nuit et maintenues à une température de laboratoire. Les animaux sont acclimatés pendant 72 heures, et privés de nourritures 24 heures avant l'expérience.

3.2/ Activité analgésique

3.2.1/ Activité antalgique périphérique (Test de torsion)

Le principe de cette activité consiste à déterminer l'action inhibitrice d'extrait d'écorce de *Punica granatum* L. sur la douleur provoquée chez l'animal. Cette douleur a été induite par l'injection d'une substance chimique (Zeghad *et al.*, 2020)

Trois doses (0.75, 1.5, 3,0 g/kg) d'extrait sont administrés par gavage intra-gastrique (*per os*) aux rats répartis au hasard en cinq lots pour chaque test, chaque lot se compose de quatre rats. Le lot contrôle positif reçoit l'acide acétyle salicylique à raison de 0,1 g/kg et un lot témoin recevant par voie intra-gastrique (*per os*) de l'eau distillée. Les animaux ont été préalablement mis à jeun de 24 heures avec accès libre à l'eau avant l'expérimentation.

Une injection intra-péritonéale (*ip*) de l'acide acétique à 1% a été faite une heure après le traitement par l'extrait de *Punica granatum* à différentes doses, selon une méthodologie décrite précédemment (Zeghad *et al.*, 2016 ; Zeghad *et al.*, 2020). Après un temps de latence de cinq minutes environ, le nombre des crampes est comptabilisé pendant 20 minutes après injection de l'acide acétique. Le syndrome douloureux se traduit par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale appelés crampes abdominales (figure 4) (Zeghad *et al.*, 2016 ; Zeghad *et al.*, 2020).



Figure 4 : Mouvements d'étirement de la patte postérieure et torsion de la musculature dorso-abdominale (crampes abdominales).

Des lots homogènes de rats, en nombre de 4 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes d'extrait de *Punica granatum* L. : 0.75, 1.5 et 3.0 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétyle salicylique (0,1 g/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

L'activité analgésique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur. Celui-ci est déduit de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (\text{N}_{\text{témoins}} - \text{N}_{\text{traité}}) / \text{N}_{\text{témoins}} \times 100$$

$\text{N}_{\text{témoins}}$: nombre des crampes chez le groupe témoin non traité.

$\text{N}_{\text{traité}}$: nombre de crampes chez le groupe traité par l'extrait de *Punica granatum* L. ou par l'acide acétyle salicylique.

Les pourcentages d'inhibition sont exprimés en valeurs moyennes ($n=6$) \pm écart type. Les groupes traités par l'extrait de *Punica granatum* L. ou par l'acide acétyle salicylique sont comparés par rapport aux groupes contrôles utilisant le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

3.2.2/ Activité analgésique centrale (Test de la plaque chauffante)

Le principe de ce test consiste à réduire par l'administration d'extrait de *Punica granatum* L. la douleur provoquée chez des rats déposés sur une plaque chauffante (Zeghad *et al.*, 2016). Après 1h, 2h et 3h de traitement par l'extrait à différentes doses ou par l'acide acétylé salicylique (témoin), les animaux sont déposés sur la surface d'une plaque chauffante maintenue à une température de 55°C (figure 5). Le temps de réaction des rats comptabilisé en secondes correspond à l'intervalle entre le moment où le rat entre en contact avec la plaque chauffante et le moment où il réagit (sursaut, léchage de pattes).

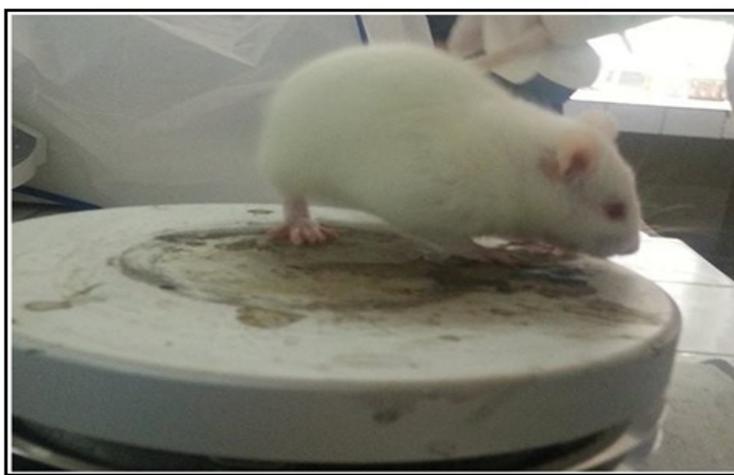


Figure 5: Activité analgésique centrale par le test de la plaque chauffante.

Des lots homogènes de rats, en nombre de 4 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes d'extrait de *Punica granatum* L. : 0.75, 1.5 et 3.0 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétylé salicylique (0,1 g/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

Le temps de réaction est exprimé en moyennes ($n=6$) \pm écarts types pour chacun des lots. La signification statistique entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

3.2.3/ Activité analgésique centrale (Test d'immersion de la queue)

Le principe de ce test consiste à réduire par l'extrait étudié la douleur provoquée suite à l'immersion de la queue d'un rat dans de l'eau chaude (figure 6) (Zeghad *et al.*, 2016). Après 1h, 2h et 3h de traitement des rats par l'extrait de *Punica granatum* L. aux différentes doses et le traitement par l'acide acétyle salicylique, la queue de chaque rat est laissée immerger dans de l'eau chaude maintenue à 55°C.



Figure 6 : Activité analgésique centrale par le test d'immersion de la queue.

Des lots homogènes de rats, en nombre de 4 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes d'extrait de *Punica granatum* L. : 0.75, 1.5 et 3.0 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétyle salicylique (0,1 mg/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

Le temps de réaction est exprimé en moyennes ($n=6$) \pm écarts types pour chacun des lots. La signification statistique entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p<0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

3.3/ Activité gastroprotectrice

L'induction d'ulcère d'estomac a été réalisée sur des rats males de la souche *Wistar* par gavage d'un agent ulcérogène (HCl/Ethanol ; 20/80, v/v). Avant l'expérience, les rats ont

été soumis à un jeûne pendant deux jours mais l'eau potable était accessible jusqu'à 2 heures avant le traitement pour faire en sorte que leurs estomacs étaient vides . Les rats ont été pesés et ensuite administrés en conséquence par un gavage oral. Des lots homogènes de rats, en nombre de 4 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.
- Un lot contrôle positive recevant que l'agent ulcérogène
- Trois lots traités par chacune des doses suivantes d'extrait de *Punica granatum* L. : 0.75, 1.5 et 3.0 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide l'ompérazole (0,1 g/kg) ;

Une (1) heure plus tard, tous les rats ont été anesthésiés avec le chloroforme et disséqués. Les estomacs ont été prélevés, ouverts le long de la grande courbure et délicatement lavées avec de l'eau distillée afin de ne pas enlever la couche de mucus de la surface de l'estomac, puis pour mieux observer les lésions (Hamedi *et al.*, 2015 ; Sobreira *et al.*, 2017 ; Sofi *et al.*, 2020). Les estomacs ont été prélevés pour une étude histologique macro et microscopique. Les jus gastriques ont été récupérés immédiatement afin de déterminer les paramètres gastriques (détermination de la sécrétion et du pH gastrique), le volume du jus gastrique a été mesurer immédiatement en utilisant une éprouvette.

3.3.1/ Détermination d'effet gastro-protecteur

Les échantillons d'estomacs ont été pris en photo et enregistré sur ordinateur pour être analysées par la suite. Le logiciel image J a été utilisé pour évaluer l'action inhibitrice de l'extrait sur l'ulcère. Les résultats obtenus nous ont permis de calculer l'effet protecteur

Le pourcentage de protection d'ulcère pour chaque groupe traité a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Protection (\%)} = ((\text{USc} - \text{Ust}) / \text{USc}) * 100$$

USc: Surface ulcérée du contrôle.

