



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté Des Sciences de La Nature et de la Vie

كلية علوم و الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biodiversité et Production Végétale

Spécialité : Biologie et Physiologie Végétale

Option : Métabolisme Secondaire et Molécules Bioactives

Intitulé :

Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti- inflammatoire de plantes Punica granatum L et Lawsonia inermis

Présente et soutenu par : MOUALKIA HALIMA

le : 24/06/2015

GOURMATI MERYEM

Devant le jury :

- Présidente : Dr. CHOUGUI SAIDA Maitre de conférence // A
- Promoteur : Mr. CHIBANI SALIH // M.A.A Université des frères Mentouri Constantine
- Examinatrice : Mr. KBAILI ZOUBIR // M.A.A Université des frères Mentouri Constantine

Année universitaire

2014/2015

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents*

*Surtout ma mère et ma tante Abba et tata warda qu'il trouve ici toute ma gratitude pour*

*Leur soutient out au long de mes étude*

*A mes sœurs Selma et Rahma et Bassembla Roumeissa*

*A mes frères Abdul Rahman, et Aymen*

*A toute ma famille.*

*A mes très chères amies marieme, samiha, ibtissame, muona, Aicha, Maroua, nadia, rahma, hajdare asama, Jweida.*

*A tous mes collègues et mon professeur*

*A tous ceux que j'aime.*



*Halima*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents*

*Surtout ma mère et ma tante Louiza et tonton Youssef qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour Leur soutient out au long de mes étude.*

*A mes sœurs Halima Petra et Dalell et son fils Haytam.*

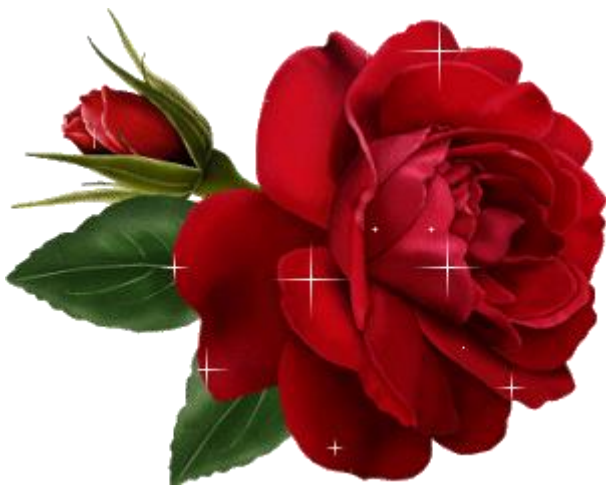
*A mes frères Samir et Mounir.*

*A ma grand-mère et toute ma famille.*

*A ma très chère amie Halima.*

*A mon professeur et tous mes collègues.*

*A tous ceux que J'aime.*



*Meryem*

## *Remerciements*

Nos remerciements les plus vifs s'adressent à notre directeur de mémoire **Mr. CHIBANI S.** (professeur à L'Université des frères Mentouri Constantine), qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, en lui exprimons nos sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils.

En remerciements **Dr. CHOUGUI S.** (professeur à L'Université des frères Mentouri Constantine) d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail.

On vous exprime notre profonde gratitude, et expressions de reconnaissance à nos enseignants, merci de votre aide et vos conseils précieux le long de notre cycle d'étude.

Nous tenons à exprimer notre grande considération, et profond respect à **Mr. KBAILI Z.** (professeur à L'Université des frères Mentouri Constantine), d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.



*Sommiare*

# Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des graphes

Liste d'histogrammes

## Sommaire

**Introduction :**

### **Chapitre I : Etude Bibliographique**

I. Définition La famille des Lythraceae

II. *Punica granatum L* (le grenadier)

II.1. Nomenclature

II.2. Présentation

II.3. Classification botanique

II.4. Description morphologique

II.4.1. Les feuilles

II.4.2. Les Fleurs

II.4.3. Les Fruit

II.5. Origine et répartition géographique.

II.5.1. Origine

II.5.2. Aire de répartition géographique du grenadier

II.5.3. Répartition géographique

II.6. Les variétés de grenadier

II.7. La composition chimique de *Punica granatum L*

II.7.1. Le jus de grenade

II.7.2. Les feuilles.

II.7.3. Les fleurs.

II.8. Propriétés biologiques de *Punica granatum L*

II.8.1. Usages empiriques et traditionnels de la grenade

II.8.1.1. Usage médicinal du grenadier

II.8.2. Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum L*

II.8.2.1. Propriétés antioxydants de la grenade.

II.8.2.2. Protection contre les maladies cardiovasculaires

II.8.2.3. Action antimicrobienne

II.9. Utilisation du grenadier dans les produits cosmétiques et médicinaux

III. Lawsonia inermis (le Henné)

III.1. Présentation

III.2. Classification botanique (Roques, 1960 ; Joy, 2001)

III.3. Description géographique

III.4. Origine et répartition géographique

III.4.1. Origine

III.4.2. Répartition géographique

III.5. La composition chimique de *L. inermis*

III.5.1. Les feuilles

III.5.2. Les tiges

III.5.3. Les fleurs

III.6. Biosynthèse de Lawsone

III.7. Propriétés biologiques de *L. inermis*

III.8. Effets thérapeutiques de (*L. inermis*)

III.9. Usages de (*L. inermis*) en cosmétique

# Chapitre II : Principales substances naturels actives

## I. les sels minéraux

### I.1 Le rôle des sels minéraux

## II. Les métabolites primaires

### II.1 Les glucides

#### II.1.2. Le rôle des glucides

##### II.1.2.1. Rôle énergétique

##### II.1.2.2. Rôle économique

### II.2. L'amidon

#### II.2.1. Structure de l'amidon

### II.3. Les acides aminés (aminoacides)

#### II.3.1. Aminoacides essentiels

#### II.3.2. Aminoacides secondaires

### II.4. Les lipides

#### II.4.1. Le rôle des lipides

## III. Métabolites secondaires

### III.1. Propriétés biologiques

### III.2. Composés phénoliques

#### III.2.1. Généralités

#### III.2.2. Classification des composés phénoliques

##### III.2.2.1. Acides phénoliques et les coumarines

###### III.2.2.1.1. Acides phénoliques

###### III.2.2.1.2. Acides cinnamiques

###### III.2.2.1.3. Coumarines

###### III.2.2.1.4 Flavonoïdes

###### III.2.2.1.4.1 Flavonols

###### III.2.2.1.4.2 Flavanones



III.2.2.1.4.3 Anthocyanes

III.2.2.1.4.4 Les Tanins

III.2.2.1.4.4.1 Les Tanins condensés (flavan-3-ols)

III.2.2.1.4.4.2. Tanins hydrolysables

IV. Les activités biologiques

IV.1 Activité antibactérienne

IV.1.1. Quelques bactéries

IV.2. Activité anti inflammatoires

IV.2.1. La peau

IV.2.1.1. Structure de la peau

IV.2.1.1.1. L'épiderme

IV.2.1.1.2. Le derme

IV.2.1.1.2.1. Hypoderme

IV.2.2. Fonction de la peau

IV.3. La cicatrisation cutanée

IV.3.1. Déroulement de la cicatrisation normale

IV.3.1.1. Phase initiale vasculaire et inflammatoire

IV.3.1.2. Phase de réparation

IV.3.1.3. La phase de maturation

IV.4. Les antioxydants

V. Dosage des phénols totaux

V.1. La Spectrophotométrie

V.1.1. Définition

## **Chapitre III : Matériel et méthodes**

I. Le matériel végétal

I.1 Récolte de la matière végétale

## I.2 Broyage de parties sec

## I.3 *La macération de la matière végétale*

## II. dépistage phytochimique

### II.1 Criblage des métabolites primaires

#### II.1.1 Les composés réducteurs

#### II.1.2 Criblage d'amidon

#### II.1.3 Criblage des acides lipides

#### II.1.3 Criblage des protéines

#### II.1.4 Criblage des acides aminés

##### II.1.4.1 Matériel

##### II.1.4.2 Consommables

##### II.1.4.3 Réactifs

##### II.1.4.4 Dépôts

##### II.1.4.5 Migration et séchage

### II.2 Criblage des métabolites secondaires

#### II.2.1 Criblage des composés phénolique

#### II.2.2 Criblage des tanins

#### II.2.3 Criblage des anthraquinones

#### II.2.4 Criblage des quinones

#### II.2.5 Criblage des Alcaloïdes

#### II.2.6 Criblage des saponosides

#### II.2.7 Criblage des coumarines

#### II.2.8 Criblage des stérols et stéroïdes et triterpènes

### II.3 Criblage des sels minéraux

## III. L'étude analytique des métabolites secondaires

### III.1 Evaporation

#### III.1.1 Dosage des polyphénols

### IV. Extraction des flavonoïdes

### V. Etude analytique par chromatographie sur colonne

### VI. La séparation par CCM

#### VI.1. Principe

#### VI.2. Protocole

### VII. Activités biologiques

#### VII.1 Activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique

### VIII. Le pouvoir antioxydant

### IX. Le pouvoir anti inflammatoire

#### IX.1. Matériel et méthodes

##### IX.1.1. Animaux

##### IX.1.1.1. Animaux et conditions d'hébergement

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

### **Conclusion**

### **Références**

### **Résumé**

Introduction

Généralité

# ***Introduction***

Depuis longtemps, les plantes ont présenté un rôle très important pour l'humanité, car Elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologique potentielles. Elles constituent de merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique. **(Jean., 2006).**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mise au profit dans l'alimentation, comestibilité et pharmacie ; parmi ces composés on trouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. C'est pour cela que l'industrie pharmaceutique se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude seule terrain pour un répertoire des plantes les plus prometteuses parce qu'il est nécessaire aujourd'hui de valider l'usage traditionnel de ces plantes et d'évaluer scientifiquement leurs activités pharmacologiques retenus. **(Bohrom., 1997).**

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier henné e grenade très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen et Désert.

## **1) La première partie :**

Etudes bibliographique qui résume les principales caractéristiques des deux espèces sélectionnées appartenant à la famille de : Lythracées., et des substances végétales actives.

## **2) La deuxième parties du travail expérimentale :**

Notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en substances naturelles et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Il porte également sur le diagnostic et la séparation de principales substances naturelles par l'utilisation des réactifs et différentes techniques chromatographiques.

Visé à vis a confirmé le pouvoir anti -inflammatoire et anti cicatrisation du poudre du feuilles du *Lawsonia inermis* et l'écorce du fruit du *Punica granatum L* nous réalisons une expérience in vivo sur l'animale modèle :

**Albino wistar** été values l'effet biologique sur les plaies des rats en fonction des jours. Tél qu'une évaluation de l'activité antioxydant des flavonoïdes vis-à-vis du radicale libre DPPH.

Evaluation de la potentialité antimicrobienne des extraits hydro methanolique contre les souches d **Escherichia coli**, **Bacillus cereus** et **Staphylococcus aureus**.

**3) Dans la troisième partie**, nous discussions les résultats obtenus lors de cette étude

**4)** et notre travail est achevé par une conclusion avec des meilleurs résultats obtenus.

# Chapitre I : synthèse

## Bibliographique

## I. Définition La famille des Lythraceae :

La famille des Lythraceae est une famille de plantes dicotylédones qui compte 620 espèces .

Ce sont des arbres ou des herbes vivaces ou annuelles, dont certaines sont aquatiques. Les Lythraceae ligneuses n'existent qu'entre les tropiques ou en zone méditerranéenne comme le grenadier (*Punica granatum L.*).

## II. *Punica granatum L* (le grenadier)

### II.1. Nomenclature

Nom scientifique : *Punica granatum L*

Nom français : grenadier

Nom anglais : pomegranate

Nom espagnol : Granada

Nom italien : Melograno

Nom arabe : Romane

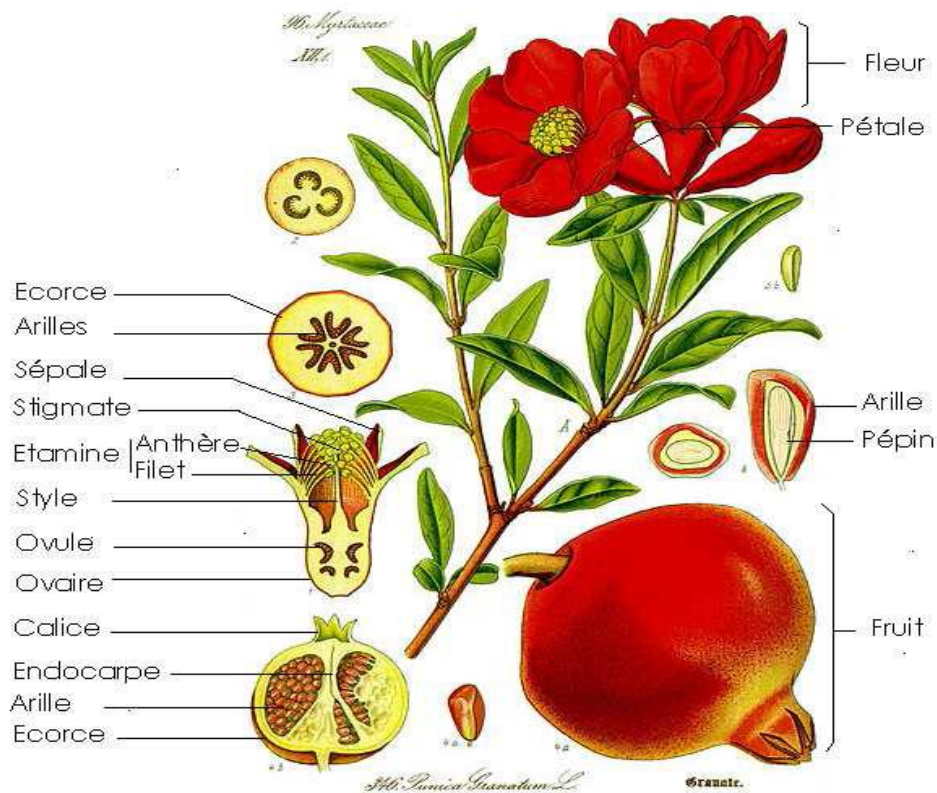


**Figure1 : photo** Arbres du grenadier



## II.2. Présentation

Le grenadier (*Punica granatum L.*), un gros buisson ou arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des Punicaceae, division Magnoliophyta, classe Magnoliopsida et à l'ordre des Myrtales. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (Sarkhosh et al, 2006). Il est depuis longtemps cultivé à but ornemental et pour ses fruits comestibles. Ses fruits contiennent de nombreuses graines, chacun enrobé dans une pulpe gélatineuse rouge cramoisi, le tout enveloppé dans une peau (écorce) coriace dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Les fruits sont consommés en frais et sont aussi utilisés pour produire un sirop dont le principal ingrédient est sa pulpe au goût acide. Depuis des milliers d'années, les propriétés astringentes de l'écorce du fruit et de l'arbre sont très prisées en médecine, particulièrement comme vermifuge. Actuellement, la grenade est cultivée dans la plupart des régions à climat chaud, car il a besoin de fortes chaleurs pendant toute la période de fructification (Melgarejo, 1993).



**Figure 2.** Fleurs et fruits du Grenadier (*Punica granatum L*) (Flora ) (Von Deutschland and Schweiz. 1885).

## II.3. Classification botanique

### A. Notions de classification.

L'Homme a, depuis très longtemps, cherché à organiser le monde vivant. Il a alors établi des classifications du règne végétal et du règne animal.

Aristote est considéré (384-322 av. JC) comme le précédent de la classification, utilisant déjà les concepts du genre et de l'espèce.

De l'Antiquité au Moyen Age, de nombreuses classifications du règne végétal, basées essentiellement sur l'utilisation de la plante, ses propriétés alimentaires, aromatiques, médicinales ou toxiques, voient le jour. Les plus connues sont rédigées par Théophraste (370-285 av. JC), Pline (23-79 ap. JC), Dioscoride (40-90 ap. JC) ou encore Albert le Grand (1193-1280).

Au XVI<sup>ème</sup> siècle, les premières classifications « scientifiques » apparaissent. Elles utilisent, comme critères de classification, l'habitat des végétaux ainsi que certains caractères végétatifs et morphologiques des plantes.

Au XVIII<sup>ème</sup> siècle, Carl von Linné (1707-1778), considéré comme le père de la taxonomie, invente une classification basée sur les différences des organes sexuels : 24 classes réparties selon le nombre de styles et selon le nombre, l'assemblage et la longueur des étamines. Cette classification, qualifiée d'artificielle, car basée sur un nombre restreint et arbitraire de critères, fut néanmoins utilisée comme référence pendant plusieurs centaines d'années et elle est d'ailleurs aujourd'hui encore très largement employée.

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

- o Embranchement : Spermaphytes
- o Sous-embranchement : Angiospermes
- o Classe : Magnoliopsida
- o Ordre : Myrtales
- o Famille : Punicaceae
- o Genre : *Punica*
- o Espèce : *Punica granatum* L

En 1998, une nouvelle classification des angiospermes, c'est-à-dire des plantes à graines, est créée par un groupe de botanistes, l'Angiospermes Phylogeny Group ou APG. Cette classification phylogénétique réorganise le règne végétal en fonction de critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et d'un

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

gène nucléaire de ribosome. Ainsi, 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 :

- o Embranchement : Angiospermes
- o Sous-embranchement : Dicotylédones vraies
- o Classe : Rosidées
- o Ordre : Myrtales
- o Famille : Lythraceae
- o Genre : *Punica*
- o Espèce : *Punica granatum L*

Dans la systématique. Ces résultats reconsidèrent la phylogénie des plantes. Cette nouvelle organisation se compose alors de 462 familles réparties dans 40 ordres. Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est :

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

### II.4. Description morphologique

#### II.4.1. Les feuilles

Du grenadier sont opposées ou sous-opposées, luisantes, étroites, et de forme oblongues, entières, de 3 à 7 cm de long et de 2 cm de large.

Ses fleurs sont rouge vif, de 3 cm de diamètre et ayant cinq pétales (souvent davantage sur les plantes cultivées). Elles sont hermaphrodites, portant de 4 à 8 sépales coriaces et un même nombre de pétales rouges, de nombreuses étamines et un nombre variable de sépales, qui constitue l'ovaire inférieur.

Son fruit est une baie, dont la taille varie entre celle d'une orange ou d'un pamplemousse, de 7 à 12 cm de diamètre, de forme hexagonale arrondie ;

son écorce est épaisse, rougeâtre et contient de nombreuses graines. Les

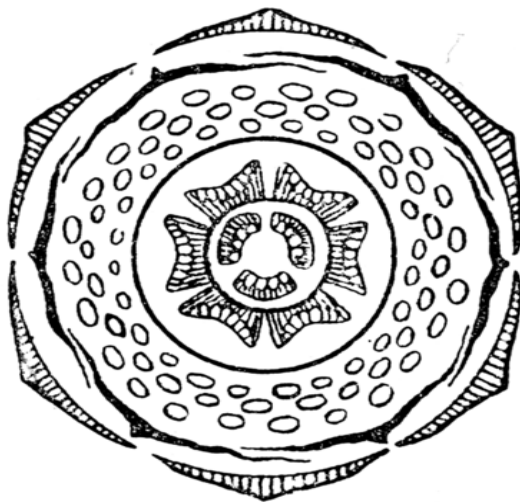
fruits du grenadier ont un taux de respiration faible et un rythme respiratoire non climatérique (Ben-Arie et al, 1984).