USt: Surface ulcérée du test (Sobreira *et al.*, 2017).

Les résultats sont exprimés en moyennes ($n=6$) \pm écarts types pour chacun des lots. La signification statistique entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

3.3.2/ Examen microscopique des coupes histologiques

Après la dissection des rats, les estomacs ont été prélevés, puis lavés par l'eau physiologique. Les estomacs ainsi obtenues ont été immédiatement plongés dans le formol (10%). L'étape de déshydratation a été réalisée dans des bains d'alcool (Ethanol) à des concentrations allant en ordre croissant : 60 %, 75%, et 100%. Enfin l'alcool a été remplacé par le xylène. Les échantillons des estomacs ont été placés dans des cassettes et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs ont été prêts à la coupe (l'étape de microtome, collage sur lame et coloration a été faite au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie-Constantine (CRBT-C)).

Résultats et discussion

1/ Evaluation de l'effet antalgique d'extrait d'écorce de *Punica granatum*

Les résultats concernant l'effet analgésique évalué par les tests de torsion, plaque chauffante et immersion de la queue, sont exposés comme suit :

1.1/ Test de torsion

L'effet analgésique périphérique d'extrait d'écorce de *Punica granatum* et d'acide acétyl salicylique a été évalué par le test de torsion. Les résultats de ces évaluations sont exprimés dans le tableau IV

Tableau IV : Réduction du nombre de crampes induites par l'acide acétique chez les lots traités en non traité (contrôle).

Groupes	Affectation	Nombre de crampes	Pourcentage d'inhibition des crampes (PIC %)
Contrôle -	Eau distillée	53.75±3.40	-
Groupe I	<i>Punica granatum</i> L. (0.75 g/kg)	25.00±2.94* Δ	53.58±3.34
Groupe II	<i>Punica granatum</i> L. (1.5 g/kg)	18.00±2.016* Δ	66.38±4.69
Groupe III	<i>Punica granatum</i> L. (3 g/kg)	11.00±1.83*	79.39±4.35
Contrôle +	Contrôle + Acide acétyl salicylique (0.1 g/kg)	7.50±1.29*	86.07± 2.02

Les valeurs sont exprimées en moyennes ±SD (Tukey HSD-test, n=6). * $p<0,0001$: par comparaison au témoin négatif. Δ $p<0,0001$: par comparaison à l'acide acétyl salicylique. PIC : pourcentage d'inhibition des crampes.

Il ressort de la lecture des résultats que :

- Une injection intra péritonéale (*i.p*) d'acide acétique (1%) provoque une moyenne de campes égale à 53.75±3.40 chez le lot témoin non traité, au bout d'une période de 20 minutes ;
- Le nombre de crampes diminue significativement ($p<0.0001$) par rapport au lot témoin, chez les lots de rats traités par l'extrait de *Punica granatum* et par l'acide acétyl salicylique;

- L'effet analgésique provoqué par l'extrait de *Punica granatum* est dose-dépendant ;
- L'effet analgésique provoqué par l'acide acétyl salicylique à une dose de 0.1 g/kg, est significativement supérieur ($p<0.0001$) à celui d'extrait de *Punica granatum* administré à 0.75 et 1.5 g/kg ;
- Aucune différence significative dans la réduction des contractions n'est observée entre le lot traité avec l'extrait de *Punica granatum* à une dose de 3.0 g/kg comparé à celui traité par l'acide acétyl salicylique (0.1 g/kg)

1.2/ Tests d'immersion de la queue et de la plaque chauffante

L'effet analgésique central d'extrait d'écorce de *Punica granatum* et d'acide acétyl salicylique a été évalué par les tests d'immersion de la queue et de la plaque chauffante. Les résultats de ces évaluations sont exprimés dans les tableaux V, VI les figures 7 et 8, respectivement

Tableau V : Temps de réaction à une excitation thermique (immersion de la queue) pour les lots traités et non traités (contrôle)

		Temps de réaction (secondes) ^Δ		
Groupes	Affectation	1 heure	2 heures	3 heures
Contrôle -	Eau distillée	1,98±0.17	1,83±0.21	1,95±0.31
Groupe I	<i>Punica granatum</i> L. (0.75 g/kg)	3,93±0.25 ^{*** Δ}	3,00±0.29 ^{* Δ Δ}	2,58±0.51
Groupe II	<i>Punica granatum</i> L. (1.5 g/kg)	4,68±0.46 ^{***}	3,38±0.39 ^{** Δ}	2,70±0.48
Groupe III	<i>Punica granatum</i> L. (3 g/kg)	6,68±0.68 ^{*** Δ Δ}	4,63±0.51 ^{***}	3,05±0.13
Contrôle +	Acide acétyl salicylique (0.1 g/kg)	5,13±0.44 ^{***}	4,41±0.60 ^{***}	3,42±1.10 [*]

^Δ Les valeurs sont exprimées en moyennes ±SD (Tukey HSD-test, n=6). ^{***} $p<0,0001$, ^{**} $p<0,01$, ^{*} $p<0,05$: par comparaison au témoin négatif. ^Δ $p<0,01$, ^{ΔΔ} $p<0,05$: par comparaison à l'acide acétyl salicylique.

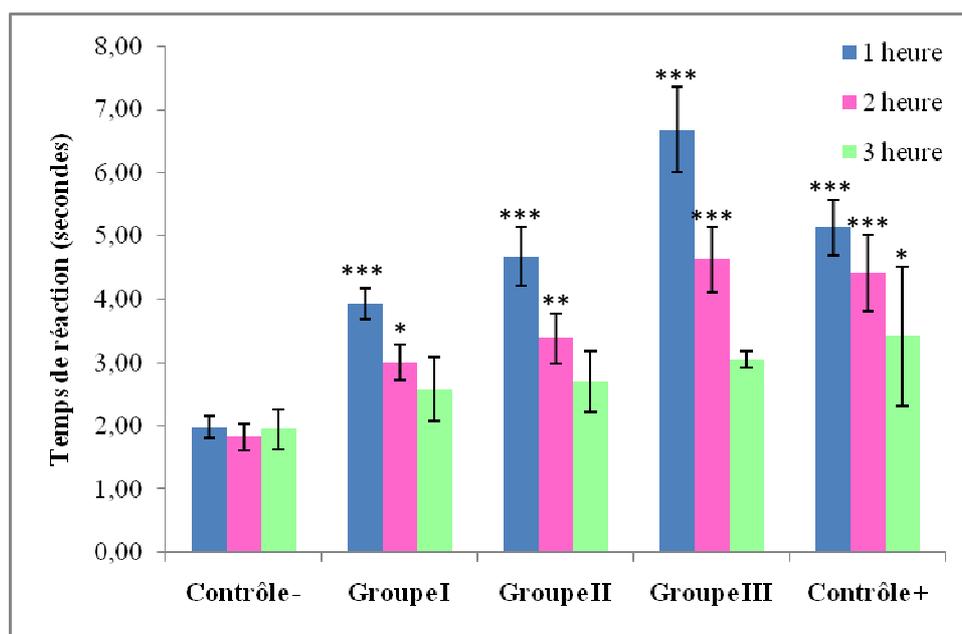


Figure 7 : Temps de réaction à une excitation thermique (immersion de la queue) pour les lots traités et non traités (contrôle). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD (Tukey HSD-test, $n=6$).

*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$: par comparaison au témoin négatif.