### II.4.2. Les Fleurs

La période normale de la floraison de différents cultivars de grenadier se produit généralement entre mars- avril et juin- aout. Elle dure jusqu'à 10 –12 semaines et voire plus selon les variétés et les conditions géographiques (Ben- Arie et al, 1984).

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

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



**Figure 3 :** Diagramme d'une fleur de *Punica granatum L.* . (Planchon et collin .,1875)

### II.4.3. Les Fruit

Le grenadier, bien conduit entre en production à partir de la quatrième année. Il est déconseillé de cueillir par temps humide, car les fruits risquent également de se fendre. Selon les variétés, la période de maturité des grenades a lieu entre la fin du mois d'aout et de décembre (Melgarejo, 1993).



**Figure 4.** Fruits du grenadier

### **II.5.Origine et répartition géographique**

#### **II.5.1.Origine :**

.Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan, où il croît de façon spontanée depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ et au jardin botanique de Thoutmosis III créé en 1450 avant JC. (Amouretti, 1992 ; Comet, 1992).

Les nomades arabes, dans leurs transhumances, en ont facilité la dissémination. En effet, en raison de la résistance de son écorce, qui en fait un fruit de longue conservation et peu susceptible d'être altéré durant le transport, la grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. D'autant plus que sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'étancher la soif durant les longues traversées du désert.

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

C'est donc dans l'ancienne Perse que débuta la culture du grenadier et c'est également de la Perse que le grenadier fut importé en Occident, sur les pourtours du bassin méditerranéen de l'Europe et de l'Afrique du nord. En effet, la plante fut introduite

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

à Rome à la fin des guerres puniques, rapportée par les Romains après leur victoire sur les Carthagois. (Boullard,2001).

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

Les Maures, berbères d'Afrique du nord, l'introduisirent dans la péninsule ibérique, au VIIIème siècle après JC, lors de la conquête de ce territoire. Forts appréciés dans le sud de l'Espagne, les grenadiers connaissent alors une culture intensive.

L'ancienne cité primitive d'Elvira, située dans le sud de l'Espagne, conquise par les Maures, fut, au XIème siècle, renommée « Garnat Al Yahud », c'est-à-dire Grenade.

Les conquistadors espagnols l'introduisirent en Amérique et aux Antilles au XVème siècle lors de la découverte du continent américain. (Lemoine,1998).

Dans les Antilles, au nord du Venezuela, se trouve d'ailleurs un archipel d'une superficie d'environ 340 km<sup>2</sup>, composé d'une île principale dénommée Grenade, et de quelques îles appelées « îles des grenadines ».

### **II.5.2. Aire de répartition géographique du grenadier :**

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, on le trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde.

Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc.

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

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

### II.5.3. Répartition géographique

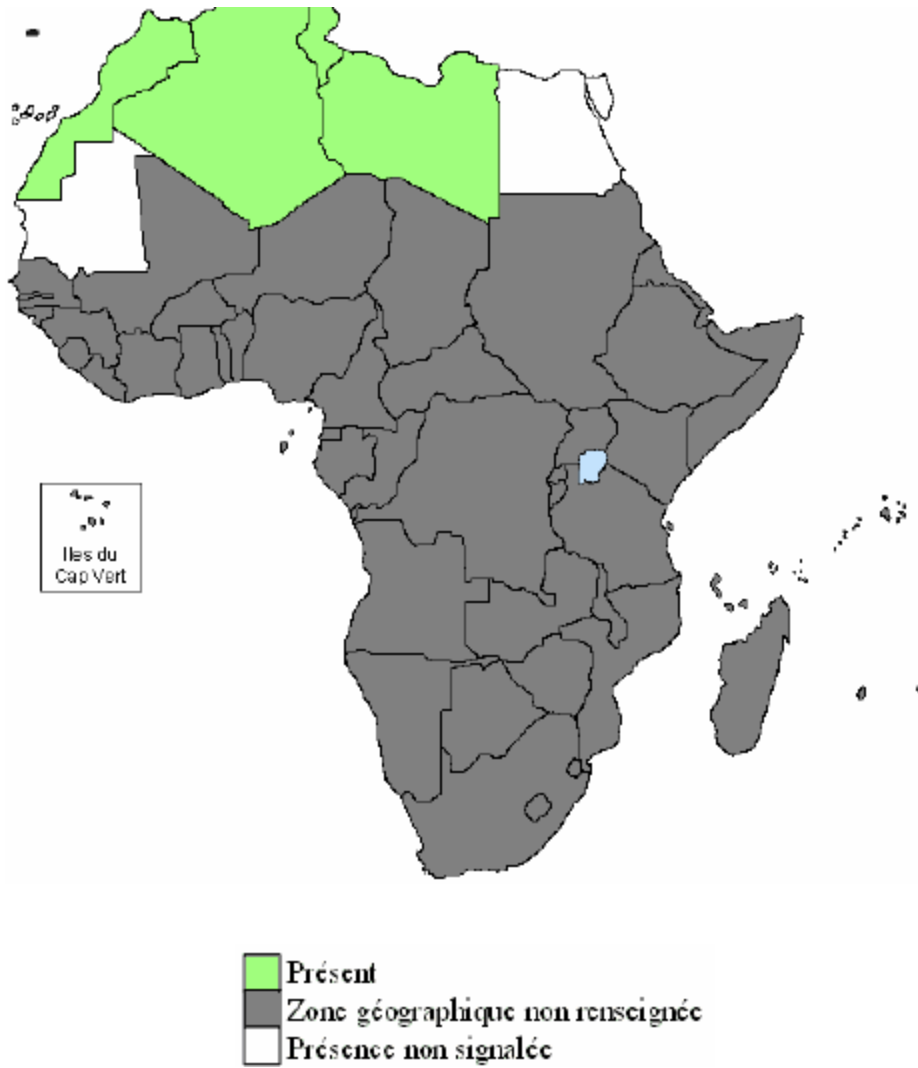


Figure 5 : Répartition géographique de la grenade en Afrique.

### II.6. Les variétés de grenadier

#### A. Les variétés à fruit

**Tableau 1** : Variétés de grenadiers à fruits. (Afaq f., malik a., et al ,2005)

Zone géographique	Variétés	Maturité des fruits	Taille des fruits	Caractéristiques des fruits	Grains	Qualités gustatives
Espagne	<i>Blanca</i>	sept./oct.	moyen	peau lisse	roses	pulpe juteuse et sucrée
	<i>Dulce Colorada</i>	oct.	gros	peau lisse, fine et teintée de rouge	gros, rouges	très bonne
	<i>Cagin</i>	oct.	gros	colorés	petits, rouges et très acides	excellente pour la grenadine
	<i>Pignonenca</i>	-	gros	colorés	grains rouges	bonne conservation
Maroc	<i>Meknes</i>	-	-	-	sans grains	-
Tunisie	<i>Zéri</i>	août/sept.	assez gros	peau ferme, rouge	très petits, rouges	bonne, très juteuse
	<i>Gabsi</i>	sept.	gros	peau jaunâtre, claire	-	bonne
	<i>Chelfi</i>	sept./oct.	assez gros	teintés de rouge	-	très rustique
	<i>Toumsi ou Tumsi</i>	-	assez gros	colorés, teintés de rouge	rouge foncé, pulpe très colorée	-
	<i>Maïki</i>	oct.	assez gros	peau ferme, jaune	gros	rustique, médiocre
	<i>Djelbi</i>	nov./déc.	très gros	rouge foncé	-	acide, variété plutôt d'apparat
Malte	<i>Guiseppe</i>	oct.	gros à très gros	peau colorée, rouge à brun	gros	juteuse, sucrée, excellente
Grèce	<i>Douce de Patras</i>	août/sept.	très gros	peau colorée	petits, rouges, très acides	excellente
	<i>Acide de Patras</i>	oct.	très gros	peau colorée fine mais dure	très rouges, acides	très bonne pour la grenadine
	<i>Denagra ou Tanagra</i>	oct.	gros	colorés, peau épaisse	rouges	très bonne



## Chapitre I : synthèse Bibliographique

	<i>Chio</i>	oct.	gros	peau colorée	petits et rouges	très savoureuse
<b>France</b>	<i>De Jaffa</i>	-	-	peau colorée, rouge	-	-
	<i>De Provence</i>	oct.	gros	-	Gros et durs	bonne
	<i>A fruit aigre</i>	oct.	-	-	acides	médiocre
<b>Afghanistan</b>	<i>Grosse Blanche de Kandagar</i>	fin août	très gros	blancs à jaune clair	gros et pâles	très bonne
	<i>Grosse Rouge de Kandagar</i>	fin sept.	très gros	rouge écarlate	rouges	excellente
	<i>Grosse Noire de Kandagar</i>	nov.	très gros	rouge foncé violacé	gros et rouges	très bonne
	<i>Kaboul</i>	-	-	-	-	-
	<i>Paklia</i>	-	-	-	-	-
<b>Turquie</b>	<i>Ak Anar</i>	sept.	moyen	peau épaisse, jaune blanc	assez gros et pâles	très rustique
	<i>Tchercherdeksis</i>	oct.	assez gros	jaune foncé teinté de rouge	petits et très tendres	très bonne
	<i>Kyzyl-Anar</i>	oct.	assez gros	peau épaisse rouge foncé	petits et très rouges	-
	<i>Kara-Anar</i>	déc.	gros	peau ferme, rouge foncé à violet	gros et rouge grenat	rustique, médiocre
<b>Irak</b>	<i>Akmar Selimi</i>	-	-	rouge	-	-
	<i>Aswad Selimi</i>	-	-	peau très foncée	-	-
	<i>Halwa Selimi</i>	-	-	-	-	excellente
<b>Arabie</b>	<i>Mellassi</i>	sept.	très gros	-	gros, pâles et tendres	-
	<i>Selimi</i>	oct.	très gros, lourds	peau fine, ferme et rouge écarlate	très petits et tendres	excellente
	<i>Roman Chouall</i>	nov.	assez gros	peau ferme, fine, violet foncé	gros et très rouges	très bonne
	<i>Nejidi</i>	nov.	gros	peau ferme et fine, très colorée	rouges	-

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

	<i>Cherabani</i>	nov.	assez gros	-	petits	très acide, pour vin de grenade
	<i>Senna Djemel</i>	déc.	gros	peau épaisse colorée	rouges	bonne
U.S.A.	<i>Wonderfull</i>	août/sept.	très gros, aplatis	rouge rosâtre	rouges	très bonne, rustique
	<i>Paper Shell</i>	sept./oct.	gros	marbrés de pourpre	petits	parfumée, très sucrée
	<i>Spanish-Ruby</i>	oct.	gros	rouges	rouges	rustique

- **En Algérie :**

‘Tendral’ : la plus cultivée en Oranie, originaire d’Elche ; nomb. syn. dont ‘Molla’, ‘Blanca’, ‘Sin Huesco’.

### II.7.La composition chimique de *Punica granatum* L

#### II.7.1.Le jus de grenade

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose desucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d’acidesorganiques tels que l’acide citrique, l’acide malique, l’acide oxalique etl’acide tartrique. Le tableau 2 montre les valeurs minimales et maximalesobtenues pour les acides organiques et les sucres selon une étude elaboree par **Melgarejo et al. (2000)**. **Lansky et al. (2007)** ont montré que parmi lesacides aminés trouves dans la grenade, il y a la valine, proline et méthionine.

D’autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamineshydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec uneconcentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de proportion comestible selonle codex alimentaires en 2009.

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

**Tableau 2.** Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit)(Elodie wald ; 2009)

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

### II.7.2. Les feuilles.

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine. Cette dernière posséderait des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine.

### II.7.3. Les fleurs.

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes comme l'acide ursolique, acide oléanolique, acide asiatique, acide maslinique. (Lemoine ;1998).

### II.8. Propriétés biologiques de *Punica granatum L*

#### II.8.1. Usages empiriques et traditionnels de la grenade

##### II.8.1.1. Usage médicinal du grenadier

\*Le grenadier est utilisé depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle.

La grande diversité des propriétés qui lui sont attribuées laisse à penser que cet arbre est une véritable panacée

\*Les Egyptiens, au VIII<sup>ème</sup> siècle avant JC, connaissaient les effets vermifuges de l'écorce de grenade. Les médecines traditionnelles égyptiennes la considéraient comme anthelminthique et mettaient à profit l'effet astringent du tanin contenu dans l'écorce, la fleur et le fruit du grenadier.

\*Hippocrate, célèbre médecin grec, né vers 460 avant JC, considéré comme le père de la médecine, attribue au grenadier de nombreuses propriétés. Il recommande le jus de la grenade contre la fièvre et comme « fortifiant contre la maladie ».

\*Aussi, dans la partie de son œuvre *Des maladies des femmes*, il fait régulièrement référence au grenadier, par exemple, pour des maux liés à la maternité comme pour favoriser la conception, pour « la purgation lochiale après l'accouchement », pour traiter des diarrhées ou des « souffrances de l'utérus » après un accouchement ... D'autres problèmes féminins semblent nécessiter l'emploi du grenadier, comme le traitement de la leucorrhée ou l'emploi de boissons à base de jus de grenade pour « favoriser l'écoulement rouge ».

\*Selon les maux à traiter, Hippocrate conseillera, associés à d'autres produits, le jus de grenade, l'écorce, la racine ou les feuilles du grenadier, parfois en boisson, en injection ou en lavement dans les parties génitales, ou encore en application locale.

Dans le même ouvrage, il conseille le jus de grenade pour arrêter les vomissements et pour « l'œil douloureux qui pleure ». Aussi, il recommande l'usage de l'écorce sèche de grenade comme lavement pour la dysenterie. (**Aviram m., dornfeld l ; 2001**).

\*Un peu plus tard, Dioscoride, médecin grec né vers 40 après JC, écrit, dans son célèbre *De materia medica*, que les fleurs de grenadier « passent pour protéger les yeux ». En effet, selon cet auteur, l'ingestion de trois fleurs de grenadier, même de petite taille, permet d'éviter toutes souffrances oculaires durant l'année. (**Ducourthial g ; 2003**).

\*De l'Afrique du Nord jusqu'en Inde, le jus de grenade, couramment utilisé dans les médecines indigènes, a la réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité. La pharmacopée et la médecine traditionnelle chinoise font aussi référence au grenadier.

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

\*La peau (*malicorium*) séchée de la grenade, *Shi Liu Pi*, est reconnue pour ses propriétés astringentes pour l'intestin, pour « arrêter le sang » et pour « chasser les parasites ». Le *malicorium* est ainsi indiqué en cas de diarrhée chronique, dysenterie chronique, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée,

\*hyperménorrhée, pertes blanches, accumulation de parasites, douleurs abdominales et dermatophytie. La peau séchée de la grenade est alors utilisée en décoction, à raison de 2,8 à 5g par jour, ou en usage externe, en lavage local avec la décoction ou par application de poudre de peau de grenade séchée.

\*L'usage de la racine de grenadier, *Shi Liu Gen*, est également retenu. A raison de 7 à 14g par jour de décoction de racines, on traite le ténia, les diarrhées chroniques, les dysenteries chroniques et les pertes blanches ou hémorragiques.

Enfin, la pharmacopée chinoise référence aussi la fleur du grenadier, *Shi Liu Hua*, pour soulager les épistaxis, otites et hémorragies. Il est alors conseillé, en usage interne, de consommer de 3,5 à 7g par jour de décoction de fleurs. Ces fleurs peuvent aussi être employées en application locale. **(Guillaume g., mach-chieu ; 1987).**

\*Toujours en médecine chinoise, l'ingestion, au cours d'un même repas, de grenades, raisins ou kakis avec des crustacés, était fortement déconseillée. Cela débiliterait les fonctions digestives et provoquerait des maux d'estomac.

Dans la médecine ayurvédique, la grenade est classée parmi les aliments de saveur astringente, de nature rafraîchissante et d'action post digestive sucrée. Elle est recommandée aux personnes souffrant d'une maladie rapportée à l'action du « vent ».

\*Selon Paracelse, né en 1493, « tout ce que la nature crée, elle le forme à l'image de la vertu qu'elle entend y attacher ». C'est cette pensée qu'il développera dans sa célèbre théorie des signatures, qui veut que ce soit la ressemblance, qu'elle soit de forme, de couleur, d'odeur ou de consistance, qui déterminera l'adéquation d'un remède.

\*Les graines de la grenade faisant penser à des dents par leur aspect et leur disposition dans la pulpe du fruit, il était donc conseillé d'en croquer contre le mal de dents. Le jus de la grenade, rouge comme le sang, déjà utilisé par les herboristes du Moyen Âge, était recommandé contre les troubles de la circulation et pour arrêter les hémorragies.

\*Bien que Dioscoride et Caton aient mentionné les propriétés vermifuges de l'écorce de la racine et de la tige du grenadier, et bien que Barthélemy de Glainville, au XIII<sup>ème</sup> siècle, ait rappelé leurs propriétés, elles ne furent connues en Europe qu'après 1807, lorsque le médecin anglais Buchanan en eût appris l'emploi des Hindous.

## *Chapitre I : synthèse Bibliographique*

---

C'est le docteur Mérat qui, en 1832, attire l'attention des praticiens français sur cette écorce. **(Fournier p ; 1948)**

\*Il considérait la racine fraîche comme beaucoup plus efficace que la racine sèche. Il fut reconnu plus tard que la racine sèche est aussi efficace que la racine fraîche, et que la dessiccation n'altère en rien les principes actifs. Il semblerait qu'il soit nécessaire, dans ces conditions, de faire macérer les morceaux de racine séchée pendant vingt-quatre heures dans l'eau qui doit servir à l'ébullition.

\*C'est pour cette raison que ce médecin avait pour habitude de faire acheter un grenadier vivant, âgé de huit à dix ans au moins, un arbre plus jeune ne pouvant fournir la quantité d'écorce de racine nécessaire, et de faire séparer l'écorce de racine de l'arbre chez le malade même, le jour, ou, au plus tard, le lendemain du jour où des anneaux de ténia avaient été expulsés. Cette écorce recueillie, il l'employait immédiatement en décoction.

\*Ainsi, au XIX<sup>ème</sup> siècle, les fleurs et l'écorce du fruit du grenadier sont connues pour être toniques et astringentes. On les emploie, en usage interne, pour traiter la diarrhée et la dysenterie quand la période d'irritation est dissipée, ainsi que dans les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée.

\*On se sert également de ces fleurs et écorces, en usage externe, sous forme de gargarismes, afin de soigner le gonflement atonique des amygdales, ainsi que le relâchement de la luette et des gencives. Ces mêmes parties du grenadier, utilisées en lotion ou en injection, lutteraient contre le relâchement de la muqueuse du vagin, la chute du rectum, l'œdème des extrémités et les engorgements articulaires à la suite d'entorse ou de luxation. **(Cazin f, 1868).**

\*Toujours au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'emploi des feuilles, fraîches ou sèches, donne une tisane tonique agréable, utilisée contre « la débilité de l'estomac », le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, la chlorose, l'anémie, les courbatures dans les convalescences, la migraine, les diarrhées chroniques et les frissons fébriles. Ces mêmes feuilles peuvent, semble-t-il, être à l'origine d'une constipation.

\*L'écorce des jeunes rameaux, recueillie au début du printemps, est connue pour rendre des services analogues.

Les graines des fruits, beaucoup moins astringentes, ont été prescrites en poudre dans la leucorrhée et pour soulager les ulcères atoniques.