Il ressort de la lecture des résultats que :

-Le temps de réaction dans le contrôle est de $1,98 \pm 0,17$ secondes ;

-L'extrait de *Punica granatum* (0.75, 1.5 et 3.0 g/kg) ainsi que l'acide acétyl salicylique (0.1 g/kg) ont allongé d'une façon significative ($p < 0,0001$) le temps de réponse au stimulus thermique après 1 heure de gavage;

-Le temps de réaction au stimulus thermique reste significativement plus important que le contrôle, et ceci après 2 heures de gavage d'extrait de *Punica granatum* (0.75 g/kg) ($p < 0,05$), (1.5 g/kg) ($p < 0,01$) et (3.0 g/kg) ($p < 0,0001$) ;

-Après 3 heures de gavage, l'extrait de *Punica granatum* ainsi que l'acide salicylique n'ont montré aucun effet analgésique par rapport au contrôle.

Tableau VI : Temps de réaction à une excitation thermique (plaque chauffante) pour les lots traités et non traités (contrôle)

Groupes	Affectation	Temps de réaction (secondes) ^x		
		1 heure	2 heures	3 heures
Contrôle -	Eau distillée	0.80±0.08	0.88±0.10	0.73±0.10
Groupe I	<i>Punica granatum</i> L. (0.75 g/kg)	1.40±0.32	0.95±0.21 ^{ΔΔΔ}	0.75±0.13 ^{ΔΔΔ}
Groupe II	<i>Punica granatum</i> L. (1.5 g/kg)	6.85±0.59 ^{*** ΔΔΔ}	1.55±0.50 ^{ΔΔ}	0.88±0.16 ^{ΔΔΔ}
Groupe III	<i>Punica granatum</i> L. (3 g/kg)	8.48±1.39 ^{*** ΔΔΔ}	4.00±0.48 ^{*** ΔΔΔ}	1.10±0.18 ^{* ΔΔΔ}
Contrôle +	Acide acétyl salicylique (0.1 g/kg)	2.97±0.44 ^{**}	2.61±0.26 ^{***}	1.88±0.21 ^{***}

^x Les valeurs sont exprimées en moyennes ±SD (Tukey HSD-test, n=6). ^{***} $p < 0,0001$, ^{**} $p < 0,01$, ^{*} $p < 0,05$: par comparaison au témoin négatif. ^{ΔΔΔ} $p < 0,0001$, ^Δ $p < 0,01$, ^{ΔΔ} $p < 0,05$: par comparaison à l'acide acétyl salicylique.

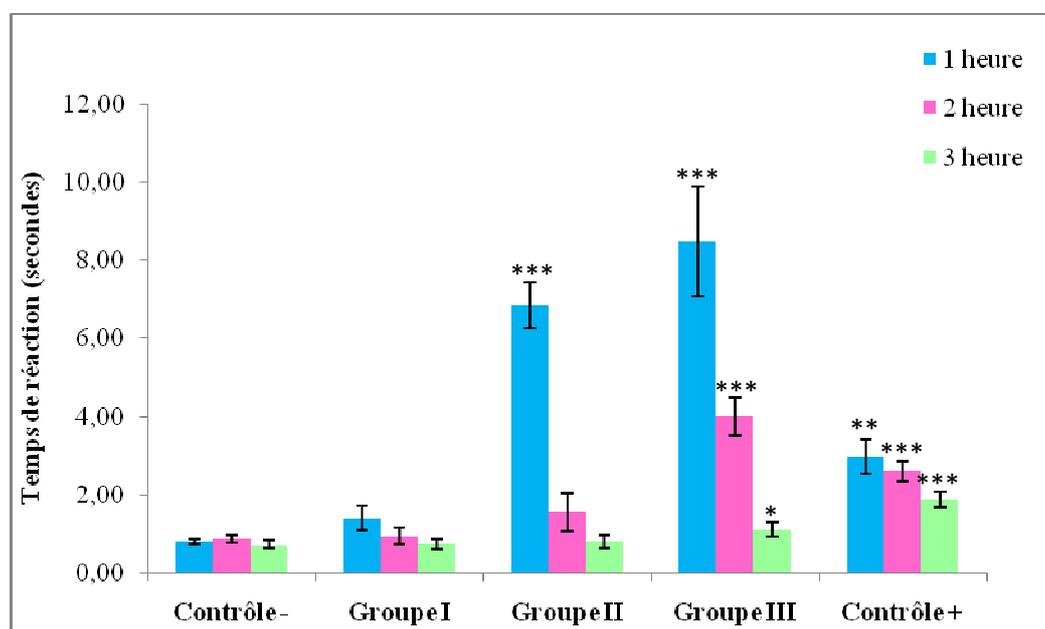


Figure 8 : Temps de réaction à une excitation thermique (plaque chauffante) pour les lots traités et non traités (contrôle). Les valeurs sont exprimées en moyennes ±SD (Tukey HSD-test, n=6).

^{***} $p < 0,0001$, ^{**} $p < 0,01$, ^{*} $p < 0,05$: par comparaison au témoin négatif.

Pour le test de la plaque chauffante on peut noter que :

-Le temps de réaction dans le lot contrôle est de 0.80 ± 0.08 secondes ;

-Le temps de réaction du lot traité par l'extrait de *Punica granatum* à une dose de 0.75 g/kg, après une heure de gavage, est comparable à celui du contrôle ;

-Les lots traités par l'extrait de *Punica granatum*, après une heure de gavage, ont montré un temps de réaction significativement ($p < 0.0001$) plus important que celui du contrôle, ceci aux doses de 1.5 et 3.0 g/kg ;

-Le temps de réaction reste hautement significatif ($p < 0.0001$) après 2 heures de gavage chez le lot traité par l'extrait de *Punica granatum* à la dose de 3.0 g/kg, mais faiblement significatif ($p < 0.05$) chez le même lot après 3 heures de gavage.

- Les données expérimentales pour les deux tests de l'activité analgésique centrale, montrent que l'extrait de *Punica granatum* exerce un effet analgésique significatif comparé au contrôle. Toute fois, cet effet est potentiellement exercé surtout après 1 heure de gavage, mais à partir de la deuxième heure cet effet devient plus faible surtout pour les faibles doses.

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que l'extrait d'écorce de *Punica granatum* a montré une activité analgésique périphérique et centrale importantes, cela est interprété par une inhibition des crampes induites par une injection d'acide acétique et une augmentation du temps de réaction à un stimulus thermique, respectivement. Le mécanisme d'action peut être assuré par des substances naturelles bioactives ayant un effet analgésique et douées d'un potentiel antioxydant (Rajan *et al.*, 2011) capable d'inhiber les médiateurs de la douleur (Zeghad *et al.*, 2020), avec cette manière elles peuvent inhiber la production de Prostaglandine par blocage des enzymes spécifiques telles que les cyclooxygénases impliquées dans la genèse de la douleur (Murshid *et al.*, 2014 ; Zeghad *et al.*, 2016 ; Zeghad *et al.*, 2020). Une étude récente réalisé par Boulacel et Dadouche (2020) a confirmé la richesse d'extrait d'écorce de *Punica granatum* en composés phénoliques bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoides et les flavonols, la même étude a confirmé également que ces substances naturelles bioactives sont douées d'effets antioxydants importants ce qui explique le bon effet analgésique d'extrait étudié.

Des travaux antérieurs ont révélé l'effet analgésique important de *Punica granatum*, dont nos résultats s'accordent avec les résultats de Bagri et son équipe (2010) qui apportent un potentiel analgésique important pour l'extrait d'écorce de grenade.