\*Le suc de la grenade, rafraîchissant, diurétique, adoucissant, s'emploie contre les inflammations oculaires et fournit, étendu d'eau, une boisson acidulée de saveur agréable,

recommandée dans les maladies inflammatoires et bileuses, ainsi que dans les affections des voies urinaires. (Fournier P ,1948)

### **II.1.8.2. Propriétés thérapeutiques de *Punica granatum* .L**

#### **II.1.8.2.1. Propriétés antioxydants de la grenade :**

Un rapport de l'OMS, datant de novembre 2003, sur l'alimentation, la nutrition et la prévention des maladies chroniques, recommande la consommation journalière d'au moins 400g de fruits et de légumes (à l'exclusion des féculents tels que les pommes de terre) pour prévenir les maladies chroniques, et notamment les cardiopathies, les cancers, le diabète de type II et l'obésité. (Seeram n., *et al.* 2006)

Les effets bénéfiques sur la santé qui sont attribués à la consommation de fruits et de légumes sont, au moins en partie, liés à leurs activités antioxydants. En effet, chez les végétaux comestibles, on compte plusieurs centaines de molécules antioxydants. Parmi les plus connus de ces antioxydants naturels, on trouve la vitamine C et la vitamine E, les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène et lycopène), et les polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes). Pour qu'un composé soit défini comme antioxydant, il doit satisfaire à deux conditions :

□Présent à faible concentration par rapport au substrat oxydé, il doit retarder ou empêcher l'auto-oxydation ou l'oxydation causée par des radicaux libres.

□Les radicaux libres neutralisés par ce composé doivent former une entité stable, afin d'interrompre la chaîne des réactions d'oxydation. (Seeram n., *et al.* 2006)

#### **II.1.8.2.2. Protection contre les maladies cardiovasculaires :**

L'activité protectrice des polyphénols apportée par l'alimentation contre les maladies cardio-vasculaires est due à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, la formation des macrophages et l'athérosclérose ( Aviram *et al.*, 2002).

#### **II.1.8.2.3. Action antimicrobienne :**

Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressants. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée du HIV-1 qui peuvent être isolés par adsorption sur de l'amidon de maïs. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires. Prashanth *et al.* (2001) ont étudié, *in vitro*, l'action de différents extraits d'écorce de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes :

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

\**Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilise*, *Salmonella typhi*. Les extraits d'écorce de grenade employés sont obtenus à partir de solvants différents, permettant d'isoler les divers principes actifs de ce fruit. Ainsi, en utilisant comme solvant l'eau a température ambiante. Il y aura isolement des tanins et d'autres composes phénoliques, tandis qu'avec le méthanol, des tanins et des alcaloïdes sont extraits. Toutefois, le chloroforme permet d'extraire les alcaloïdes et enfin avec l'éther de pétrole, des stérols. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testes présentent une activitéantibactérienne, quelle que soit l'espècebactériennecultivée. Neanmoins, l'extrait methanolique semble posséder une activitéantibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilise*. (Neurath et al, 2004)

### II .9.Utilisation du grenadier dans les produits cosmétiques et médicinale :



Figure 6 : Utilisation du grenadier dans les produits cosmétiques et médicinaux

### III. Lawsonia inermis (le Henné) :

#### III.1. Présentation :

Le mot henné qui désigne <devenir reine >, est une preuve que la plante a une valeur d'élégance chez les civilisations qui l'utilisent. Pendant des siècles, les feuilles de la plante de henné (fig.7) ont été connues comme étant des agents colorants, utilisés dans plusieurs civilisations.



## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

Forme de tatouage varié et éphémère, le rituel du henné se présente comme un phénomène à la fois esthétique, médicinal et spirituel (Gallo *et al.*, 2008). Depuis l'antiquité, les femmes s'y adonnent en Afrique du Nord au moyen Orient et en Inde. Elles l'adoptent comme moyen de fascination et d'embellissement, "Celui-ci représente un symbole d'amourde joie et de bonheur"(Oliveres-Ghouti, 2006).

Le henné est une plante de renommée, connue non seulement comme agent ayant des propriétés cosmétiques pour teindre les cheveux, la peau, les ongles etc... mais également comme un agent efficace ayant des propriétés médicinales intéressantes (Malekzadeh.,1968 ;Sharma, 1990 ; Gupta *et al.*, 1992).

Connu communément sous le nom vernaculaire d'EL Hanna, d'alkanna ou de réséda,le henné est en réalité la préparation obtenue à partir de la plante qui porte le nom scientifique de *Lawsonia inermis* Linn (Ernst, 2000 ; Joy *et ai*, 2001).

C'est un arbuste qui appartient à la famille des Lythracées et qui porte plusieurs - noms scientifiques *Lawsonia alba*, *Lawsonia spinosa*, *Ligusturum egypticum* (Wichtl,1999) (fig.7). La plilte doit son nom scientifique 'au botaniste Suédois Carl Linnaeus, qui lui donna le nom de son assistant, l'Écossais physicien, Isaac Lawson. Inermis, est un mot latin qui signifie non armé (unarmed : sans défense) (Kazandjjeva *et ai*, 2007).

L'agent bioactif responsable des propriétés colorantes de la plante est un dérivé naphtoquinonique nommé là **Lawson** ou 2-Hydroxy-1,4-naphtoquinone (Rostkowska *et al*, 1998) qui fit isolé et identifié pour la première fois par Tommasi (Badri *et Burkinshaw*, 1993)



**Figure7.** Photo des différentes parties de la plante *L.inermis*

### III.2. Classification botanique (Roques, 1960 ; Joy, 2001) :

*L.inermis* est la plante la plus connue de la famille des Lythracées. Cette famille est connue pour sa possession d'un potentiel colorant important.

En botanique, la plante *L. inermis* est classée comme suit :

\*Règne : Plantae

\*Embranchement : Phanerogames

\*S/embranchement : Angiospermes

\*Division : Magnoliophyta

\*Classe : Magnoliopsida

\* Ordre : Myrtales

\*Famille : Lythraceae

\*Genre : Lawsonia

\*Espèce : *L. inermis*.

\*Nom binomiale : *Lawsonia inermis*

### III.3. Description géographique :

La plante *L. inermis* est un arbuste gracieux de 2 à 6 m de hauteur qui possède une écorce blanchâtre. Les feuilles desséchées sont légèrement froissées, de 2 à 4 cm de longueur, glabres, entières, à nervures pennées. Les 4 ou 5 nervures secondaires se rejoignent à l'extrémité en arcs successifs à une faible distance du bord. Le limbe est ovale, lancéolé, terminé par une petite pointe, à bord révoilé à la face inférieure. Les jeunes branches inermes, non épineuses sur les arbres âgés portent des feuilles opposées à pétiole court.- (Wichtl, 1999).

Les feuilles sont odoriférantes de saveurs non caractéristiques, un peu astringentes étamées tandis que les fleurs sont odoriférantes de couleur blanche ou rose pâle, d'odeur sauvage disposées en grandes panicules (Paul, 2001) Les fleurs sont de type 4 et comprennent : 4 sépales, 4 pétales, 8 étamines, 4 carpelles soudés en un ovaire à 4 loges pluri ovulées. Le fruit est petit, capsulaire, globuleux, rougeâtre, renfermant plusieurs graines anguleuses dans chaque loge (Roques, 1960 ; Crété, 1965 ; Merad., 1973).



Figure 8 : Diagramme de la fleur de henné

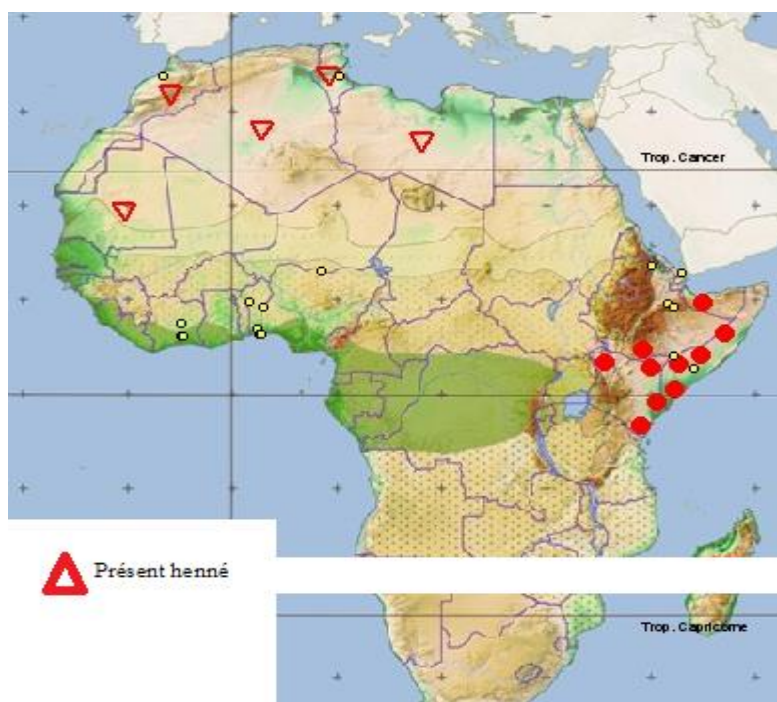
### III.4. Origine et répartition géographique :

#### III.4.1. Origine :

La zone géographique d'où est originaire le henné est la savane tropicale et les zones arides tropicales (Malekzadeh, 1968). En général, cette plante est cultivée dans les latitudes entre 15° N et 25° S de l'Afrique à la bande pacifique occidentale. Elle supporte bien le climat subtropical. Originaire d'Inde occidentale, la plante *L. inermis* s'est répandue aussi bien vers l'Ouest que vers l'Est au point qu'on la trouve maintenant cultivée dans la plupart des régions tropicales et subtropicales du monde (Wikipédia, 2008). En Asie, *L. inermis* est cultivée dans tout le Proche Orient, Iran, Perse, l'Inde occidentale et en Chine. En Afrique, elle est cultivée dans le Maghreb, le Sénégal, le Mali et le Soudan (Lekouch *et al.*, 2001).

La plante ne grandit pas lorsque les températures minimales sont inférieures à 11°C. La molécule responsable des propriétés colorantes de la plante, la Lawsonine est produite à son plus haut niveau là où la température est entre 35°C et 45°C. Ses feuilles sont récoltées au cours de la saison du printemps (Paul, 2001).

#### III.4.2. Répartition géographique :



**Figure 9** : Répartition géographique du henné en Afrique.

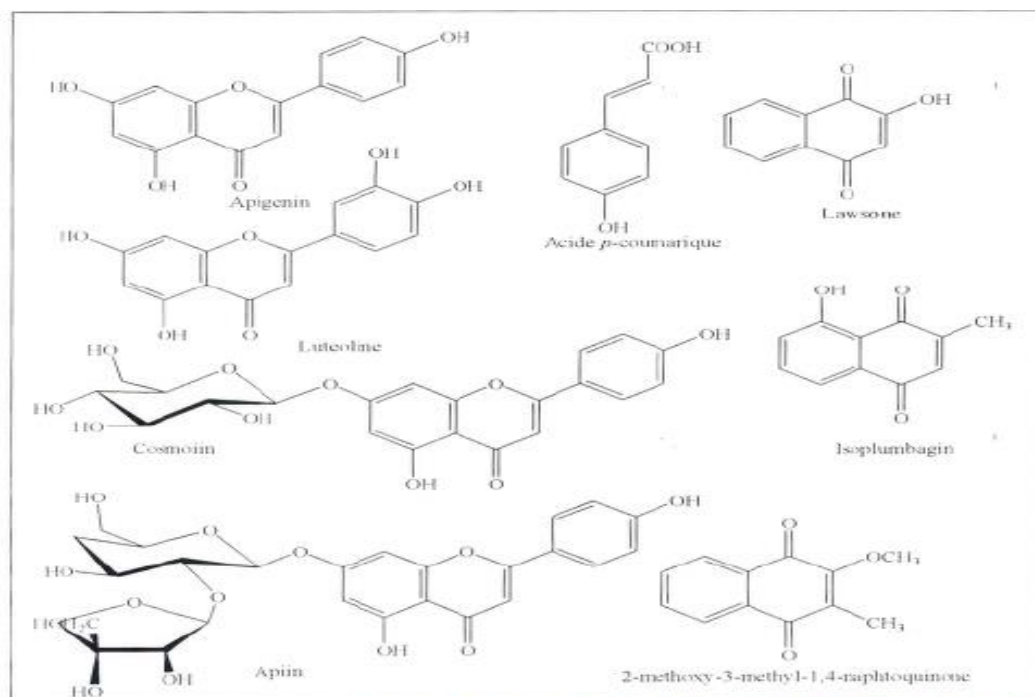
### III.5. La composition chimique de *L. inermis*:

Les composants responsables des propriétés colorantes dans la plante *L. inermis* appartiennent à la famille des quinones (**Shivananda Nayak et al., 2007**). Les principaux composants sont de type 1,4-naphtoquinone, représentés principalement par la 2-hydroxy-1-naphtoquinone appelé couramment la Lawsone (**Wichtl, 1999**).

#### III.5.1. Les feuilles

La Lawsone existe dans les feuilles de *L. inermis* à des proportions variant entre 0,4 à 1,5% de matière sèche. Cette molécule est libérée après hydrolyse des hétérosides précurseurs. (**Talaat et Hanke, 1961 ; Wichtl, 1999 ; McMillan et al., 2004**).

Les analyses phytochimiques des feuilles de *L. inermis* ont mis en évidence en plus de la Lawsone la présence d'autres constituants chimiques (fig.03): les dérivés hydroxylés du -naphtalène (1,2-dihydroxy-4-glucosyloxy-naphtalène), l'Isoplumbagin (2-méthyl-8 hydroxy-1,4-naphtoquinone), le luteoline et ses 7-O-glucoside, l'acacétin-7-O-glucoside, des petites quantités de stérols (beta-sitosteroïd-glucoside), les xanthones, le glucose, le mannitol, la résine et le mucilage (**Gupta et al., 1993 ; SCCP., 2005 ; Khare, 2007 ; Shivananda Nayak et al., 2007**).



**Figure 10.** Les différents composants isolés des feuilles de *L.inermis* (Saadaoui *et ai.*, 2004).

### III .5.2.Les tiges

Les tiges de la plante renferment différentes substances complexes. Il a été rapporté que l'écorce de la plante contient des dérivés naphthoquinoniques (fig.04) tels que: la 2-méthyl - 8-hydroxy- 1,4-naphthoquinone, En plus, deux triterpènes pentacycliques ont été isolés à partir de l'écorce et identifiés comme étant le 3,13,30- dihydroxylup 20(29)-ène (hennadiol) et le (20S) 313,30-dihydroxylupane. (Gupta, 1993).

### III .5.3. Les fleurs :

La fleur de la plante s'est avérée contenir certains métabolites secondaires tels que le 2-hexenol, linalol et la 13- ionone et ses dérivés (Wong et Teng, 1995). Naphthoquinones isolées à partir des tiges de *L. inermis* (Oyedeji *et ai.*, 2005).

### III .6. Biosynthèse de Lawsone:

La présence de la Lawsone a été mise en évidence dans plusieurs plantes telles que *Lawsonia inermis*, *Ammannia baccifera* Linn (Khare, 2007), *Juglans regia* (Grotzinger et - Campbell, 1974), *Impatiens glandulifera*, *Impatiens parviflora*, *Lomalia ferruginea* (Mehendale et Thomson, 1975) et dans *Impatiens noli-tangere* L - (Hatcher, 2003). Au niveau de la plante *L.inermis* la Lawsone s'accumule dans la partie aérienne.

Les différentes études quant à l'extraction et la mise en évidence de la Lawsonie ont permis de proposer un modèle de sa biosynthèse. Ce modèle a pu être généralisé pour la biosynthèse des systèmes à noyaux naphthoquinonique comme celui de la vitamine K (**Grotzinger et Campbell, 1972**).

### III .7. Propriétés biologiques de *L.inermis* :

D'origine très ancienne, *L.inermis* est aujourd'hui associée aux populations indiennes et maghrébines. Historiquement, nos ancêtres utilisaient ses feuilles surtout comme une teinture traditionnelle pour les cheveux, la peau et les ongles. (**Kirkland et Marzin, 2004**)

### III .8.Effets thérapeutiques de(*L.inermis*)

Historiquement, les propriétés médicinales de la plante ont été connues et appliquées pendant longtemps. Ces vertus médicinales merveilleuses sont aujourd'hui incontestables.

A travers les différentes civilisations et durant des siècles, *L. inermis* a été préconisée pour des affections aussi variées qu'astringentes, antihémorragiques, antifongiques, antibactériennes, sédatives, hypotensives, anti-amibiases et comme traitement de l'ictère et de la lèpre (**Shivananda Nayak et al, 2007**).

Selon certaines citations du prophète Mohamed (paix et prière sur lui), des préparations à base de henné étaient recommandées pour divers maux (migraine, ulcère). A partir du 14<sup>ème</sup> siècle, l'imam Ibn elkaim Eljawzia recommandait le henné sous forme de cataplasme pour cicatriser les blessures et pour calmer les douleurs.

Au cours de son usage en cosmétologie, l'application du henné permettait de protéger la peau contre plusieurs affections (**Talaat et Hanke, 1961 ; Jain, 1973**). Ceci a fait l'objet de plusieurs recherches récentes pour l'évaluation de son activité biologique. Ainsi, plusieurs chercheurs ont démontré que l'extrait éthanolique de la plante entière de *L.inermis* présentait une activité antibactérienne (**Malekzadeh, 1968**).

Certains tests biologiques ont permis d'évaluer différentes activités biologiques telles que l'activité antihelminthique (nématodes tels que l'ascaride lombricoïde), antiprotozoaire (contre la maladie de sommeil), antispasmodique et même des propriétés antituberculeuses (**Sharma, 1990**).

D'autres tests révèlent que l'extrait de la plante *L.inermis* sert par voie externe comme antiparasitaire, antiseptique, antimycotique, contre la gale et comme traitement de l'abcès (**Yogisha et al., 2002**). Par contre, l'utilisation interne de l'extrait de la plante sert contre

la dysenterie amibienne, les ulcères gastro-intestinaux et comme anti-diarrhéique(Wichtl, 1999).

Les propriétés antimicrobiennes de cette plante ont retenu notre attention particulièrement lorsqu'elles entrent dans l'axe de recherche de notre équipe qui s'intéresse à l'étude de l'activité antibiotique et antifongique des produits naturels et de synthèse. Et sous cette base, nous avons essayé de synthétiser des analogues de la Lawsone, la molécule bioactive de *L.inermis* dont on lui attribue plusieurs propriétés thérapeutiques. En plus de l'activité antimicrobienne, la décoction de l'écorce et des feuilles de la plante possède des propriétés anesthésique, analgésique, anti hémorragique, anti-inflammatoire et inhibitrices de certaines enzymes peptiques (Yogisha *et al.*, 2002). Certains auteurs attribuent l'activité anti-inflammatoire principalement au composé : la 5 hydroxy-2-méthyl-1,4 naphthoquinone (fig.04) (Gupta *et al.*, 1992), alors que d'autres auteurs l'attribuent à la Lawsone . (Khare, 2007) rapporte que l'écorce de la tige et les racines possèdent une activité anti-inflammatoire qui est due la présence de l'isoplumbagin et le lawsaritol. Les extraits de la plante et de ses composés purifiés ont fait l'objet de plusieurs tests d'évaluation de leurs activités biologiques (Handa *et al.*, 1997). Dans une étude récente, il a été révélé que l'extrait brut et éthanolique des feuilles de *L.inermis* montrent à dose dépendante un effet analgésique, antipyrétique et anti inflammatoire chez les rats. Il a été rapporté que l'extrait éthanol-eau (1: 1) de l'écorce de tige montre une activité hépatoprotective vis-à-vis d'une toxicité provoquée par le CC14 (Khare, 2007).