2/ Evaluation de l'effet gastroprotecteur d'extrait d'écorce de *Punica granatum*

2.1/ Examen macroscopique

L'extrait hydroalcoolique d'écorce de *Punica granatum* a fait l'objet d'une évaluation de son degré de protection contre les ulcères causées par le mélange acide/alcool chez des rats *Wistar*. L'effet de l'extrait est comparé par rapport à un médicament commercial (Améprazole®). Les résultats obtenus de l'évaluation de l'effet gastro protecteur après traitement préventif par l'extrait et le médicament commercial sont exprimés dans le tableau VII et la figure 9

Tableau VII : Réduction des ulcères induits par l'éthanol/HCl chez les rats traités

Groupes	Affectation	Surface ulcérée (mm²)	Effet gastroprotecteur (%)
Contrôle +	Ethanol+HCl (80/20, v/v)	522.75±268.95	-
Groupe I	<i>Punica granatum</i> L. (0.75 g/kg)	176.75± 28.88*	62.29±10.37
Groupe II	<i>Punica granatum</i> L. (1.50 g/kg)	96.25± 25.86* ^Δ	79.73±6.77
Groupe III	<i>Punica granatum</i> L. (3.00 g/kg)	32.75± 10.05* ^{ΔΔ}	93.32±1.10
Groupe IV	Améprazole (0.10 g/kg)	186.75± 77.26*	63.05±9.20

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD (Tukey HSD-test, n=6). * p<0,0001: par comparaison au contrôle positif. ^Δ p<0,05, ^{Δ Δ} p<0,0001: par comparaison au groupe traité avec l'Ampérazole.

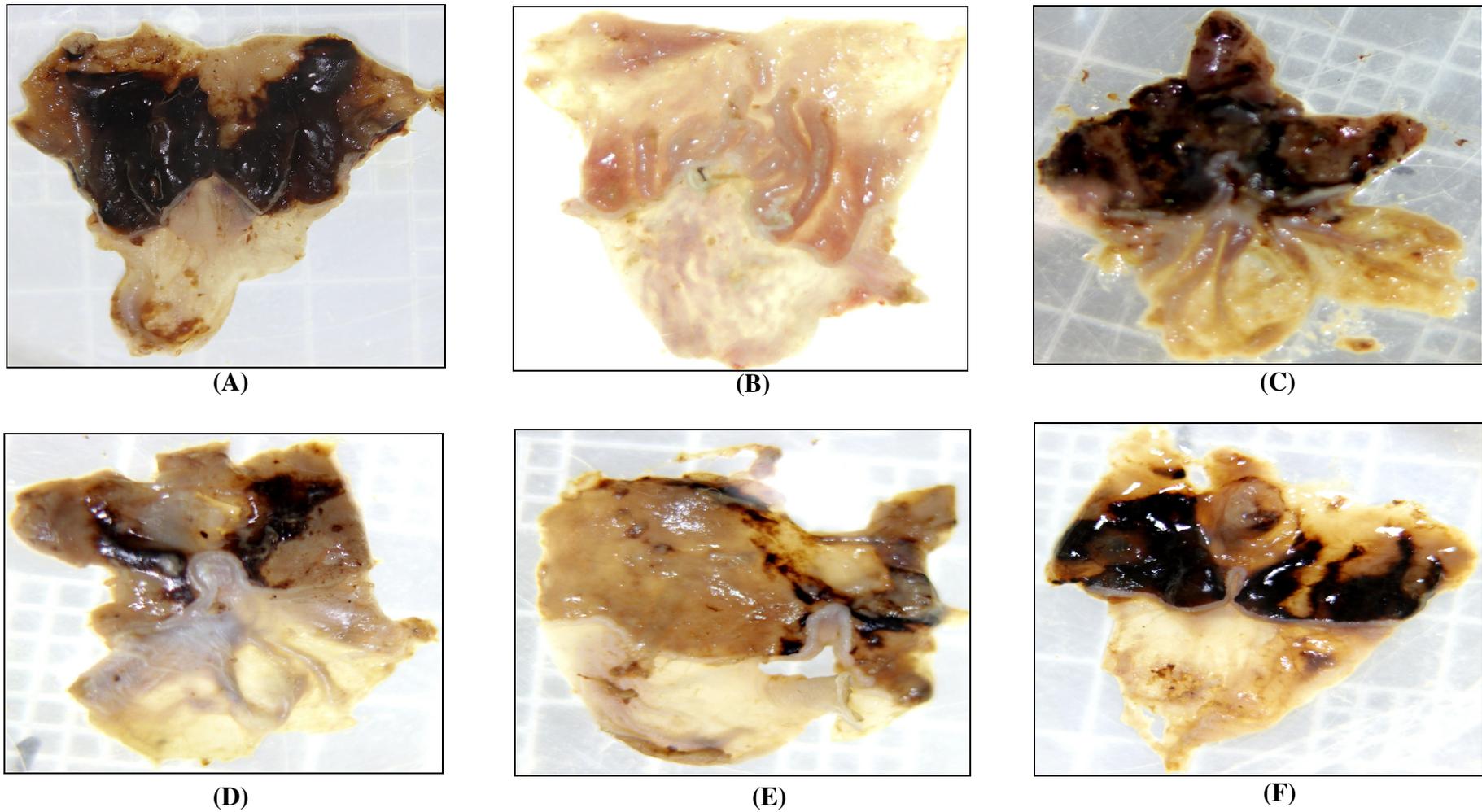


Figure 9 : Analyse macroscopique des ulcères induites par le mélange éthanol/HCl. Les images des estomacs ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique. Les estomacs provenant des rats traités de différentes manières. (A) : rats recevant que l'agent ulcérogène. (B) : rats recevant l'eau distillée, (C) : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (0.75 g/kg), (D) : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (1.5 g/kg), (E) : : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (3.0 g/kg), (F) : : rats recevant le médicament commercial (Améprazol) (0.1 g/kg).

Il ressort de la lecture du tableau VII et de la figure 9 que :

- Le groupe contrôle ayant reçu que l'agent ulcérogène (HCl/Ethanol, 20/80 , v/v) montre une surface ulcérée significative ($p < 0.0001$) par rapport aux rats normaux (contrôle négatif) ;
- Les lots traités par l'extrait de *Punica granatum* (0.75, 1.5 et 3.0 g/kg) et par le médicament commercial (Améprazole®) ont montré une baisse significative ($p < 0.0001$) de la surface ulcérée par rapport au lot contrôle positif ;
- L'effet protecteur d'extrait de *Punica granatum* est dose-dépendant ;
- Aucune différence significative dans l'effet protecteur n'est observé entre le lot traité par l'extrait de *Punica granatum* (0.75 g/kg) et celui traité par l'Améprazole® (0.1 g/kg) ;
- Cette différence est toutefois significativement visible à la dose de 1.5 g/kg ($p < 0.05$) et 3.0 g/kg ($p < 0.0001$) par rapport à l'Améprazole® (0.1 g/kg).

Les écorces de grenade cultivée en Algérie n'ont jamais fait l'objet d'une évaluation de leur potentiel gastroprotecteur. A la lecture des résultats de l'effet gastroprotecteur, il peut être observé que l'extrait d'écorce de *Punica granatum* présente un effet protecteur significativement supérieur ($p < 0.0001$) par rapport au contrôle +. Il ressort également, à la lumière des résultats obtenus que l'extrait hydroalcoolique de grenade a montré une activité protectrice supérieure à celle du médicament commercial (Améprazole®), ceci est interprété par une diminution de la surface ulcérée. Cela indique que l'extrait testé possède un meilleur profil pharmacologique que l'Améprazole® ce qui nous laisse suggérer que l'extrait agit en inhibant le degré d'ulcération. Cette activité anti-ulcère, serait due à la richesse des écorces en substances naturelles bioactives (Moghaddam *et al.*, 2013 ; Moghaddam *et al.*, 2014 ; Soliman Mohamed et Bakr Mabrok, 2022). En effet, l'analyse phytochimique réalisée récemment par Boulacel et Dadouche (2020) sur le même extrait a montré une composition riche en polyphénols ($590,07 \pm 13.58$ mg GAE/g), flavonoides (227.85 ± 46.48 mg QE/g) et flavonols (91.57 ± 5.79 mg QE/g) doués d'un puissant potentiel de piégeage des radicaux libres. Moghaddam et son équipe (2013), (2014) ainsi que Soliman Mohamed et Bakr Mabrok (2022) ont montré la capacité de ces substances naturelles bioactives à prévenir les lésions de la muqueuse gastrique produite par l'agent ulcérogène (Acide/Alcool), et augmenter la production de glycoprotéines neutres dans la muqueuse (dont l'éthanol conduit à une

hémorragie, un œdème, une accumulation massive de calcium, la production des radicaux libres) et inhibition de la synthèse des Prostaglandines.

2.2/ Examen microscopique (histologique) des estomacs

L'extrait hydroalcoolique d'écorce de *Punica granatum* a fait l'objet d'une évaluation de son effet gastroprotecteur. Les résultats des analyses histologiques de la muqueuse gastrique sont présentés dans la figure 10.

Il ressort de la lecture des résultats des coupes histologiques que :

- Les rats ayant reçu que l'eau distillée (contrôle -) montrent une muqueuse normale (fig. B) ;
- Les rats ayant reçu que le produit ulcérogène montrent l'existence de phénomène ulcéreux siégeant au niveau de l'épithélium représenté par des dommages importants dans la muqueuse (fig. A) ;
- L'histopathologie des estomacs des rats prétraités avec l'extrait de *Punica granatum* L. montre que l'extrait a réduit considérablement la formation des lésions gastriques d'une manière dose dépendante, cet effet est remarquable surtout pour les rats ayant reçu les extraits à des doses de 1.5 et 3.0 g/kg (fig D et F) ;
- Le médicament commercial (Améprazole) (0.1 g/kg) réduit inefficacement la formation des lésions gastriques

Les résultats histologiques montrent que les rats n'ayant reçu que le produit ulcérogène représentent une forte destruction de l'épithélium et des lésions nécrotiques pénétrant profondément dans la muqueuse. Cependant, les tissus des muqueuses prétraitées par l'extrait de *Punica granatum* ont montré l'apparence intacte de la structure histologique similaire au groupe témoin (témoin -) surtout pour les groupes prétraités avec des doses de 1.5 et 3.0 g/kg. L'effet antiulcéreux de *Punica granatum* est lié à la sécrétion croissante de mucus de la paroi gastrique. Cela peut inhiber la génération des radicaux libres dérivés de l'oxygène, et diminuer la consommation de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase, et maintenir la teneur en oxyde nitrique (NO) à un niveau normal (Lai *et al.*, 2009). L'étude de Moghaddam et ses Collaborateurs en 2013 a montré que l'extrait de l'écorce de grenade, à un potentiel curatif contre l'ulcère gastrique, induit par l'agent ulcérogène (Acide/Alcool), grâce à son activité anti-oxydante élevée.

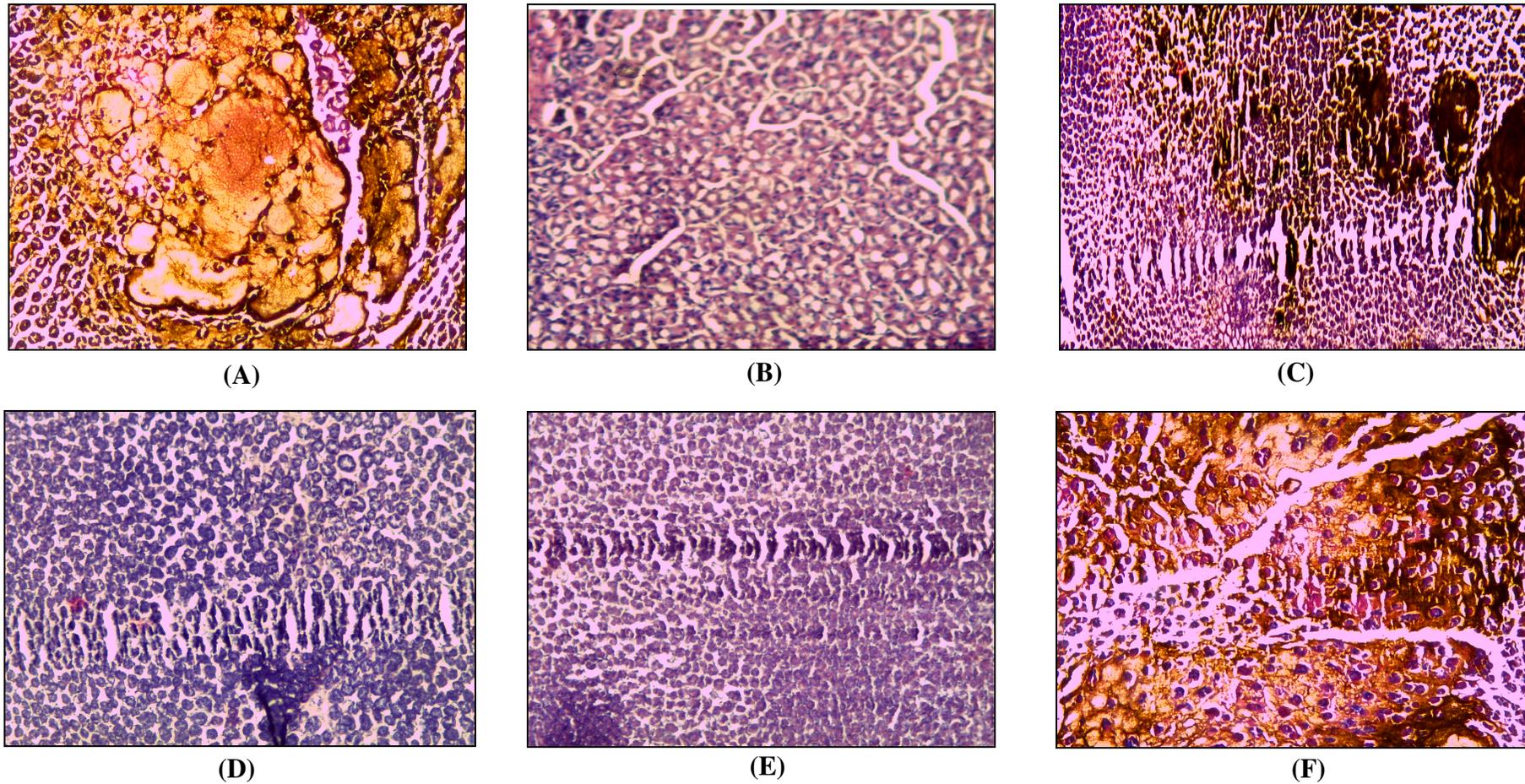


Figure 10 : Coupes histologiques des estomacs chez les groupes traités et non traités

Les images des estomacs observées sous microscope optique (x10) ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique. Les estomacs provenant des rats traités de différentes manières. (A) : rats recevant que l'agent ulcérogène. (B) : rats recevant l'eau distillée, (C) : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (0.75 g/kg), (D) : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (1.5 g/kg), (E) : rats recevant de l'agent ulcérogène+extrait (3.0 g/kg), (F) : rats recevant le médicament commercial (Améprazol) (0.1 g/kg).

Conclusion

Les plantes médicinales représentent une alternative intéressante pour traiter et soigner diverses pathologies notamment celles touchant le tractus gastrique. L'ulcère gastrique est l'une des maladies digestives les plus répandues de nos jours. La thérapie de l'ulcère gastrique a pour but de lutter contre la douleur due à une acidité gastrique trop forte ou contre les lésions de l'estomac. Dans ce contexte, le travail que nous avons entrepris a pour objectif principal d'une valorisation biopharmacologique d'extrait d'écorce de *Punica granatum* L. suite à une évaluation de ses activités analgésiques et gastroprotectrice.

Sur le volet phytochimique

Une analyse quantitative complémentaire (réalisée l'année passée) a montré que l'extrait hydroalcoolique d'écorce de *Punica granatum* L. s'est révélé relativement riche en composés phénoliques, qui pourrait constituer une source potentielle d'antioxydants.