Dans une recherche récente faite par Syamsudin *et al.*, 2008, l'extrait éthanol-eau (70 :30) des feuilles de la plante *L.inermis* révèle une activité hypoglycémique (Gbolade, 2009) et hypolipidémique, après une administration orale chez des rats diabétiques. En plus, il a été rapporté que les feuilles de *L.inermis* exhibent une activité antioxydante comparable à celle de l'acide ascorbique.

Vis à vis de la chevelure, il a été montré que la plante *L.inermis* a une action inhibitrice des teignes tondantes et on considère qu'elle stimule la croissance des cheveux et les rend moins cassants (Forestier *et al.*, 1981).

### III.9. Usages de (*L.inermis*) en cosmétique :

Le henné a été de tout temps le cosmétique le plus employé. Son utilisation remonte à des millénaires (plus de 4000 ans) par les hébreux, les assyriens, les chinois, les perses, les musulmans . . . etc (Nohynek *et al.*, 2004).

## Chapitre I : synthèse Bibliographique

---

Les hébreux ont été les premiers à avoir utilisé le Henné comme produit de beauté. Les égyptiens, eux aussi, ont eu recours pour la momification. Les cheveux de Ramsès ont été passés au Henné 1 300 ans avant Jésus Christ pour les protéger contre les aléas du temps et garder leur sacralité religieuse. En plus, le henné fut utilisé durant cette époque pour teindre les momies et réaliser des peintures corporelles. Dans le monde égyptien, le henné obéit à un code très secret. L'Afrique et le Maghreb ont découvert le Henné et ses vertus bien après **(Nohynek et al., 2004)**.

Ensuite, des textes assyriens du VI<sup>e</sup> siècle avant J.C décrivent les préparatifs du mariage précisant que la jeune fille avait les paumes et les ongles teints au henné **(Kazandjleva et al., 2007)**.

Les propriétés colorantes du henné ont été utilisées dès les premiers temps de l'islam, il fut recommandé par le prophète Mohamed (paix et prière sur lui) qui l'utilisait pour colorer sa barbe **(Forestier et al., 1982)**, ce qui a donné à l'utilisation du henné un aspect religieux. Depuis lors, le henné servait à composer une préparation destinée à teindre les paumes des mains, les ongles, les doigts, les pieds, les cheveux et le corps particulièrement lors de festivités **(Paul, 2001)**.

Le henné a été largement introduit en Europe à partir de 1890. De nos jours il est utilisé partout dans le monde et il est même utilisé même dans l'industrie comme ingrédient dans beaucoup de colorants capillaires et de produits préconçus pour les cheveux fins et dévitalisés **(Sauriasari et al., 2007)**.

Ainsi, dernièrement apparaît l'utilisation du henné dans les tatouages provisoires qui sont devenus très populaires chez les populations occidentales **(Matulich et Sullivan, 2005)**. Popularité due surtout aux adolescents attirés par ces tatouages très 'mode' et qui considèrent les tatouages comme des agents attrayants et embellisseurs **(Oliveres-Ghouti, 2006)**.

L'utilisation des fleurs de henné pour produire un parfum de qualité peut être dans quelques secteurs bien plus communs que l'utilisation de la feuille en tant que colorant **(Kazandjjeva et al., 2007)**. Ainsi, actuellement, le henné est utilisé comme ingrédient dans certains produits de shampoings **(Ernst, 2000)**.

Le pouvoir colorant du henné n'est pas directement lié à son application, il se développe au cours de la fermentation obtenue en mélangeant la poudre (tige + feuilles) avec de l'eau tiède et mis en contact avec des matières contenant de la kératine telles la peau, la soie ou la laine. Selon que l'on veuille utiliser le henné pour les cheveux ou pour les mains,



## *Chapitre I : synthèse Bibliographique*

---

on ajoutera une faible quantité d'eau jusqu'à l'obtention d'une consistance qui soit pâteuse ou crémeuse introduite alors dans une seringue ou une douille (Nis *et al.*, 2005; Lavai, 2008). Dans une étude réalisée sur des extraits de cheveux traités au henné (feuille de *L. inermis*), il a été prouvé que la Lawsonie constitue le seul colorant du henné capable de s'attacher aux cheveux (Forestier, 2007).

chapitre II:  
principales substances  
actives

### I.1.1 Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules de l'organisme et indispensables à sa vie. Ils sont : les sucres, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques.

#### III.1.1.1 Les glucides :

Les glucides sont une classe de molécules organiques contenant un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupements hydroxyle (-OH). Les glucides étaient historiquement appelés hydrates de carbone, et sont toujours appelés carbohydrates en anglais. Leur formule chimique est basée sur le modèle  $C_n(H_2O)_p$  (d'où l'appellation historique). Cependant, ce modèle n'est pas valable pour tous les glucides, qui contiennent, pour certains, des atomes d'azote ou de phosphore (par exemple).

Ils font partie, avec les protéines et les lipides, des constituants essentiels des êtres vivants et de leur nutrition, car ils sont un des principaux intermédiaires biologiques de stockage et de consommation d'énergie. Chez les organismes autotrophes, comme les plantes, les sucres sont convertis en amidon pour le stockage. Chez les organismes hétérotrophes, comme les animaux, ils sont stockés sous forme de glycogène puis utilisés comme source d'énergie dans les réactions métaboliques, leur oxydation lors de la digestion des glucides apportant environ 17 kJ/g selon l'étude dans la bombe calorimétrique.

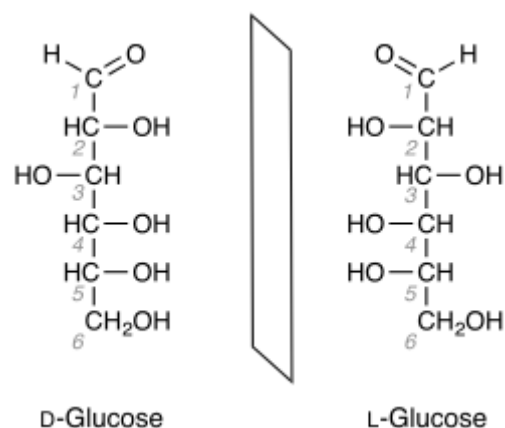


Figure 11 : Glucide (glucose) avec 6 carbone et 5 OH et 1 groupement aldéhyde

#### III.1.1.1.1 Catégorie :

Les glucides sont habituellement répartis entre oses (monosaccharides tel que le glucose, le galactose ou le fructose) et osides, qui sont des polymères d'oses

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

(oligosaccharides et polysaccharides). Les disaccharides (diholosides), tel que le saccharose ou le lactose, font partie de cette dernière catégorie.

Mais seules les monosaccharides et les disaccharides ont un pouvoir sucrant. Les polysaccharides, comme l'amidon, sont insipides.

- Les oses (sucres simples) sont des molécules simples, non hydrolysables, formant des cristaux incolores.
- Les aldoses sont les glucides possédant une fonction aldéhyde sur le premier carbone.
- Les cétooses sont les glucides possédant une fonction cétone sur le deuxième carbone.
- Les osides (sucres complexes), hydrolysables sont des polymères d'oses liés par une liaison osidique :
- Les holosides sont des polymères exclusivement d'oses ;
- Les oligoholosides (oligosides) ont un indice de polymérisation inférieur à 10 ;
- Les polyholosides (polyosides) ont un indice de polymérisation supérieur à 10

(exemple : amylose, amylopectine, cellulose, glycogène).

- Les homopolyosides sont les glucides dont l'hydrolyse donne un seul type d'oses.
- Les hétéropolyosides sont les glucides dont l'hydrolyse ne donne pas qu'un seul type d'oses.
- Les hétérosides sont des polymères d'oses et de molécule(s) non glucidique l'aglycone :
- Les O-hétérosides où une fonction alcool (-OH) de l'aglycone participe à la liaison osidique.
- Les N-hétérosides où une fonction amine (-N=) de l'aglycone participe à la liaison osidique.
- Les S-hétérosides où une fonction thiol (-SH) de l'aglycone participe à la liaison osidique.

### **III.1.1.1.2 Les oses simples :**

Les oses possèdent tous une fonction carbonyle :

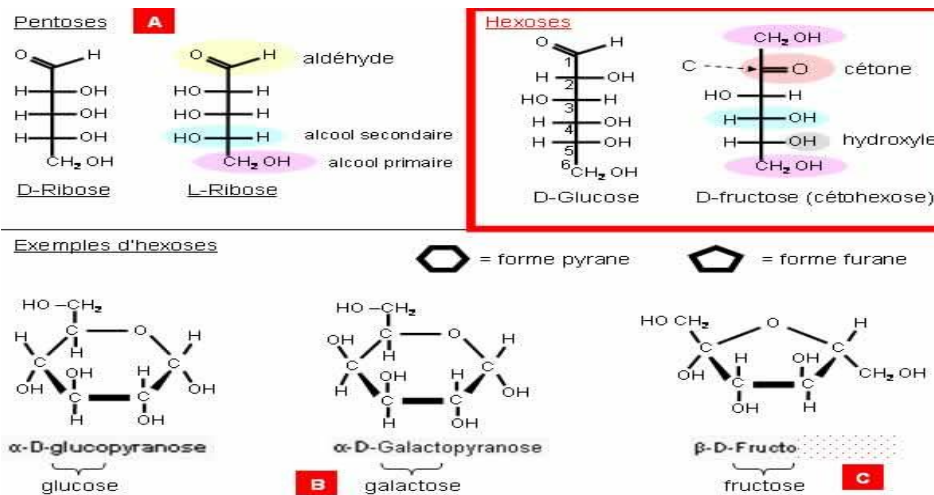
- Pseudo aldéhyde pour les aldoses (exemple : glucose).

## Chapitre II: principales substances actives

- Pseudo cétone pour les cétooses (exemple : fructose).

Ils sont caractérisés par leur nombre de carbone :

- Les trioses possèdent 3 carbones : dihydroxyacétone, glycéraldéhyde ;
- Les tetroses possèdent 4 carbones : érythrose, thréose, érythrulose;
- Les pentoses possèdent 5 carbones : ribose, arabinose, xylose, lyxose, ribulose, xylulose;
- Les hexoses possèdent 6 carbones : allose, altrose, glucose, mannose, gulose, idose, galactose, talose, psicose, fructose, sorbose, tagatose;
- Les heptoses possèdent 7 carbones ; sédoheptulose;
- Les octoses possèdent 8 carbones.



© Copyright 2011 [www.dillingco.com](http://www.dillingco.com)

Fig: BioChim biomol glucides p4

Figure 12 : Les oses simples

### III.1.1.1.2.1 Représentation linéaire (modèle de Fischer) :

Tous les oses possèdent un pouvoir rotatoire du fait de la présence d'un carbone asymétrique, les oses sont dits chiraux sauf le dihydroxyacétone. Le fructose, cétohexose, se cyclise par réaction entre les carbones 2 et 5, cette forme dérive du furane, c'est la forme furanique (figure 3). Le glucose également mais le D-glucofuranose n'est pas stable

## Chapitre II: principales substances actives

et se transforme rapidement en D-glucopyranose. Les oses se cyclisant sous forme furanique (furanose) sont :

-le ribose donnant du ribofuranose ;

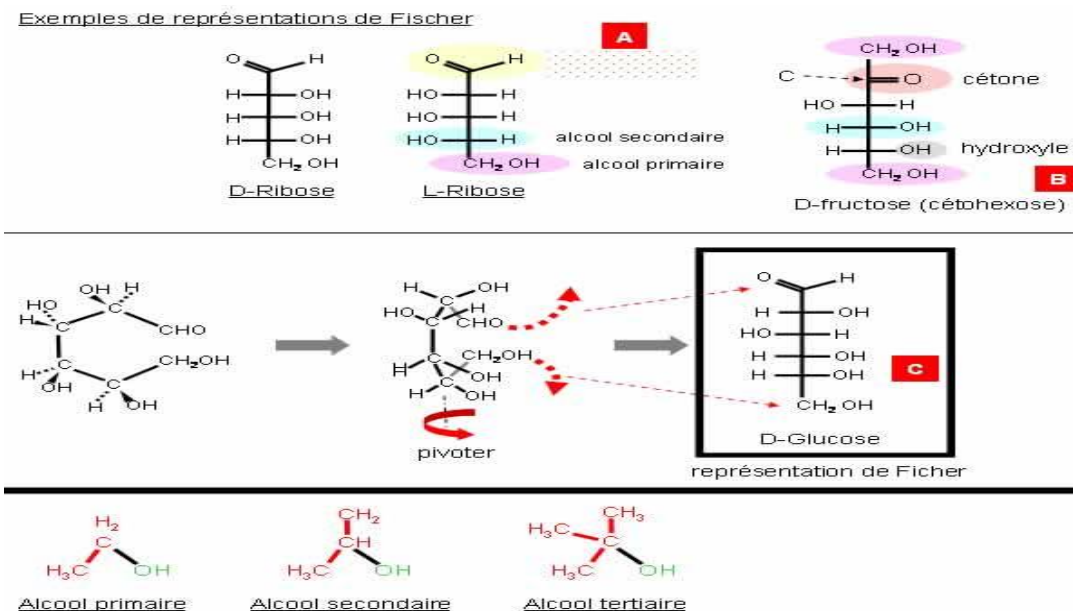
-le 2-désoxyribose donnant du 2-désoxyribofuranose ;

-le fructose donnant du fructofuranose ; de manière générale, ce sont les cétohexoses et les aldopentoses.

Les oses se cyclisant sous forme pyranique (pyranose) sont :

-le glucose donnant du glucopyranose ;

-le galactose donnant du galactopyranose ; de manière générale, ce sont les aldohexoses.



© Copyright 2011 [www.dillingco.com](http://www.dillingco.com)

Fig: BioChim biomol glucides p5

Figure 13 : Représentation linéaire (modèle de Fischer)

### III.1.1.1.3 Les osides :

Les osides sont des polymères d'oses liés par une liaison osidique. Ils sont hydrolysables, et aussi appelés glucides complexe.

## Chapitre II: principales substances actives

---

Deux formes d'osides sont nommable. D'un côté, dans les oligosaccharides on retrouve un nombre déterminé de monosaccharides (oses). Pour les nommer, on peut alors employer les termes : disaccharides (ex. saccharose), trisaccharides (ex. raffinose) etc. D'un autre côté, les polysaccharides sont composés d'un nombre indéterminé de monosaccharides. Pour les nommer, on emploie le terme polysaccharides (ex. cellulose).

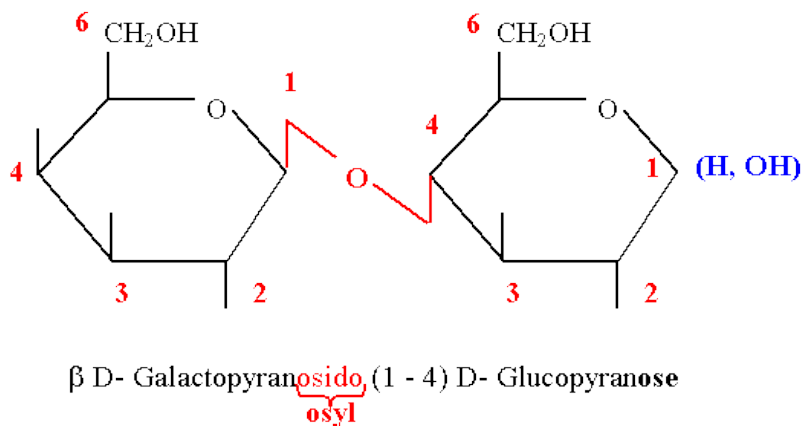


Figure 14 : Les osides

### III.1.1.1.4 Les polyholosides :

Association d'un très grand nombre de molécules liées par des liaisons O-glycosidiques. Chaînes soit linéaires ou ramifiées.

#### III.1.1.1.4.1 l'amidon :

L'amidon (du latin amyllum, non moulu) est un glucide complexe (polysaccharide) composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve pour les végétaux supérieurs et un constituant essentiel de l'alimentation humaine.

#### III.1.1.1.4.2 Structure de l'amidon :

L'amidon est un mélange de deux homopolymères, l'amylose et l'amylopectine composés d'unités D-Anhydroglucopyranose (AGU) qui appartiennent à la famille des polysaccharides (ou polyosides) de formule chimique générale  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Les unités AGU sont liées entre elles par des liaisons  $\alpha$  (1-4), en général caractéristique des polyosides

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

de réserve (à l'exception de l'inuline) et des liaisons  $\alpha$  (1-6) qui sont à l'origine de ramifications dans la structure de la molécule. Ces deux homopolymères, qui diffèrent par leur degré de branchement et leur degré de polymérisation sont :

L'amylose, légèrement ramifié avec de courtes branches et dont la masse moléculaire peut être comprise entre 10 000 et 1 000 000 Dalton. La molécule est formée de 600 à 1 000 molécules de glucose.

l'amylopectine ou isoamylose, molécule ramifiée avec de longues branches toutes les 24 à 30 unités glucoses par l'intermédiaire des liaisons  $\alpha$  (1-6). Sa masse moléculaire peut aller de 1 000 000 à 100 000 000 Dalton, selon les estimations scientifiques et son niveau de branchement est de l'ordre de 5 %. La chaîne totale peut faire entre 10 000 et 100 000 unités glucoses. Le ratio entre l'amylose et l'amylopectine dépend de la source botanique de l'amidon. Parfois, il y a aussi présence de phytoglycogène (entre 0 et 20 % de l'amidon), un analogue de l'amylopectine mais ramifié tous les 10 à 15 résidus glucose

### **III.1.1.1.5 Le rôle des glucides :**

\* Les glucides sont des :

- éléments de structure (exemple cerveau)
- réserves énergétiques (glycogène)
- composants de métabolites fondamentaux

\*Ils sont considérés maintenant comme des :

- signaux de reconnaissance
- déterminants antigéniques

### **1. Rôle énergétique**

- 40 à 50 % des calories apportées par l'alimentation humaine sont des glucides.
- Ils ont un rôle de réserve énergétique dans le foie et les muscles (glycogène).



## *Chapitre II: principales substances actives*

---

### **2. Rôle structural**

Les glucides interviennent comme :

- Eléments de soutien (cellulose des végétaux), de protection et de reconnaissance dans la cellule.

- Eléments de réserve des végétaux et animaux (glycogène, amidon).

- Constituants de molécules fondamentales : acides nucléiques, coenzymes, vitamines..

- Ils représentent un fort pourcentage de la biomasse car la plus grande partie de la matière, organique sur la Terre est glucidique.

### **3. Rôle économique**

Industrie de transformation des sucres très importants.

#### **III.1.1.2 Les acides aminés (aminoacides) :**

Les acides aminés sont des protéines qui fournissent de l'énergie, agissent comme catalyseurs (notamment dans l'hydrolyse), régularisent l'équilibre chimique, interviennent dans la régénération des tissus. Le corps humain contient 22 acides aminés dont 8 sont dits « essentiels » car notre organisme ne peut les fabriquer. L'aloès Vera renferme 7 des 8 acides aminés essentiels et 11 des 14 acides aminés dits « secondaires » que notre organisme synthétise à partir des 8 acides aminés essentiels :

#### **-Aminoacides essentiels :**

Isoleucine-Leucine-Lysine-Méthionine-Phénylalanine Théonine-Valine.

#### **-Aminoacides secondaires :**

Acide aspartique –Acide glutamique -Alanine -Arginine -Cystine -Glycine -Hystidine  
Hydroxiprolin – Proline –Sérine -Tyrosine.

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

### **III.1.1.3 Les lipide :**

Les lipides constituent la matière grasse des êtres vivants. Ce sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles, molécules hydrophobes possédant un domaine hydrophile très diversifiées, comprenant entre autres les graisses, les cires, les stérols, les vitamines liposolubles, les mono-, di- et triglycérides, ou encore les phospholipides. Les lipides peuvent se présenter à l'état solide, comme les cires, ou bien liquide, comme les huiles. Leur nature amphiphile conduit les molécules de certains lipides à s'organiser en vésicules, liposomes et micelles lorsqu'elles se trouvent en milieu aqueux. Cette propriété est à la base du vivant, permettant la formation de structures biologiques cellules, organites délimitées par des membranes constituées principalement de lipides. Les lipides assurent par ailleurs diverses autres fonctions biologiques, notamment de signalisation cellulaire (signalisation lipidique) et de stockage de l'énergie métabolique par lipogenèse, énergie ensuite libérée notamment par  $\beta$ -oxydation. Les lipides biologiques dérivent essentiellement de deux types de composés jouant le rôle de briques élémentaires, les groupes cétoacyle d'une part et les unités isoprène d'autre part. De ce point de vue, ils

peuvent être classés en huit catégories différentes : les acides gras, les acylglycérols, les phosphoglycérides, les sphingolipides, les glycolipides et les polycétides, qui résultent de la condensation de groupes cétoacyle, auxquels s'ajoutent les stérols et les phénols, qui sont produits à partir d'unités isoprène.

Bien que le terme lipide soit souvent utilisé comme synonyme de graisse, ces deux termes ne sont pas équivalents car tous les lipides ne sont pas des graisses, les quelles correspondent stricto sensu aux seuls triglycérides. Les lipides englobent à la fois les acides gras et leurs dérivés y compris les mono-, di- et triglycérides ainsi que les phospholipides mais aussi les métabolites comprenant des stérols, comme le cholestérol.

#### **III.1.1.3.1 Le rôle des lipides :**

\*Constitution des membranes cellulaires

\*Messager intercellulaire et intracellulaire

\*Substrat métabolique

\*Procurent des éléments nutritifs essentiels au fonctionnement du corps.

\*Assurent un rôle énergétique.

\*Fournit de la chaleur. (Merghem ,2009)

### **III.1.2 Métabolites secondaires :**

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas parfaitement élucidé.

Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez tous les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans métabolisme général (métabolisme primaire). Ce sont des métabolites secondaires qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétale (croissance, développement, reproduction...), mais ils participent à la vie relation de la plante (ou de leur organisme hôte), Et ils ont des rôles très variés, ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôle bénéfiques (pollinisateurs) .ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, par des messages d'alerte par exemple, ou faire partie de la structure de la plante (tanin et lignine ), (Merghem ,2009)

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

#### **III.1.2.1 Propriétés biologiques :**

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

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries. (Makoi et al., 2007)

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

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

Types des métabolites secondaires :

On peut identifier trois types de métabolites secondaires :

- Molécules phénoliques
- Terpénoïdes
- Alcaloïdes

Principales substances actives végétales :

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire.

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classées selon leur appartenance chimique. Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

### **II. Composés phénoliques :**

#### **II.1. Généralités :**

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

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (**Desjardins, 2008**). Par exemple la lignine est un composé essentiel des plantes qui permet leur maintien et la conduction de l'eau (**Macheix et al., 2005**). Les composés phénoliques contribuent également à la croissance et au développement de la plante par des actions diverses et variées. Ils interviennent par exemple dans le métabolisme et le transport de l'auxine (**Treutter, 2006**) et dans celui de l'éthylène (**Vendrell, 2003**). Les flavonoïdes conditionnent même la formation des grains de pollen chez le pétunia (**Napoli et al., 1999**).

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

#### **II.2. Classification des composés phénoliques :**

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (**Salunkhe, 1990**). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Figure...).

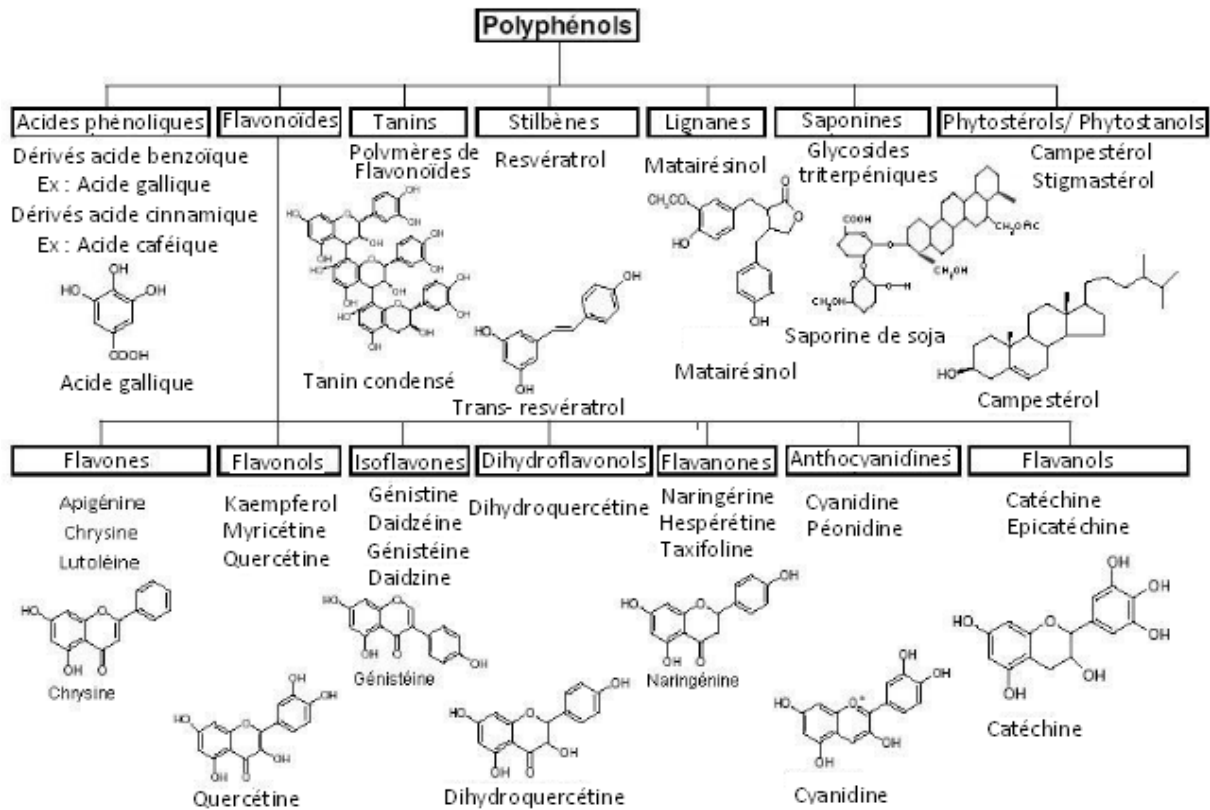


Figure 15 : Différentes classes des composés phénoliques. (Ilham hmid ,2014)

## II.2.1. Acides phénols et les coumarines :

### II.2.1.1. Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psoťova et al., 2003). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (Amakura et al., 2006).

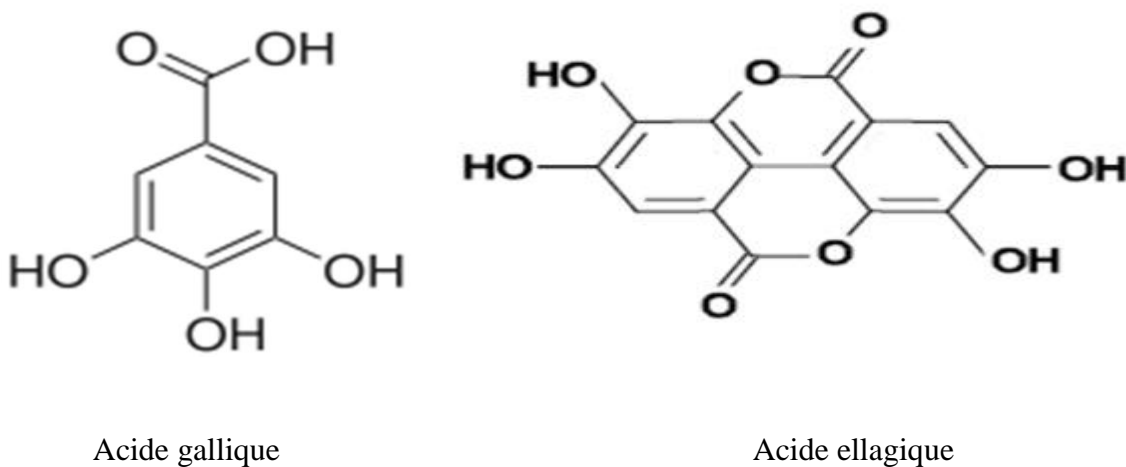


Figure 16 : Acides phénoliques

## Chapitre II: principales substances actives

l'acide benzoïque (Guignard, 1996) et les dérivés de l'acide cinnamique (Malagas, 1992). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (Fleuriet et al., 2005).

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides phénoliques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, salicyliques et gentsiques (Figure).

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

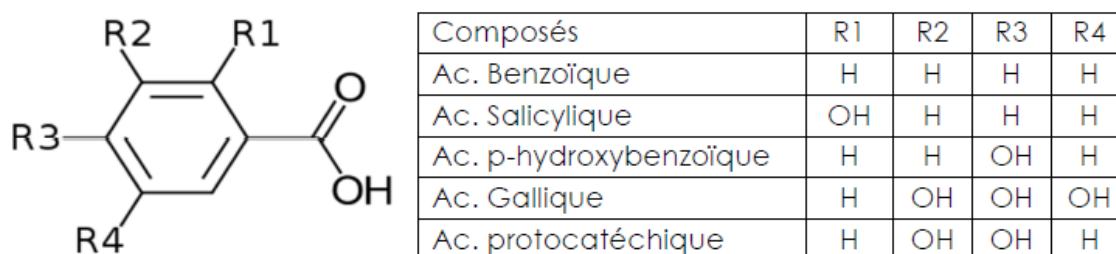


Figure 17. Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996).

### II.2.1.2. Acides cinnamiques :

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-coumarique, l'acide caféique et l'acide cinnamique (Figure 18) (Ribereau-Gayon, 1968)

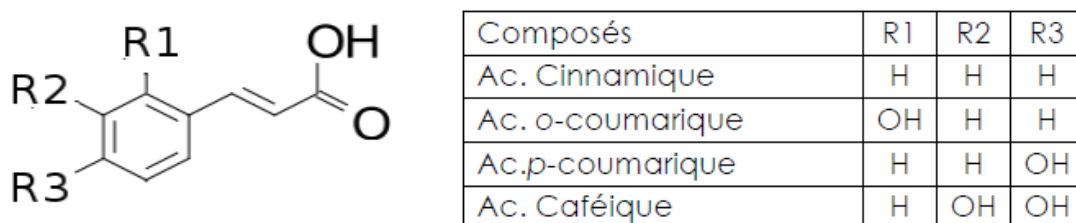


Figure 18. Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques (Malagas, 1992)

### II.2.1.3. Coumarines :

Nous pouvons considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxyles, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide *o*-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculetine, la scopoletine, dont les substitutions correspondent respectivement aux acides *p*

## Chapitre II: principales substances actives

---

coumarique, cafeïque et ferulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (voir figure.....) (Dean, 1963).



**Figure 19.** Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

### II.2.2. Flavonoïdes :

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

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

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C<sub>6</sub> (A et B), reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (Figure 10) (Bruneton, 1999).

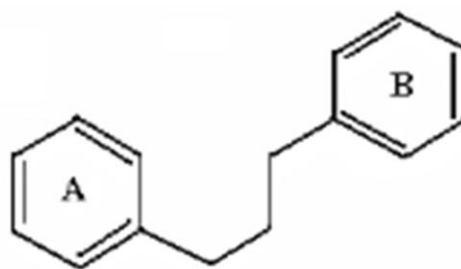


Figure 20 : structure de la Flavonoïdes

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



## Chapitre II: principales substances actives

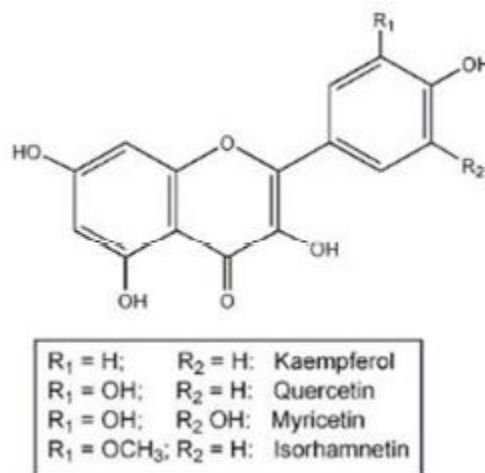
---

largement etudiees dans le domaine medical pour leurs activites antivirales, antitumorales, antiinflammatoires, anti-allergiques et anti-cancereuses (**Meddleton and Kardasnam, 1993**). La famille des flavonoides peut se diviser en six classes qui different par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (**Medic-Sanic et al., 2004**). Parmi les nombreux pigments derivants de cette structure des flavonoides, il convient de citer notamment:

### - Flavonols :

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

Parmi les flavonols les plus repandus, nous trouvons le kaempferol (OH en 4', 5, 7), le quercetol (OH en 3', 4', 5, 7). Ces deux flavonols sont incolores; le myricetol est l'isorhametol (Figure 21). Pour le grenadier nous trouvons le kaempferol dans les feuilles et la quercetine dans le jus (**Artik, 1998 ; Van Elswijk et al., 2004**).



**Figure 21.** Structures chimiques de quelques flavonols (**Van Elswijk et al., 2004**).

### - Flavanones :

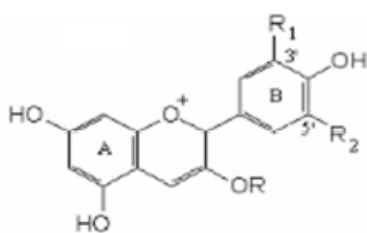
Ces composes ne comportent pas des groupements OH en position 3 et presentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette categorie, il faut ranger les flavonoides responsables de la saveur amere de certaines pamplemousses, citron, orange : la naringine (naringenol lie a du glucose et du rhamnose), l'hesperidine (**Alais and Linden, 1997**). La naringine est detectee aussi dans les feuilles du grenadier (**Kim et al., 2002**).

### -Anthocyanes :

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

Leur presence dans les plantes est donc detectable a l'oeil nu, elles donnent de la couleur aux fleurs et aux fruits, et elles sont generalement localisees dans les vacuoles des cellules epidermiques, qui sont de veritables poches remplies d'eau (**Harbone and Grayer, 1988**).

Si la coloration des fleurs et des fruits est leur role le plus connu, nous trouvons egalement les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caracteristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotenes qui ne sont plus masques par la chlorophylle. Leur structure de base est caracterisee par un noyau "flavon" generalement glucosyle en position C3 (**Ribereau-Gayon, 1968**). Les anthocyanes se differentient par leur degre d'hydroxylation et de methylation, par la nature, le nombre et la position des oses lies a la molecule, L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (Figure 22).



Anthocyanidines R=H	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Péonidine	OCH <sub>3</sub>	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH <sub>3</sub>	OH
Cyanidine	OH	H

Si la forme est monoglucoside : R = glucose

**Figure 22.** Structure de quelques anthocyanidine (**Ribereau-Gayon, 1968**).

### II.2.3. Tanins :

Les tanins sont des polyphenols que nous trouvons dans de nombreux vegetaux tels que les ecorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, cafe, cacao,..). Leur structure complexe est formee d'unites repetitives monomeriques qui varient par leurs centres asymetriques, leur degre d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

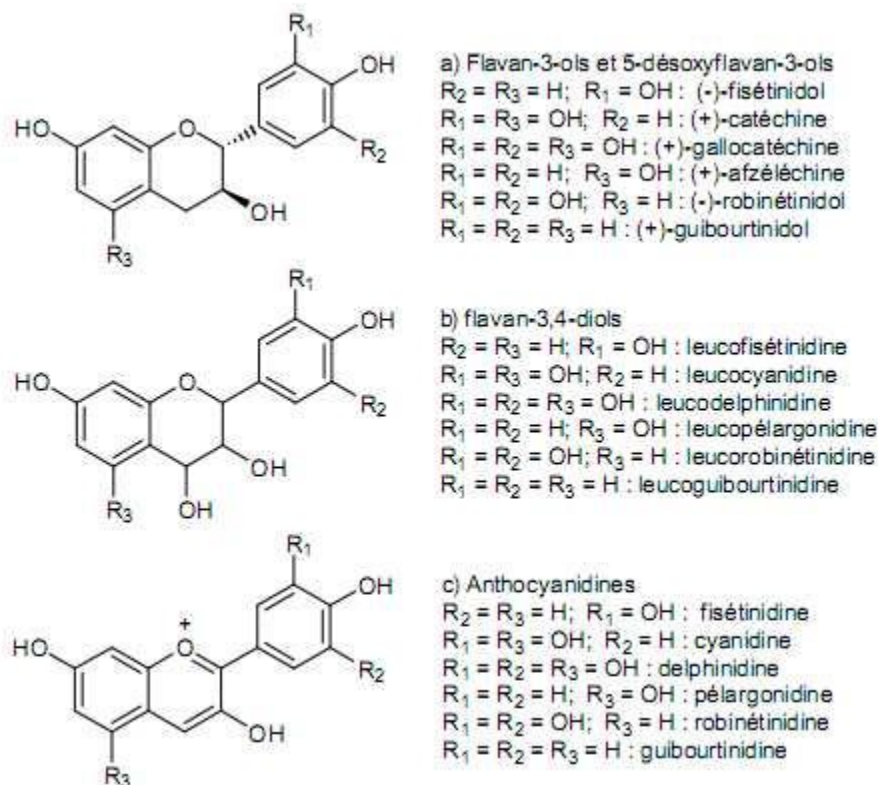
Les tanins sont divisés en deux groupes :

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

### II.2.3.1. Tanins condensés (flavan-3-ols) :

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

Il a été rapporté par Haslam (1998) que les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (Porter et al., 1986). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués, mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (Guignard, 1996). (Haslam, 1998) a montré que seuls des monomères flavan-3-ol (catechine) et flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidine) constituent les tanins condensés. La figure ..... présente les principales unités des tanins condensés.



**Figure 23.** Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-désoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3,4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

La plupart des proanthocyanidines oligomeres, qui sont les vrais tanins condensés, sont presque retrouvées accompagnées par un des flavan-3-ols. La (+)-catechine et la (-)-epicatechine sont les plus fréquentes, surtout quand il s'agit d'oligomeres de type B (**Haslam, 1998**). D'un point de vue structural les procyanidines dimères de type B sont formées par liaison entre le carbone 4 d'un monomere et le carbone 8 de l'autre. Les dimères catechiques sont à la base des tanins de type phloroglucinol (d'après l'hydroxylation du cycle A, y compris l'oxygène du pont chromane). Les dimères de type A sont constitués d'unités 5-deoxyflavan-3-ol (par exemple fisetinidol, robinetinidol) qui sont liés de préférence par des liaisons C4-C6. Ces dimères sont à la base des tanins condensés de type resorcinol. Il est donc probable que la substitution préférentielle dans les positions 6 et 8 (soit des liaisons 4-6 ou 4-8) dépende de l'accessibilité à chacune de ces positions. Les tanins condensés de type A proviennent essentiellement de deux espèces : les légumineuses et les anacardiées.