Sur le volet biopharmacologique

Certaines activités biologiques ont été étudiées à savoir ; une évaluation *in vivo* des effets analgésiques et gastroprotecteurs d'extrait hydroalcoolique de *Punica granatum* L. Toutefois, ce dernier, a montré un potentiel important à réduire la douleur et qui s'est manifesté dans les trois tests ; test de torsion pour l'activité analgésique périphérique et les tests de la plaque chauffante et l'immersion de la queue pour l'activité analgésique centrale. Ce qui suggère que l'extrait possède des phyto-constituants qui suppriment la douleur au niveau périphérique et central. Ceci peut être lié aux antioxydants qui inhibent les médiateurs de la douleur.

D'autre part, les résultats de l'évaluation de l'effet gastro-protecteur chez des rats *Wistar* ont montré que l'extrait hydroalcoolique de *Punica granatum* aux différentes doses étudiées (effet dose dépend), protège le mucus gastrique de l'estomac contre les lésions gastriques. Le pouvoir gastroprotecteur de cet extrait s'est révélé même supérieur à celui du médicament commercial Améprazole. Ce résultat est confronté par la lecture des résultats des coupes histologiques des estomacs.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer la richesse d'extrait d'écorce de *Punica granatum* L. en antioxydant, ce qui confirme son exploitation comme source potentiel d'antioxydants et explique ses effets analgésiques et gastroprotecteurs importants sur des modèles animaux.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques, toxicologiques et biologique d'écorce de *Punica granatum* L. afin de s'assurer de son innocuité, et de mettre en évidence ses principes actifs. Il est également souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres gastriques (histamines, pepsine, gastrine et prostaglandine). Des études à l'échelle moléculaire sont aussi nécessaires pour déterminer d'une part les composés actifs d'extrait d'écorce de *Punica granatum* L. et d'autre part le mécanisme moléculaire par lequel ces composés accomplissent leur rôle.

Références

bibliographiques

1. **Almeida C. & Baltazar F. (2014).** Activité antitumorale et antiangiogénique de Propolis portugaise in vitro et in vivo models. *Journal des aliments fonctionnels*. 11 (9) : 160-171.
2. **Ambigaipalan P., Costa de camargo A. & Shahidi F. (2017)** Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MS n . *Food chem.* 221:1883-1894.
3. **AL-Saeed M.H. & Hadi N.S. (2015).** Etude de l'effet des iso flavonoïdes extraits de l'écorce de *Punica granatum* sur la fertilité et les caractéristiques du sperme chez les males des lapins. Mémoire de Master. Université de Basrah. Iraq.
4. **Bachoual R., Talmoudi W., Boussetta T., Braut F. & El-Benna J. (2011).** An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food & Chem Toxicol.* 49(6) : 1224-1228.
5. **Bagri P., Ali M., Aeri V., Sultana S. & Bhowmik M .2010.** Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Punica granatum* linn. *Int J Drug Dev Res.* 2: 698–702 33
6. **Bakhtaoui H. (2019).** Effet des extraits phénoliques des écorces de grenade (*Punica granatum* L.) sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt. Mémoire de Mastère. Université de Mostaganem.
7. **Belhadj H. (2011).** Les peritonites par perforation d'ulcère Etude prospective sur 1 an. Thèse de doctorat. Cadi Ayyad Marrakech.
8. **Benkhnnich A. & Hamaida R. (2014).** Evaluation des activités antioxydantes, antiinflammatoires et analgésiques de l'extrait aqueux et chloroforme de *Galium mollugo*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira. Bejaia.
9. **Bessedé E. (2012).** Etude des mécanismes de la carcinogénèse gastrique induite par *Helicobacter pylori* impliquant la transition épithélio-mésenchymateuse. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux.
10. **Bianco A., Chiacchio M., Grassi G., Innazzo D., Piperno A. & Romeo R. (2006).** Phenolic components of *Olea europea*. Isolation of new tyrosol and hydroxytyrososo derivative. *Food Chemistry.* 95(4) : 562-565
11. **Boulacel F. & Dadouche A. (2020).** Valorisation phytochimique et biologique des déchets des fruits de *Punica granatum* L. et *Opuntia ficus indica* L. Université des frères Mentouri. Constantine 1.

12. **Bounihi A. (2016).** Criblage phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de doctorat. Université Mohammed V. Rabat.
13. **Chaibi M. (2009).** La maladie ulcéreuse gastroduodenale -*Helicobacter pylori* épidémiologie-endoscopie digestive haute-eradication-antisécrétoire gastrique-anti-inflammatoires non stéroïdiens. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad. Marrakech.
14. **Chen H., Liao H., Liu Y., Zheng Y., Wu X. & Su Z. (2015).** Protective effects of pogostone from *Pogostemonis Herba* against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*. 100: 110-117.
15. **Chidambara Murthy K.N., Jayaprakasha G.K. & Singh R.P. (2002).** Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L) Peel Extract Using *in vivo* Models. *J Agric and food chem*. 50(1): 81-86.
16. **Den Hoogen N.J., De Kort R., Allegaert K. M., Joosten B. A., Simons S. H., Tibboel D. & van den Bosch G. E. (2019).** Developmental neurobiology as a guide for pharmacological management of pain in neonates. *In Seminars in Fetal and Neonatal Médecine*. 8(2): 1325- 1339.
17. **Elsevier M. (2014).** Les Fondamentaux de la Pathologie Digestif. Editions Elsevier-Masson. France.
18. **Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H. & Azadbakht L. (2006).** Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Inter J Vitamin & Nutr Res*. 76(3): 147-151.
19. **Fawole O. A. & Opara U. L. (2013).** Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit : A descriptive review. *Scientia horticulturae*. 159: 152-161.
20. **Ghimi W. (2015).** Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
21. **Gil M. I., Tomás-Barberán F. A., Hess-Pierce B., Holcroft D. M. & 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.

22. **Glazer I., Masaphy S., Marciano P., Bar-Ilan I., Holland D., Kerem Z. & Amir R. (2012).** Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *J Agric & food chem.* 60(19): 4841-4848.
23. **Hamedi S., Arian A. A. & Farzaei M. H. (2015).** Gastroprotective effect of aqueous stem bark extract of *Ziziphus jujuba* L. against HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J Trad Chin Med.* 35(6): 666-670.
24. **Havsteen H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96(2-3):167-202.
25. **Heath P.J.W., Wheater P.R., Stevens A. & Young B. (2008).** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. De Boeck. Bruxelles.
26. **Heber D., Schulman R. N. & Seeram N. P. (2006).** Pomegranates : Ancient roots to modern medicine. *CRC press.* France.
27. **Hernandez F., Melgarejo P., Tomas-Barberan F. A. & Artes F. (1999).** Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur Food Res & Techn.* 210 (1) : 39-42 .
28. **Hornung E., Pernstich C. & Feussner I. (2002).** Formation of conjugated double bonds by linoleic acid (1, 4) acyl lipid desaturase in pomegranate seeds. *Eur J Biochem.* 269(19) : 4852-4859.
29. **Jacinto A.M.T. (2018).** Examen des produits phytochimiques, pharmacologiques et toxicologiques Propriétés de *Punica granatum* L., (Lythraceae) Plante. *J Sci Alim & Agr.* 2(3) : 71-83.
30. **Jafri M. A., Aslam M., Javed K. & Singh S. (2000).** Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethno pharm.* 70(3): 309-314.
31. **Jeon W.Y., Lee M.Y., Shin I. S., Jin S. E. & Ha H. (2015).** *Curcuma aromatica* Water Extract Attenuates Ethanol-Induced Gastritis via Enhancement of Antioxidant Status. *Evid Based Compl & Alter Med.* ID582496: 1-7.
32. **John-Africa L. B. & yahaya T. A. (2014).** "Anti-ulcer and wound healing activities of *Sida corymbosa* in rats." *Afr J Trad Compl & Alter Med.* 11(1): 87-92.
33. **Jurenka J. (2008).** Applications thérapeutiques de la grenade (*Punica granatum* L.). *Med Alter.* 13(2) : 128-44.