On classe les tanins condensés dont la structure repose sur les 5-deoxyflavan-3ols en proguibourtinidines, profisetinidines et prorobinetidines ; les profisetinidines étant les plus communs.

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

### **II.2.3.2. Tanins hydrolysables :**

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

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

### **IV. les sels minéraux :**

Les sels minéraux sont des substances provenant de roches qui entrent dans la composition des organismes et qui sont présents dans l'alimentation animale et végétale. Ils se présentent sous forme ionique (anions ou cations), exemple : Ca pour le calcium, Cl pour le chlore. Ce sont des substances indispensables à l'organisme, tous essentiels à l'organisme humain.

-Calcium : croissance osseuse en association avec le phosphore.

-Phosphore : croissance osseuse en association avec le calcium.

-Potassium (Sorbate de Potassium) : action régulatrice de l'équilibre hydroélectrolytique des liquides de l'organisme.

-Fer : favorise l'hémoglobine et la fixation de l'oxygène.

-Sodium : maintient l'équilibre acido-basique des liquides organiques et favorise le métabolisme de l'eau au sein des tissus et des cellules.

-Chlore : antiseptique et désinfectant.

- Manganèse : en association avec le magnésium, maintient le bon fonctionnement des muscles et du système nerveux.

-Magnésium : (voir manganèse)

-Cuivre : oligoélément indispensable au maintien de l'équilibre de l'organisme.

-Chrome : favorise l'activité des enzymes des acides gras.

-Zinc : stimule l'activité des protéines dans la cicatrisation. (Merghem ,2009)

#### **IV.1 Le rôle des sels minéraux :**

\*Les rôles joués par ces minéraux sont variables et divers : constitution des tissus, régulateur des mouvements d'eau rôle dans l'excitabilité neuromusculaire, élaboration des hormones, des enzymes, etc... , soit par incorporation directe, soit par un mécanisme catalytique.

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

\*les glucides, les lipides, les protéines et les vitamines ne peuvent être apportés au corps humain que si celui-ci dispose de suffisamment de sels minéraux.

\*Par exemple le Calcium, le Phosphore servent à fabriquer la matière vivante et entrent dans sa composition, le Cuivre ou le Chrome ne sont utilisés que comme accélérateurs de réactions enzymatiques (catalyseurs).

\*Leur rôle est essentiel dans la fabrication des protéines, le transport de l'oxygène et dans la régulation de le taux de sucre par l'insuline.

\*Ce sont des nutriments indispensables mais qui diffèrent des autres nutriments, à savoir les nutriments qui produisent de l'énergie (protides, lipides, glucides), car à l'image des vitamines, les sels minéraux ne sont pas une source énergétique.

\*Aussi contrairement aux nutriments producteurs d'énergie, les sels minéraux et les oligoéléments n'apportent aucune calorie. (Merghem ,2009)

### **V. Les activités biologiques :**

#### **V.1 Activité Antibactérienne :**

Malgré les avances spectaculaires dans les recherches pharmaceutiques, l'apparition et le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenu un défi médical mondial. Les professionnels de la santé ne cachent pas leurs inquiétudes suite aux développements des bactéries multirésistantes. Ces dernières provoquent des infections qui ne réagissent plus aux antibiotiques. Selon l'OMS, plus de 1,4 million de personnes dans le monde sont victimes des infections nosocomiales provoquées par les bactéries résistantes aux traitements et contractées lors des soins médicaux. Il est à noter que 70% des infections nosocomiales lourdes sont osseuses. Les fréquences maximales ont été rapportées dans les hôpitaux des régions de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud-Est (11,8% et 10,0% respectivement), et la prévalence atteignait 7,7% en Europe et 9,0% dans le Pacifique occidental.

Par ailleurs, les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus.

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes, d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie. Justement dans cette optique, plusieurs instituts de recherches ont procédé à des investigations dans l'étude de l'activité biologique de plantes médicinales originales de diverses régions du monde. Ces travaux sont basés sur l'usage populaire des espèces natives. Certains extraits et huiles

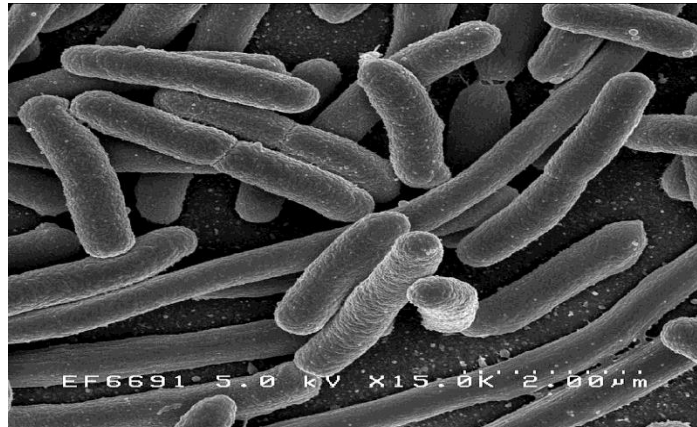
essentiels de plantes se sont montrés efficaces dans l'inhibition de la croissance d'une grande variété de souches bactériennes.

D'autre part, les risques de contamination microbienne provenant de la manipulation et la conservation des aliments sont de plus en plus fréquents. En outre, la demande croissante à des méthodes de conservation des aliments avec des produits naturels, nécessite le développement de 42 nouvelles méthodes de conservation basées sur l'ajout d'extraits de plantes. Ces méthodes de conservation représentent un besoin vital et pourraient éventuellement être une alternative aux antimicrobiens de synthèse. Il est donc nécessaire de développer des outils aiguisés pour tester l'activité antimicrobienne des produits naturels. On rapporte ci-dessous quelques techniques d'analyse de l'activité antibactérienne.

### **V.1.1 Quelques bactéries :**

#### **V.1.1.1 Escherichia coli :**

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale (Gram négatif), des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles des chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'E. coli peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ousepsis.

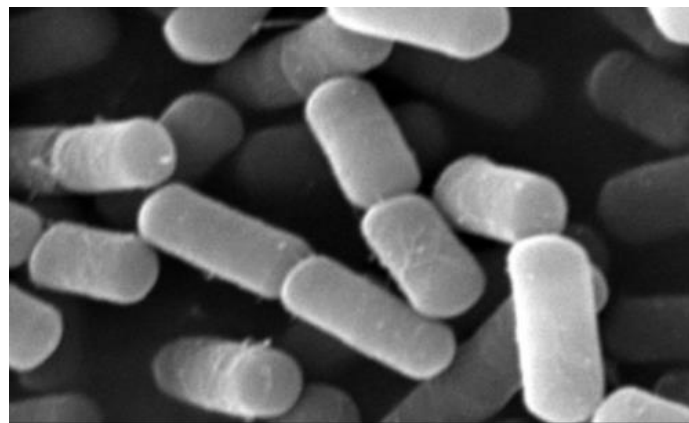


**Figure 24: Bactérie d'E.Coli**

### V.1.1.2 *Bacillus cereus* :

*Bacillus cereus* est une bactérie appartenant au genre *Bacillus*.

La morphologie du germe correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1  $\mu\text{m}$  de large pour 3 à 4  $\mu\text{m}$  de long, sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre moyen de 1,4  $\mu\text{m}$  et de type respiratoire aéro-anaérobie, présentant une positivité à la coloration de Gram, et synthétisant deux types de toxines : une toxinethermostable et une toxine thermolabile.



**Figure 25 :Bacillus cereus**

### V.1.1.3 *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et sont souvent responsables d'infections contractées dans les hôpitaux. Leur habitat naturel est constitué par les flores cutanées et les muqueuses humaines et animales. Ils sont également retrouvés dans l'environnement (eau, sol, air, aliments, objets). Le traitement est difficile car



de nombreuses souches sont multirésistantes aux antibiotiques. Selon les services hospitaliers, ces dernières représentent entre 20 et 50% des souches.

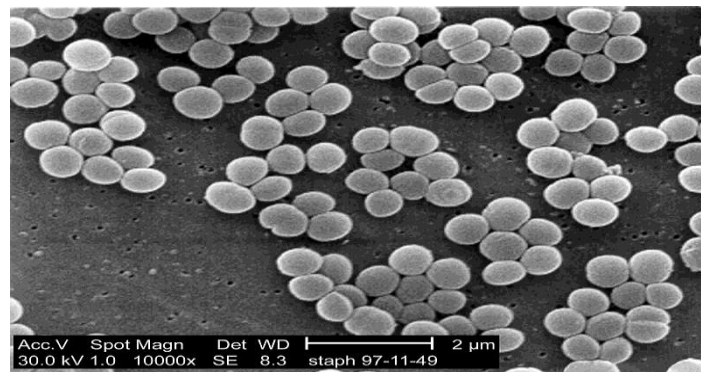


Figure 26 : *Staphylococcus*

### V. Activite Anti inflammatoires :

#### 1- la peau

La peau protège l'organisme ,contre le milieu extérieur et jeu un outre fonction suit de variétés cellulaires. ( Ann. Dematl.2005)

#### 1-2. Structure de la peau

La peau des Mammifères est constituée de deux couches :

- l'épiderme
- le derme qui repose sur l'hypoderme.

#### 1-2-1- Epiderme

Epithélium malpighien kératinisé, il est constitué, pour l'essentiel, de kératinocytes mais aussi de mélanocytes, cellules de Langerhans, cellules de Merkel et accessoirement, de lymphocytes et mastocytes.

On distingue 5 couches :

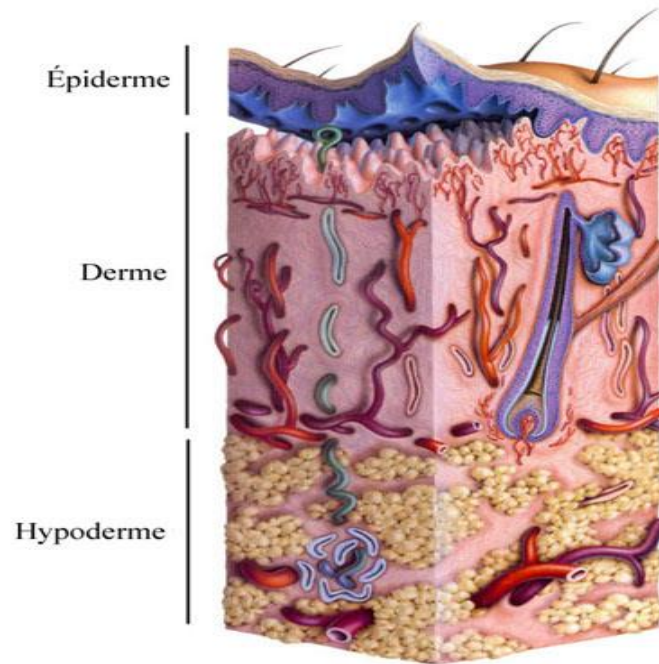
- la couche basale ou *stratum germinativum* composée de cellules souches,
- La couche épineuse ou *stratum spinosum* liées entre elles par desmosomes.
- La couche granuleuse ou *stratum granulosum* :
- La couche claire ou *stratum lucidum*.
- La couche cornée ou *stratum corneum* : c'est la plus superficielle. Les cellules mortes kératinisées

### **1-2-1- derme**

Le derme est la couche qui donne la souplesse et la résistance à la peau. Il est composé principalement de tissu conjonctif qui le rend compressible et élastique. Il constitue un support pour les différentes annexes cutanées : les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les poils, les terminaisons nerveuses et les glandes sébacées et sudoripares. Ces annexes sont en fait entourées de fibres majoritairement constituées de collagènes de types I et III, arrangées en filet pour assurer souplesse et solidité. La matrice est aussi constituée de fibres élastiques, formées par l'élastine, une protéine insoluble. Plusieurs cellules peuplent cette matrice. Les fibroblastes sont majoritaires et synthétisent tous les types de fibres et quelques constituants de la membrane basilaire. Les fibrocytes, les fibroclastes et les myofibroblastes sont des dérivés des fibroblastes ayant des fonctions plus spécifiques qui se trouvent aussi dans le derme. D'autres types cellulaires peuvent aussi être présents en moindre quantité : des dendrocytes, des mastocytes, des macrophages et des lymphocytes (**Kanitakis 1998; Kanitakis 2002**).

#### **1.1.3 Hypoderme**

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de tissus adipeux qui ont pour fonction d'emmagasiner l'énergie sous forme de graisse. En fait, environ la moitié de tout le gras emmagasiné dans le corps humain est retrouvée dans cette couche. L'hypoderme joue aussi un rôle de thermorégulation et de protection contre les agressions mécaniques. Les cellules qui peuplent l'hypoderme s'appellent les adipocytes, des cellules rondes remplies d'acides gras et de triglycérides comprimant le noyau contre la membrane plasmique (**Kanitakis 2002**). Les adipocytes sont organisés en lobules primaires et secondaires et leur morphologie varie selon la région du corps et la race de la personne. Cette couche contient aussi des fibroblastes et des macrophages, en plus de vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses. Ces dernières sont aussi appelées corpuscules de Pacini ou corpuscules lamellaires et sont sensibles à la pression (**Wysocki 1999**).



**Figure 27 : Structure de la peau**

1-3-Fonction de la peau :

La peau joue le rôle de barrière entre le milieu intérieur et l'environnement. Protection mécanique ; contre l'eau ; contre la lumière. Thermorégulation ; Homéostasie biochimique. Fonctions métaboliques et immunologiques ; sensorielles ; dans la vie sociale (**Sandrine follet 2003**).

**Tableau 4:** Fonction de la peau et du pelage

<b>Fonctions</b>	<b>Moyens mis en œuvre</b>
Protection mécanique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelage</li> <li>- Agencement des fibres de collagène</li> </ul>
Protection contre l'eau	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Film hydrolipidique de surface</li> <li>- Orientation des poils</li> </ul>
Protection contre la lumière	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelage</li> <li>- Pigmentation</li> </ul>
Thermorégulation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelage abondant : coussin d'air isolant stocké entre les poils</li> <li>- Système vasculaire dermique</li> <li>- Tissu conjonctif SC riche en adipocytes</li> </ul>
Homéostasie biochimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stockage d'électrolytes et d'eau dans la matrice dermique</li> <li>- Stockage de lipides et de molécules liposolubles dans le tissu adipeux SC</li> </ul>

## Chapitre II: principales substances actives

---

Fonctions métaboliques et immunologiques	- Synthèse de la vitamine D...
Fonctions sensorielles	- Terminaisons nerveuses dans l'épiderme - Vibrisses, follicules pileux...
Fonctions dans la vie sociale	- Mimétisme - Marquage territorial

### 2-La cicatrisation cutanée :

#### 2-1 . Déroulement de La cicatrisation normale

Il ya trois phase sont les suivantes phase :

##### 2-1-1- phase initiale vasculaire et inflammatoire

L'inflammation est une réaction vasculaire et cellulaire qui permet d'éliminer les substances étrangères qui pourraient infecter la plaie. Cette phase est aussi responsable de la présence de cicatrice dans la guérison de la peau . (Colwell et al. 2003). Pendant cette étape, il y a formation d'un caillot de sang qui réunit lâchement les bords de la plaie. Ce caillot est formé lorsque des vaisseaux sanguins sont endommagés. Des plaquettes entrent alors en contact avec le collagène subendothélial, ce qui déclenche la cascade de coagulation (Witte et al. 1997). Ces mêmes plaquettes activées relâchent des médiateurs biochimiques qui causent une vasoconstriction afin de réduire la perte sanguine. L'activation de la thrombine par le tissu blessé transforme un composé soluble, le fibrinogène, en fibrine qui s'agglutine avec les plaquettes pour former le caillot sanguin (Hunt et al. 2000).

##### 2-1-2-- Phase de réparation:

Durant cette étape, qui commence dans les quelques heures suivant la blessure, il se produit une organisation de l'exsudat inflammatoire où les cellules recrutées au site lésé entrent en mitose puis s'activent afin de définir grossièrement la structure de la cicatrice. Il survient alors un équilibre entre la production de matrice et la destruction des tissus endommagés et irréparables. Le tissu temporaire alors formé s'appelle le tissu de granulation (Tortora et al. 1994). Des myofibroblastes participent à la réparation en rapprochant les bords de la plaie, facilitant ainsi la fermeture (Gabbiani 1998; Grinnell 1994; Serini et al. 1999).

### **2-1-3 -- La phase de maturation**

Au début de cette phase, l'épiderme a retrouvé son épaisseur normale et la croûte formée à partir du caillot sanguin tombe. Les fibres de collagène commencent à être mieux organisées : initialement fines et désordonnées, elles deviennent plus épaisses et alignées avec les autres fibres des marges de la plaie (**Hunt et al. 2000; Smith et al. 1998**). En plus des fibres de collagène, d'autres composants comme des glycosaminoglycans et des protéoglycans viennent s'ajouter à la matrice extracellulaire. Avec le temps, la quantité de fibroblastes diminue et les vaisseaux sanguins reprennent leur taille normale. L'apoptose des fibroblastes et des cellules endothéliales marque la transition entre le tissu de granulation et la cicatrice proprement dite. L'excès de matrice est aussi éliminé par l'activation de collagénases comme les MMP (métalloprotéinase matricielle) (**Pilcher et al. 1999; Yamaguchi et al. 2001**). Malgré toutes les modifications et le remodelage que subit le derme durant cette phase, la peau ne retrouvera jamais ni sa fonction ni sa force ou résistance originale (**Hunt et al. 2000; Tortora et al. 1994**). En effet, la force de tension de la peau cicatrisée ne dépassera pas 80 % de sa force antérieure (Clark 1985). De la même façon, l'élasticité de la cicatrice sera moindre qu'avant la blessure (**Doillon et al. 1985**).

### **V.3 Les antioxydants :**

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produit quotidiennement par l'organisme ; ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**) mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

**Les flavonoïdes :** Ce sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation

## *Chapitre II: principales substances actives*

---

du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al., 2006**).

**Les tanins :** Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides.

**Les coumarines :** Ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires et ils ont une activité antiperoxydante (**Diallo, 2005**).

### **VII. Dosage des phénols totaux :**

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (1927) est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

### **VIII. Lyophilisateur :**

Le lyophilisateur est une machine permettant de dérouler un processus de lyophilisation. Elle est composée au minimum d'une enceinte frigorifique pouvant être tirée au vide et d'une surface plus froide faisant office de piège frigorifique. Des lyophilisateurs minimalistes peuvent être utilisés pour des applications peu exigeantes techniquement (lyophilisation de plantes, de papiers humides, séchage de vestiges archéologiques...), mais les lyophilisateurs sont surtout utilisés pour la production pharmaceutique, où les contraintes de délais et de qualité ont conduit à compliquer fortement leur construction. Les produits les plus lyophilisés sont les aliments. (**Wikipedia, Lyophilisateur**).