34. **Kaci M. Z., Elothmani D. & Boutekrabt L.B. (2015).** Morphological and physico-chemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in northern Algeria. *Fruits*. 71(1) : 17-26.
35. **Kada S. (2018).** Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif.
36. **Kanoun K., Abbouni B., Bénine M.L., Benmahdi F.Z. & Marouf B. (2014).** Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica granatum* Linn. sur deux souches phytopathogènes *Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr. et *Fusarium oxysporum*. *Eur Sci J*. 10 (12): 301-315.
37. **Kawaii S. & Lansky E. P. (2004).** Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Med food*. 7(1): 13–18.
38. **Keïta A. (2005).** Etude de trois plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère gastroduodéal dans le district de Bamako : *Borassus æthiopicum* Mart (palmeae), *Sclerocarya birrea* (A. Rich). Hochst. (Anacardiaceae) et *Ximenia americana* L. (Olacaceae)." Palmeae), *Sclerocarya abirrea*. Thèse de doctorat. Université de Bamako.
39. **Keith L. M. D. & Arthur F.(2006).** Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques, De Boeck Supérieur. France.
40. **Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A. & Jiang W. (2002).** Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res & treatment*. 71(3): 203–217.
41. **Lacour B. & Belon J. (2015).** Physiologie. Edition Elsevier Masson. France.
42. **Lairini R., Bouslamti F., Zerrouq. & Farah.A. (2014).** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Master. Environ. Sci.* 5(S1): 2314-2318.
43. **Lansky E. P. & Newman R. A. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethno Pharm.* 109(2): 177-206.
44. **Lansky E.P., Harrison G., Fromm P. & Jiang W. G. (2005).** Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3

- prostate cancer cell invasion across Matrigel TM. *Investigational new drugs*. 23(2) : 121–122.
45. **Laroche F. (2014)**. Douleur chronique Thérapies comportementales et cognitives. *Annales Medico-Psychologiques. Phytothérapie*. (172): 132-135.
46. **Le Tourneur P. (2014)**. Prescription des inhibiteurs de la pompe à protons par les médecins généralistes normands. Thèse de doctorat. Université de Rouene.
47. **Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N. & Mukhtar H. (2005)**. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(41): 14813–14818.
48. **Marieb E. & Hoehn K. (2010)**. Anatomie et physiologie humaines. 8ème édition . Pearson édition. Québec.
49. **Martins J.L.R., Rodrigues O.R.L., Silva D.M., Galdino P.M., De Paula J.R., Romão W., Costa H.B., Vaz B.G., Ghedini P.C. & Costa E.A. (2014)**. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq). Sargent on gastric lesions in mice. *J Ethnopharmac*. 155 : 1616– 1624.
50. **Miloud R. (2019)**. Contribution à la valorisation d'une plante médicinale de grenadier (*Punica granatume* L.) de la région de Biskra. Mémoire de Master. Université de Biskra.
51. **Moghaddam G., Sharifzadeh M., Hassanzadeh G., Khanavi M. Dolatshahi F., Sadeghi N., Reza Oveisi M. & Hajimahmoodi M. (2014)**. Anti-Ulcerative potential of *Punica granatum* L. (Lythraceae) hydroalcohol fruit peel extract. *Trop J Pharm Res*. 13(7): 1093-1097.
52. **Moghaddam G., Sharifzadeh M., Hassanzadeh G., Khanavi M. & Hajimahmoodi M. (2013)**. Anti-Ulcerogenic Activity of the Pomegranate Peel (*Punica granatum*) Methanol Extract. *Food & Nutr Sci*. 4: 43-48.
53. **Monassier L. (2005)**. Les anti-inflammatoires stéroïdiens. *Pharmacologie Clinique DCEM3*. 2(1): 11-34
54. **Neurath A. R., Strick N., Li Y. Y. & Debnath A. K. (2004)**. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC infectious diseases*. 4(1) : 1-12.
55. **Neyrink A.M., Van Hée V.F., De Backer F., Cani P. & Delzenne N. (2012)**. Effets anti-inflammatoires et hypolipémians des polyphénols de grenade chez la souris

- obèse : implication potentielle du microbiote intestinal. *Diabetes & Metabolism*. 38 : 270-275.
56. **Nyilimana C. (2007)**. Contribution à l'étude de l'activité anti-ulcèreuse de *Leptadenia hastata* (Pers). Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
57. **Oscier C. & Milner Q. (2009)**. Peri-operative use of paracetamol. *Anaesthesia*. 64 (1): 65-72.
58. **Oueldelhachemi S. (2012)**. Ulcère gastro-duodénal : prise en charge thérapeutique et accompagnement à l'officine. Thèse de doctorat. Université Mohamed V. Rabat.
59. **Özkan M. (2002)**. Dégradation des anthocyanines dans les jus de cerise aigre et de grenade par le peroxyde d'hydrogène en présence d'acide ascorbique. *Food Chem*. 78(4): 499-504.
60. **Parmar H. S. & Kar A. (2008)**. Valeurs médicinales des écorces de fruits de *Citrus sinensis*, *Punica granatum*, et *Musa paradisiacal* en ce qui concerne les altérations de l'oxydation lipidique tissulaire et la concentration sérique de glucose, d'insuline, et d'hormones thyroïdiennes. *J Med Food*. 11(2): 376-381.
61. **Perrot S., Poulain P., Serrie A., Eschalière A., Mick G., Langley P., Pomerantz D. & Ganry H. (2013)**. Description des prescriptions de traitements pharmacologiques à visée antalgique et de leur observance en France résultats de l'étude épidémiologique. *National Health and Wellness Survey réalisée*. 14 (3): 119-130.
62. **Petigars C. (2015)**. *Helicobacter pylori*: implications pathologiques et actualisations thérapeutiques face aux résistances aux antibiotiques. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
63. **Prashanth D., Asha M. K. & Amit A. (2001)**. Activité antibactérienne de *Punica granatum*. *Fitoterapia*. 72(2) : 171-173.
64. **Rajan S., Mahalakshmi S., Deepa V.M., Sathya S. & Thirunalasundari T. (2011)**. Activités antioxydantes des extraits de l'écorce de fruit de *Punica granatum*. *Inter J Pharm and pharmac Sci*. 3(03) :82-88.
65. **Rostami-Motamed H., Taati M., Dezfoulian O., Alirezaei M., & Moghaddasi M. (2015)**. Les effets de l'exercice modéré sur les lésions gastriques induites par l'éthanol chez le rat. *Zahedan J Res Med Sci*. 17 (10): 7-15.
66. **Rozza A.L., Hiruma-Lima C.A., Takahira R.K., Padovani C.R. & Pellizzon C.H. (2013)**. Effet du menthol dans les ulcères expérimentalement induits : voies de gastroprotection. *Chem Biol Inter*. 206 (2): 272-278.

67. **Seeram N.P., Schulman R.N. & Heber D. (2006).** Pomegranates: ancient roots to modern medicine. *CRC press*. France.
68. **Silbernagl S. & Lang F. (2012).** Atlas de poche de physiopathologie. Lavoisier Médecine édition. Paris.
69. **Singh B., Singh J. P., Kaur A. & Singh N. (2018).** Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food chem.* 261: 75- 86.
70. **Smaouia S., Ben Hlimab H., Chakchouk Mtibaaa A., Fouratia M., Sellema I., Elhadefa Kh., Ennouria K. & Melloulia L. (2019).** Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. *Meat Science.* 158: 1-20.
71. **Smith H. (2009).** Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain physician.* 12(1): 269-280.
72. **Sobreira F., Hernandez L. S., Vetore-Neto A., Díaz I. E. C., Santana F. C. D., Mancini-Filho J. & Bacchi E. M. (2017).** Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and ethyl acetate fraction from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Braz J Pharm Sci.* 53(1).
73. **Sofi S. H., Nuraddin S. M., Amin Z. A., Al-Bustany H. A. & Nadir M. Q. (2020).** Gastroprotective activity of *Hypericum perforatum* extract in ethanol-induced gastric mucosal injury in Wistar rats: A possible involvement of H⁺/K⁺ ATPase α inhibition. *Heliyon*, 6(10), e05249.
74. **Soliman Mohamed M. & Bakr Mabrok H. (2022).** Protective effect of pomegranate powder against gastric ulcer in rats. *Bioinetrface Res in App Chem.* 12(4):4888-4899.
75. **Spichiger R.E. & Savolainen V. (2004).** Botanique systematique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiosperme des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires. Romandes.
76. **Spiller G. A. & Spiller M. (2007).** Tout savoir sur les fibres. Les Éditions le mieux-être. France.
77. **Stevens A. & Lowe J. (2006).** Histologie humaine. Elsevier édition. Paris.
78. **Syed D.N., Afaq F. & Mukhtar H. (2007).** Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology.* 17(5): 377–385.
79. **Tortora & Derrickson. (2010).** Manuel d'anatomie et de physiologie humaine. De boek édition. Bruxelles.

80. **Wald E. (2009).** Le grenadier (*Punica granatum*): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré.
81. **Wékipidia. 2022 :** https://fr.wikipedia.org/wiki/Grenadier_commun.
82. **Zeghad N., Madi A., Helmi S. & Belkhiri A. (2016).** *In vivo* analgesic activity and safety assessment of (*Vitis vinifera* L) and (*Punica granatum* L) fruits extracts. *Trop J Pharm Res.* 15(9) : 1915-1921.
83. **Zeghad N. (2018).** Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica*. Thèse de doctorat. Université des frères Mentouri-Constantine 1.
84. **Zeghad N., Ahmed E., Belkhiri A., Vander Heyden Y. & Demeyer K. (2019).** Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon.* 5(4): e01575.
85. **Zeghad N., Ahmed E., Madi A., Halmi S. & Belkhiri, A. (2020).** Acute Toxicity and Analgesic Activity of the Aerial Parts of *Ajuga iva* (L.) *Schreb.* Grow in East of Algeria. *FABAD J Pharm Sci.* 45(1): 1-7.

Résumé

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles, le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une étude bio-pharmacologique d'extrait d'écorce de grenade (*Punica granatum* L.). L'extrait a été évalué pour ses activités analgésiques et hépato-protectrices *in vivo* chez des rats *Wistar*. L'extrait de *Punica granatum* L. a montré un effet analgésique potentiel sur les trois tests (torsion, plaque chauffante, immersion de la queue) dont le potentiel à réduire la douleur s'est révélé statistiquement important par comparaison au contrôle. D'autre part, les résultats macroscopique et microscopique de l'évaluation de l'activité gastro-protectrice au niveau d'estomac ont montré que l'administration d'extrait de *Punica granatum* L. par gavage aux différentes doses (0.75, 1.5 et 3.0 g/kg) a réduit de manière significative ($p < 0.0001$) la formation des lésions au niveau du mucus gastrique par rapport au témoin. Ces résultats suggèrent que l'extrait d'écorce de *Punica granatum* L. possède un effet analgésique et gastroprotecteur, qui serait dû à sa capacité à prévenir la formation de lésions, et d'induire les mécanismes de protection de mucus gastrique qui serait dû à son potentiel d'effet gastro-protecteur, anti-ulcéreux et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Punica granatum* L., extrait, effet analgésique, effet gastro-protecteur.

Abstract

For natural resources development, this work present a part of a bio-pharmacological study of pomegranate peel extract (*Punica granatum L.*). The extract was evaluated for its *in vivo* analgesic and gastro-protective activities in *Wistar* rats. The extract of *Punica granatum L.* showed a potential analgesic effect ($p<0.0001$) on the three tests (torsion, heating plate, tail immersion), by reducing pain in comparison to control. On the other hand, the macroscopic and microscopic results of the evaluation of gastro-protective activity at stomach showed that administrated (*per os*) doses of *Punica granatum L* peel extract (0.75, 1.5 and 3.0 g/kg) reduced significantly ($p<0.0001$) the formation of lesions in gastric mucus in comparison to the control. These results suggest that the bark extract of *Punica granatum L.* has an analgesic and gastroprotective effect; probably due to its ability to prevent the formation of lesions, and induce mechanisms of protection of gastric mucus which would be due to its potential of gastro-protective effect, anti ulcerative and anti-inflammatory.

Keywords: *Punica granatum L.*, extract, analgesic effect, gastro-protective effect.

في إطار تنمية الموارد الطبيعية، يمثل العمل الحالي جزءاً من دراسة دوائية بيولوجية لمستخلص لحاء الرمان *Punica granatum L.* حيث تم تقييم المستخلص للأنشطة المسكنة والوقائية في الجسم الحيواني لفئران *Wistar*.

أظهر المستخلص تأثيراً مسكناً جيداً للألم على الاختبارات الثلاثة (الالتواء، صفيحة التسخين، وغمر الذيل) مقارنة بالشاهد ($p < 0.0001$). من ناحية أخرى، أظهرت النتائج العينية والمجهرية لتقييم النشاط الوقائي للجهاز الهضمي أن إعطاء مستخلص الرمان عن طريق الهضم بجرعات مختلفة (0.75 و 1.5 و 3.0 غرام/كغ) يشكل حماية بشكل كبير لمخاط المعدة مقارنة بالشاهد ($p < 0.0001$).

تشير هذه النتائج أن مستخلص لحاء الرمان له تأثير مسكن وواق للمعدة، والذي يُعتقد أنه يرجع إلى قدرته على منع تكوين انسلاخات فالمعدة، واستحداث آليات لحماية مخاطها بسبب قدرته على التأثير الواقي للمعدة، حيث يرجح أنه مضاد للتقرح ومضاد للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L.*، مستخلص، تأثير مسكن للألم، تأثير واق للمعدة.

Année universitaire : 2021-2022	Présenté par LOUAAR Naouel
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biologie et physiologie de la reproduction	
Intitulé : Evaluation de l'effet analgésique et gastro protecteur d'écorces de <i>Punica granatum</i> L. chez des rats <i>Wistar</i>	
<p>Résumé</p> <p>Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles, le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une étude bio-pharmacologique d'extrait d'écorce de grenade (<i>Punica granatum</i> L.). L'extrait a été évalué pour ses activités analgésiques et hépato-protectrices <i>in vivo</i> chez des rats <i>Wistar</i>. L'extrait de <i>Punica granatum</i> L. a montré un effet analgésique potentiel sur les trois tests (torsion, plaque chauffante, immersion de la queue) dont le potentiel à réduire la douleur s'est révélé statistiquement important par comparaison au contrôle. D'autre part, les résultats macroscopique et microscopique de l'évaluation de l'activité gastro-protectrice au niveau d'estomac ont montré que l'administration d'extrait de <i>Punica granatum</i> L. par gavage aux différentes doses (0.75, 1.5 et 3.0 g/kg) a réduit de manière significative ($p < 0.0001$) la formation des lésions au niveau du mucus gastrique par rapport au témoin. Ces résultats suggèrent que l'extrait d'écorce de <i>Punica granatum</i> L. possède un effet analgésique et gastroprotecteur, qui serait dû à sa capacité à prévenir la formation de lésions, et d'induire les mécanismes de protection de mucus gastrique qui serait dû à son potentiel d'effet gastro-protecteur, anti ulcéreux et anti-inflammatoire.</p>	
Mots clés : <i>Punica granatum</i> L., extrait, effet analgésique, effet gastro-protecteur.	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).	
Encadreur :	ZEGHAD Nadia (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 1 :	MAAMERI Zineb (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur 2 :	MADI Aicha (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).