### **I-8 / La spectrophotométrie :**

#### **I-8-1 / Définition :**

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert (**Wikipédia**)



Figure 27 : La spectrophotométrie

chapitre III

Matériel

et

méthodes



## Chapitre III : Matériel et méthodes

---

Une étude phytochimique d'une espèce végétale passe impérativement par ces étapes:

- Récolte de la plante.
- Conservation.
- Broyage.
- Extraction.
- Séparation et identification structurale des produits isolés.

Ce travail a été effectué aux laboratoires 13 de biologie et physiologie végétale département de biologie végétale et écologie, faculté de sciences de la nature et de la vie.

### I. Le matériel végétal :

Notre étude apportée sur deux espèces de plantes de la même famille Lythraceae la première espèce : (*Lawsonia inermis*) et la deuxième espèce : (*Punica granatum*L). Nous sommes intéressés par les métabolites primaires et secondaires et aussi de quelques molécules bioactives et quelques activités biologiques, et nous avons fait des études phytochimiques sur les deux plantes et on a utilisées dans cet étude parties de chaque plante qui sont : écorce (PG), tige, jus (PG), graine (LI), fleurs et feuille.



*Punica granatum*

*Lawsonia inermis*

**Figure 25 : photos de plantes utilisées dans la recherche**

## Chapitre III : Matériel et méthodes

---

### I.1 Récolte de la matière végétale

Les deux espèces ont été récoltées à partir de la même famille la première espèce (*Lawsonia inermis*) a été récolté dans Biskra la région de : Alzerba (Sud-est de Algérie) et la deuxième espèce : (*Punica granatum* L) a été récolté Wilaya de Mila dans la région de oued athmania (Est de l'Algérie) durant le mois : De Septembre à Mars 2014/2015.



 OUED ATHEMANIA

 BISKRA

Figure 26 : Distribution géographique de la récolte *Lawsonia inermis* et *Punica granatum*

### I.2 Broyage de parties sec:

Les différentes parties d'espèces sont broyées finement et entièrement à l'aide d'un mortier



Figure 26 :Broyage de parties sec

### I.3La macération de la matière végétale:

Le protocole d'extraction est le même pour les deux espèces .On prend 20 g du poids sec de chaque partie des deux espèces dans 300 ml de solution hydro-alcoolique et en a utilisé trois solution (Méthanol, chloroforme, éther de pétrole) et en laisse macérer dans des flacons de petite taille pendant 3 jours (72 h) successifs (**Figure.27**) avec renouvellement du solvant chaque 24 h et agitation de temps en temps. Ceci pour permettre une meilleure extraction des composés chimiques.



Figure 27 : Photos de macération de la matière végétale *Lawsonia inermis*.



**Figure 28 :**Photos de macération de la matière végétale *Punica granatum L*

Après la macération d'un temps de 72 h, la solution hydro-alcoolique a été filtrée à l'aide d'un entonnoir sur coton (Figure 28).



**Figure 29 :** filtrée à l'aide d'un entonnoir

### **II. dépistage phytochimique:**

#### **II.1 Criblage des métabolites primaires :**

##### **II.1.1 Les composés réducteurs :**

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20gouttes de la liqueur de Fehling (Réaction de liqueur de Fehling : Mélanger 5ml de liqueur Fehling avec 5ml de liqueur Fehling B), puis chauffer. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones est révélé par la transformation du couleur aux rouge ou rouge brique. (Trease et Evans, 1987).

##### **II.1.2 Criblage d'amidon:**

Le test effectué consiste à ajouter le réactif d'amidon qui est: l'eau iodée (dissoudre dans 20ml d'eau distillée 1,5g d'iodure de potassium (KI) puis 0,5g d'iode (I)et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml), sur le matériel végétale qui sera étudié. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée. (Guignard, 1979).

##### **II.1.3 Criblage des acides lipides :**

Leur détection consiste à mettre la substance à tester en solution aqueux dans un tube ou dansun verre de montre, après on a goûté quelques gouttes de rouge Soudan III. Le rouge Soudan III meten évidence les lipides par une coloration Rouge intense.

##### **II.1.3 Criblage des protéines :**

Leur détection consiste à mettre la substance à tester en solution aqueux dans un tube ou dans un verre de montre, après on a goûté quelques gouttes de NAOH +goûté quelques gouttes à partir de CUSO4. Le met en évidence la protéine par une Dépôt de graisse.

### **II.1.4 Criblage des acides aminés :**

#### **II.1.4.1 Matériel :**

- cuves à chromatographie.
- sèche-cheveux.
- microtubes 1 à 2 ml avec support.
- micropipette 1 -10 µl.
- flacon pulvérisateur.
- hotte aspirante.

#### **II.1.4.2 Consommables :**

- plaques à CCM (cellulose ou silice sur polyester ou de l'aluminium).

#### **II.1.4.3 Réactifs :**

- hydrolysats protéiques ou autres mélanges d'AA.
- 100 ml de solvant : butanol 70 ml + acide acétique 18 ml + eau 12 ml à placer dans un flacon hermétiquement clos.
- Solutions d'AA : 2 à 5 mg d'AA (glycine, proline, tyrosine, proline, acide aspartique, asparagine, méthionine, isoleucine, arginine, phénylalanine) dans 1 ml d'eau distillée, à placer dans des micro-tubes.



**Figure 30 : photo du standard d'acides aminés.**

- Colorant : solution de ninhydrine à 5% dans acétone, à placer dans un flacon pulvérisateur à parois opaques (la ninhydrine s'altère à la lumière).

- **A préparer juste avant...**

- les cuves à CCM : disposer, sous hotte aspirante, le solvant au fond des cuves sur une épaisseur de 1cm. Fermer hermétiquement les cuves et les stocker sous hotte aspirante (l'inhalation de vapeurs désolants organiques sont déconseillées). L'atmosphère de la cuve va se saturer en vapeurs en 15 min.

-le révélateur : préparé au moins 24 h à l'avance et placé dans un flacon pulvérisateur opaque.

- les plaques à CCM : tracer, à la pointe du crayon, un repère à 2 cm du bas de la plaque, marquant l'aligne sur laquelle se feront les dépôts.

**II.1.4.4.Dépôts:** (15min.) Sur la plaque à CCM réalisé successivement les dépôts des différentes substances à chromatographie (mélange d'AA et AA de référence). Manipuler la plaque à CCM en évitant d'y appliquer les doigts. Pour chaque solution on fera 2 à 3 dépôts successifs (afin de disposer d'une concentration suffisante de produit) au moyen de la

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

pipette pasteur. Le diamètre du dépôt ne doit pas excéder 2 mm. Utiliser le repère tracé au crayon. Séparer les dépôts d'au moins 5mm. Sécher la plaque entre chaque dépôt (à l'étuve ou au sèche-cheveux). Noter soigneusement (sur un schéma de la plaque CCM) la position et l'ordre des dépôts réalisés.



**Figure 31 :photo du dépôt de la plaque CCM**

**II.1.4.5 Migration et séchage(40 min.) :** Une fois l'ensemble des dépôts réalisés, placer rapidement la plaque à CCM dans la cuve. La ligne des dépôts doit être située au-dessus du solvant. Laisser migrer 30 min environ. Retirer la plaque quand le solvant est arrivé à 1 ou 2 cm du bord supérieur. Marquer, au crayon la limite de migration. Evaporer le solvant en le plaçant à l'étuve 60 °C ou en utilisant, sous la hotte aspirante le sèche-cheveux. La plaque doit être incolore.

## **II.2 Criblage des métabolites secondaires :**

### **II.2.1 Criblage des composés phénolique:**

Se réalise à partir de l'extrait hydro alcoolique des différentes parties de grenade et henné, et réparti dans 6 tube de chaque plante, chacun des 6 tubes proprement étiquetés (écorce(PG), Jus de grenade, tige, graine (LI), fleurs et) pour les 2 tests suivants :



## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

**A–Test de Wilstater:** traiter les extraits avec quelques gouttes d'HCl concentré et ajouter une quantité de tournures de Mg (3-4 graines), et laisser agir. La présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (**Karumi, 2004**)

**B–Test de Bate-Smith:** traiter les extraits avec HCl concentré et porter au bain marie pendant 30 minutes, l'apparition de couleur rouge ou brun confirmée la présence de anthocyane.

### **II.2.2 Criblage des tanins:**

1.5g de matériel végétal se sont placés dans 10ml de MeOH 80%, Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes. L'ajoute de FeCl<sub>3</sub> permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins caté chique. (**Rizk, 1982**).

### **II.2.3 Criblage des anthraquinones:**

L'extrait chloroformique de chacun des organes. On ajoute KOH aqueux 10%, Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge ou rose. (**Rizk, 1982**).

### **II.2.4 Criblage des quinones:**

1g de matériel végétal (feuille, tige, racine, gel, hampe florale, fleurs(AI), gousse(Ag)) sec et broyé et placé dans des tubes avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures, les extraits sont filtrés. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajoute de quelques gouttes de NaOH(1/10), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet. (**Ribérreau, 1968**).

### **II.2.5 Criblage des Alcaloïdes:**

#### **Révélation par le réactif Mayer:**

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, le réactif de Mayer a été utilisé. L'ajout de quelques gouttes de ce réactif (10 g de KI et 2,70 g de HgCl<sub>2</sub> dissous dans 20 ml d'eau) à 2 ml de la solution d'extrait méthanolique entraîne la formation d'un précipité blanc ou blanc-jaune en présence d'alcaloïde (**Memelink et al, 2001**).

### **II.2.6 Criblage des saponosides:**

On met 2g de l'échantillon végétal pour chaque partie (écorce (PG), feuille, tige, graine (LI), fleur) dans des tubes d'essais puis on rajoute quelques gouttes des réactifs suivants ces tests :

**Test 1 :** introduire 2g du matériel végétal dans un tube à essai. Mélanger avec 10 ml d'eau distillée, en agitant pendant 2-3 minutes. (**Karumi et al, 2004**).

**Test 2:** 2g du matériel végétal sont mélangés avec 10 ml de MeOH dans un tube à essai.

Agiter puis laisser reposer. (**Benmahdi., 2000**).

**Test 3:** 2g du matériel végétal sont mélangés avec 10 ml de CHCl<sub>3</sub>, agiter pendant quelques minutes. (**Edeaga., 2005**).

On fait bouillir dans un bain marie pendant 15 à 20 minutes, les trois tests sont réalisés sur chacun d'organes de les deux plantes (écorces (PG), feuille, tige, fleurs, graine) .

La formation d'une mousse persistante après 15 minutes confirme la présence des saponosides.

-Pas de mousse = test négatif-Mousse de 1-2cm= test positif

-Mousse moins de 1cm = test faiblement-Mousse plus de 2cm= test très positif

### **II.2.7 Criblage des coumarines:**

**Protocole 1:** La présence de coumarines (composés polyphénoliques) est réalisée en évaporant à sec 5 ml d'extrait étheré. 2ml d'eau chaude sont ajoutés puis 1 ml de NH<sub>4</sub>OH a 25%. Le mélange est observé sous UV à 366 nm .L'observation d'une fluorescence bleue intense indique leur présence .(**Badiaga M, 2011**).

**Protocole 2 :** Test de détection: 2 g de matériel végétal en poudre sont mélangés à 10 ml de CHCl<sub>3</sub>. Après un chauffage de quelques min et une filtration, les extraits chloroformique sont soumis à une CCM, et le solvant étant le mélange toluène / Ac Et (36 :14). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 365 nm.

### **II.2.8 Criblage des stérols et stéroïdes et triterpènes :**

Dépigmenter 100mg d'extrait hydroal coolique par addition de 10ml de cyclohexane et agitation pendant 5minutes. Dissoudre le résidu dépigmenté dans 10ml de chloroforme .Sécher la solution obtenue sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servira de témoin.

**Tube n°1 :** test de Salkowski : incliner le tube à 45°, ajouter 1 à 2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le changement de coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence de stérols insaturés.

**Tube n°2 :** test de Libermann-Burschard : additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré .Le changement de coloration est observé pendant une heure : une coloration bleu-vert indique la présence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes.

**Tube n°3 :** test de Badjet-Kedde: additionner quelques grains d'acide picrique. L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes .

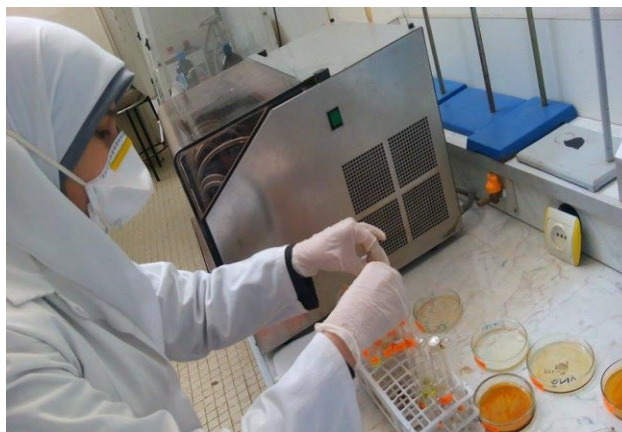


Figure 32 : Criblage des stérols et stéroïdes et tri terpènes

### II.3 Criblage des sels minéraux

Tableau 5 : Réactifs des sels minéraux

Réactifs	Résultats	Mise en évidence
Acide picrique	cristaux en aiguille de couleur jaune	m.e.e. du potassium
AgNO <sub>3</sub>	précipité noir précipité blanc	m.e.e. des chlorures m.e.e. du calcium
Oxalate d'ammonium		
Chlorure de baryum	précipité bleu	m.e.e. des sulfates
Thio cyanate de potassium	coloration rouge	m.e.e. du fer

### III. L'étude analytique des métabolites secondaires:

#### III.1 Evaporation :

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor) à une température comprise entre 35 à 45°C, afin d'obtenir un extrait sec.



Figure 33 : Evaporation rotative (Rotavapor)

##### III.1.1 Dosage des polyphénols :

A partir de la solution mère (1 mg/ml) de l'extrait méthanolique de l'écorce de plantes étudiée, nous avons préparé deux répétitions d'une même concentration (125 µl) avec la manière suivante : Une prise de 125 µL de l'extrait dilué (SM) est mélangée avec 500 µL d'eau distillée et 125 µL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 µL de  $\text{Co}_3(\text{Na})_2$  à 7% est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm (Heilerová *et al.*, 2003).

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.l. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide-1gallique par gramme de matière séchée (mg EA G.gMS), (Singleton *et al.*, 1999).

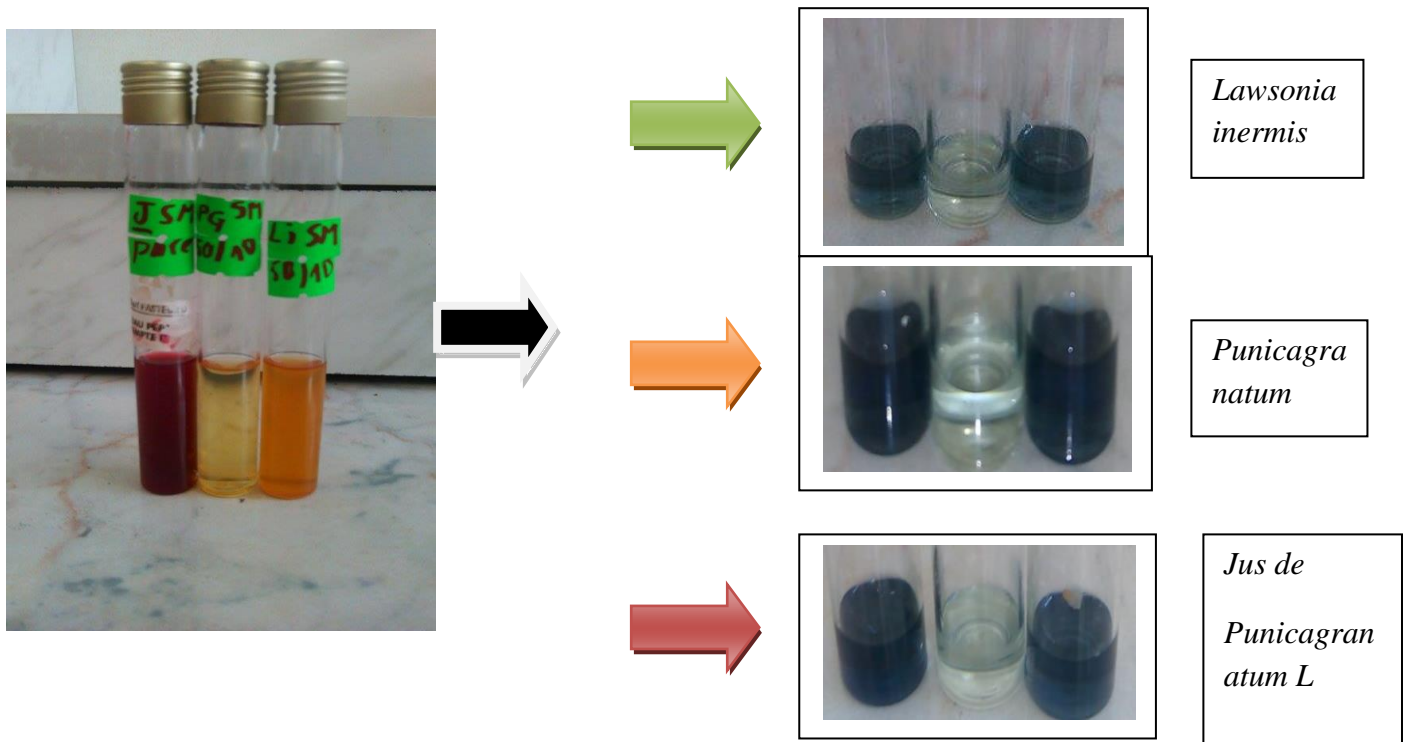


Figure 34 : les principales étapes du dosage des polyphénols

#### IV. Extraction des flavonoïdes :

Suivant le protocole d'extraction décrit par (Merghemet *al*, 1995), le matériel végétal broyé (100 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange méthanol / eau (30/70 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation), après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante :

- ◆ Affrontement par éther de pétrole
- ◆ Affrontement par chloroforme
- ◆ Affrontement par acétate d'éthyle
- ◆ Affrontement par butanol

## Chapitre III : Matériel et méthodes

- Et puis les mettre dans un l'ampoule à décanter, nous avons extrait le flavonoïde chaque fois

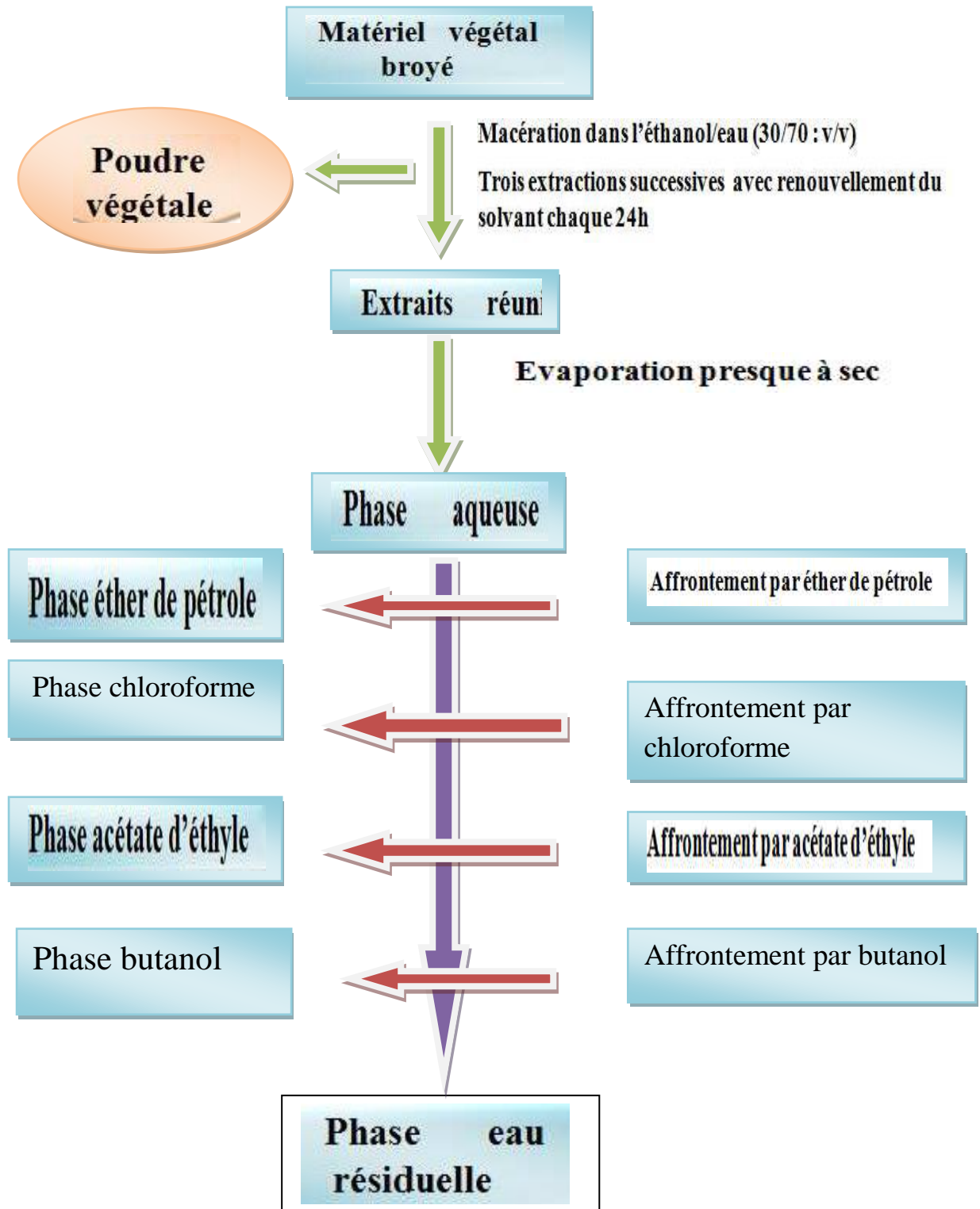


Figure 35 : Protocole d'extraction des flavonoïdes

## Chapitre III : Matériel et méthodes

Tableau 6 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005)

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

### V. Etude analytique par chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

- ♦ **La phase stationnaire** : c'est le support solide, qui est la colonne de gel de la silice, elle est montée dans le moins polaire des solvants utilisés qui est le toluène dans notre cas.



## Chapitre III : Matériel et méthodes

---

- ♦ **La phase mobile** : représente le solvant d'élution utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire. Après l'obtention de l'extrait méthanolique de la plante de *Lawsonia inermis*, le mélange est additionné à une quantité de gel de silice, évaporé à sec ce qui conduit à l'obtention d'une poudre solide qui est introduite délicatement dans la colonne puis fractionnée avec le gradient (toluène/acétate d'éthyle) de polarité croissante, l'élution doit être poursuivie jusqu'au méthanol pur. A chaque fois des fractions de 25 ml sont prélevées.
- ♦ Mais la deuxième plante *Punica granatum* Lest Nous avons utilisé un mélange méthanol seulement

Les fractions collectées sont soumises au contrôle chromatographique sur couche mince, puis révélées aux UV (254 et 365 nm) ce qui en permet de rassembler les fractions présentant des similitudes.

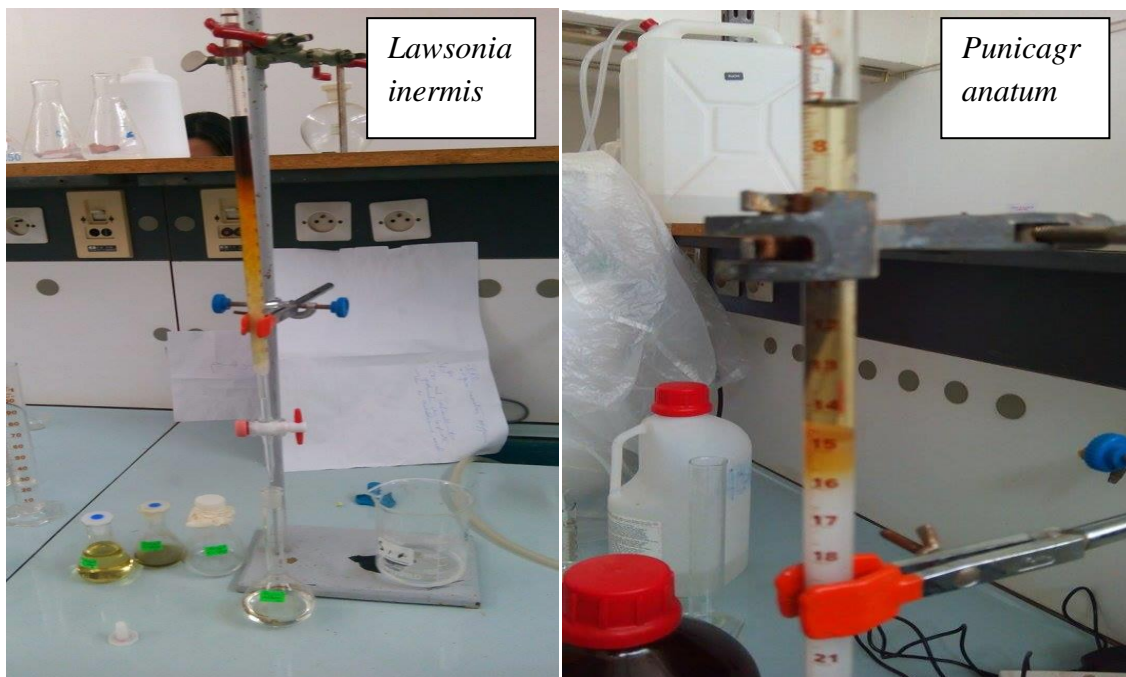


Figure 36 : photo Le début de la chromatographie sur colonne.

### VI. La séparation par CCM :

#### VI.1. Principe :

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

Chromatographie d'adsorption sur couche mince permet d'analyser l'avancement d'une réaction. (Erika Bourquet, 2008).

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, et chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse ce dernier est relié d'une part avec les forces électrostatiques retenant les composants sur la phase stationnaire et d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile(Kabouche, 2007).

### **VI.2. Protocole :**

**a-La phase stationnaire :** Utilisé les plaques commerciales (gelsilice60nm imprimé sur une plaque d'aluminium).

#### **b-La phase mobile :**

**b-1 Choix du solvant :** L'élution est commencée avec des solvants peu polaires puis pour suivie par des solvants plus polaires(Gwenola *etal*, 2011).

#### **b-2 Systèmes solvants essayés :**

S1: Acétate d'éthyle/ Méthanol / Eau (9: 0,75 : 0,25).

S2: Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle (8: 2).

S3: Hexane / Acétate d'éthyle (7: 3).

S4: Butanol / Acide acétique / Eau (4 : 1 : 5).

S5: Chloroforme / Méthanol (9 : 1).

#### **b-3 Systèmes choisis :**

S1: Acétate d'éthyle/ Méthanol / Eau (9: 0,75 : 0,25).

S2: Hexane / Acétate d'éthyle (7: 3).

#### **c-Dépôt d'échantillons:**

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

Le dépôt d'échantillons sur la plaque, il est conseillé de tracer une ligne droite parallèle au bord inférieur et d'y placer les marques des futurs dépôts, espacés d'un minimum de 0,5cm. Le dépôt doit être effectué de façon homogène à l'aide d'un capillaire sans creuser le support solide. (Erika *etal*, 2004)

### **d- Développement de la plaque :**

La plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant (éluant) qui en recouvre le front inférieur par capillarité. Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1cm de l'extrémité supérieure, la plaque retirée de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre. (Kabouche, 2007).



**Figure 37 : Développement de la plaque CCM**

### **E- Révélation :**

#### **E-1 Révélation par UV :**

La révélation des plaques se réalise sous une lampe UV à la longueur d'onde utilisée 254 et 360 nm .(Erik *etal*, 2008).

## **VII. Activités biologiques:**

### **VII.1 Activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique:**

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

Pour évaluer cette activité, nous avons opté l'activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique qui a été testé in-vitro par la méthode de diffusion sur gélose citée par (Celiktasetal,2007) et (Sacchetti *et al*,2005).

### **VII.1.1 Protocole expérimental:**

#### **a-Les souches de test:**

On a choisit de travailler sur 3 souches bactériennes qui sont :*Escherichia coli* sp ,*Staphylococcus aureus* sp, et *Bacillus cereus* sp , 3 souches sont procurées par laboratoire de microbiologie de faculté de science et de la vie **d'université-Constantine 1-** Constantine. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0.5 (106UFC/ml).

#### **b-Préparation des disques et puits :**

Des disques de papier Wattman n°1 de 6 mm de diamètre sont préparés par un appareil spécial puis stérilisé et les puits sont creusés dans la gélose grâce à une pipette pasteur stérile de 6mm de diamètre.

#### **c-Préparation des boîtes:**

La gélose **Muler-Hinton** stérile bouillie dans le bain-marie pendant environ 1h du temps ,après, la gélose coulé dans des boîtes de pétries dans un zone stérile par le Bec benzène jusqu'à une épaisseur de 4 à 5 mm puis laissées 1 heure pour la solidification

#### **d-Etalement des souches:**

L'étalement est réalisé à l'aide d'une pipette pasteur, Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche bactérienne.

#### **e-Dépôt des disques et l'introduction du principe actif dans les puits :**

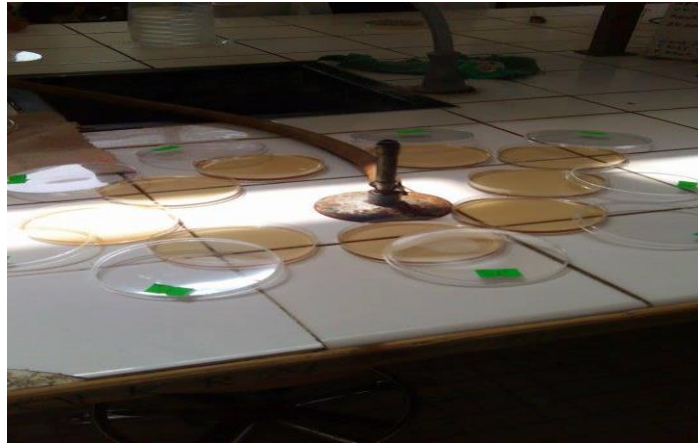
Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 0,5 ml de principe actif et dans le fond de chaque puits est déposé une goutte de même volume du principe actif, cette opération est réalisée auprès de bec benzène.

## Chapitre III : Matériel et méthodes

---

### f-Lecture des boîtes:

L'activité antibactérienne a été déterminée par mesurant à l'aide d'une règle de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imprégné par l'extrait de les deux plantes et les pailles ,déterminé par les différentes concentrations de l'extrait autour des disques et les puits.



**Figure 38** : réalisation de l'activité antimicrobienne

### VIII. Le pouvoir antioxydant :

Les extraits méthanoïques sont testées pour leur pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et pour évaluer l'activité antioxydant, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (**Lopes-Lutz et al., 2008**).

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

1-Nous avons prendre 0,05 g de chaque poudre d'extraits différentes *Punica granatum* *Lawsonia inermis* et *JUS* dans (PG)

dissoudre dans 10 ml d'eau distillée (solution mère), après nous avons préparés 5 concentrations différentes :

3 mg/ml : 3 ml de solution mère + 2 ml de MeOH.

## Chapitre III : Matériel et méthodes

---

-2 mg/ml : 2 ml de solution mère + 3ml de MeOH.

-1 mg/ml : 1 ml de solution mère + 4ml de MeOH.

-0,5 mg/ml : 0,5 ml de solution mère + 4,5 ml de MeOH.

### IX. Le pouvoir anti inflammatoire

#### IX.1.Matériel et méthodes

Notre étude consiste à étudier l'effet cicatrisant de partie aérien sec de *Lawsonia inermis* et l'écorce de fruit de *Punica granatum L* sèche in vivo sur les plaies des rats.

##### IX.1.1. Animaux

##### IX.1.1.1. Animaux et conditions d'hébergement

L'étude a été déroulée sur des rats femelles adultes (de poids entre 140 et 200 g), de souche *Albinos wistar* animaux a été entretenus dans des cages individuelles en polypropylène munies d'un porte-étiquette où est mentionné le nom du lot, pendant une période de 02 semaines avant l'essai afin de s'adapter à leur nouvel entourage et à leur nouvel environnement. Ils ont libre accès à la nourriture et à l'eau. La température de l'animalerie varie entre 18-25°C. l'éclairage et la ventilation étaient ceux du milieu ambiant. La litière utilisée est la sciure, elle est renouvelée chaque jour ou chaque deux jour pour tous les groupes de rats. On répartit les rats sur «4lots de un rat chacun (Tableau III).



Figure 39 : photo du rat *Albinowistar*

## Chapitre III : Matériel et méthodes

Tableau 7 : quatre (04) lots d'animaux répartis comme suit :

<b>Lots 1</b>	Les quatre plaies de Rat non traités (NT)
<b>Lot2</b>	Les quatre plaies de Rat traités par la vaseline (V)
<b>Lot3</b>	Les quatre plaies de Rat traités par (C)
<b>Lot4</b>	Les quatre plaies de Rat traités par (D)

les rats reçoivent le régime standard utilisé pour l'élevage. Ce régime est composé de Mais, Son, Remoulage, Soja, CMV (complément minéral vitaminé). Et provient de l'usine LA RATION, Bouzaréah, Alger.

### II.2. provocation des plaies

#### 1- Anesthésie les rats

Rats animale stressé

- a) *tranquillisation* : L'injection en intramusculaire de Acépromazine 3 mg/Kg
- b) *anesthésie fixe* : L'anesthésie en intra péritonéale

Kétamine → 20 à 30 mg/Kg Ip → DL50 : 60 mg/Kg IV.



- Cela signifie traction des rats

#### 2-Provocation des plaies

## *Chapitre III : Matériel et méthodes*

---

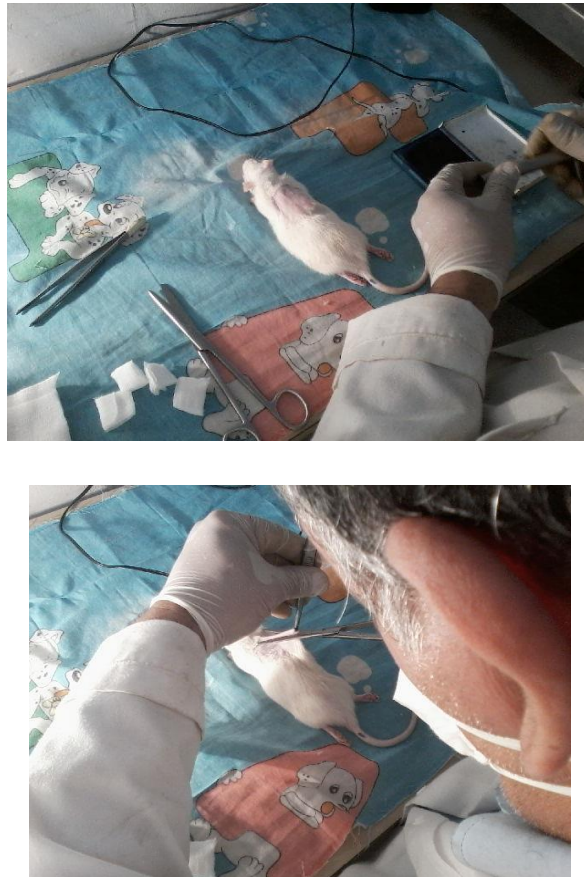
Une fois que les rats sont correctement anesthésiés, on rase le haut du dos manuellement à l'aide d'un rasoir pour assurer une blessure facile et bien clair que l'on peut diagnostiquer tout au long de l'essai.



**Figure 40 : Etapes montrent les appareils et les opérations de préparation des rats**

Après avoir nettoyée la partie rasée avec de l'alcool chirurgicale, sur lequel on va tracer quatre cercles pour chaque rat au niveau des omoplates afin d'obtenir des plaies homogènes.





**Figure 41 : Photos processus pour obtenir les plaies apparaissent homogènes**

On provoque une perte de substance pour les 4 groupes en coupant le pourtour des cercles avec des ciseaux stériles. Après provocation des plaies, ce jour est noté  $J_0$  et le traitement à base d'C et D (*Punica granatum* et *L.inermis*) sera quotidien pendant toute la durée de l'expérimentation. La surface des plaies est représentée sur une feuille transparente pour chaque groupe le  $J_0$ ,  $J_3$ ,  $J_6$ ,  $J_9$ ,  $J_{12}$  et  $J_{15}$  afin de pouvoir suivre l'évolution des plaies et les comparées par rapport au groupes traité et non traité. Pour mesurer les surfaces des plaies on a recours au logiciel AUTOCAD.



**Figure 42** : les différentes étapes de plaies et traitements

chapitre IV:  
Résultats  
et  
discussion

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

### I. Etude phytochimique :


#### I.1 Métabolites primaires :

##### I.1.1 Mise en évidence des glucides :

##### I.1.1.1 Mise en évidence des composées réductrices :

L'apparition de couleur rouge brique avec la liqueur de Fehling dans le jus de grenade (*P.granatum* L) indique la présence de composés réducteurs dans ce jus (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Résultats de mise en évidence des composées réducteurs.**

Espèce	Extrait et réactif	Jus de (grenade )	Photographiés des résultats
<i>Punicagranatum</i>	Extrait aqueux + Liqueur du Fehling	+++	

#### **Remarque :**

\_: test négatif To : Témoin

+ : test faiblement positif T1 : résultat

+ + : test moyennement positif

+ + + : test très positif


#### **I.1.2 Mise en évidence de l'amidon:**

Les tests phytochimiques ont montré que le jus de grenade est dépourvu de l'amidon (**Tableau 5**)

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---


**Tableau 5 : Résultat de mise en évidence d'amidon**

Espèce	Réactif	Jus de la grenade	Photographie des résultats
<i>Punica granatum L.</i>	Iugol	--	

### I.1.3 Mise en évidence des lipides :

L'émergence des deux premières couches de couleur rouge et à la seconde couche de graisse, dans le jus de la grenade signalent la présence des lipides (**Tableau 6**)

**Tableau 6 : Résultats de mise en évidence des lipides**


Espèce	L'extrait et réactif	Jus de la grenade	Photographié des résultats
<i>Punica granatum</i>	Soudan III	+++	

### I.1.4 Mise en évidence de la protéine

Garder quelques gouttes de NaOH + gouter quelques gouttes à partir de CuSO<sub>4</sub>, dans le (**tableau 7**), et le résultat est la suivante.

## Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 7 : Résultats de mise en évidence la protéine

Espèce	L'extrait et réactif	Jus de la grenade	Photographié des résultats
<i>Punica granatum</i>	solution aqueux + NaOH +  CuSO4	+++	

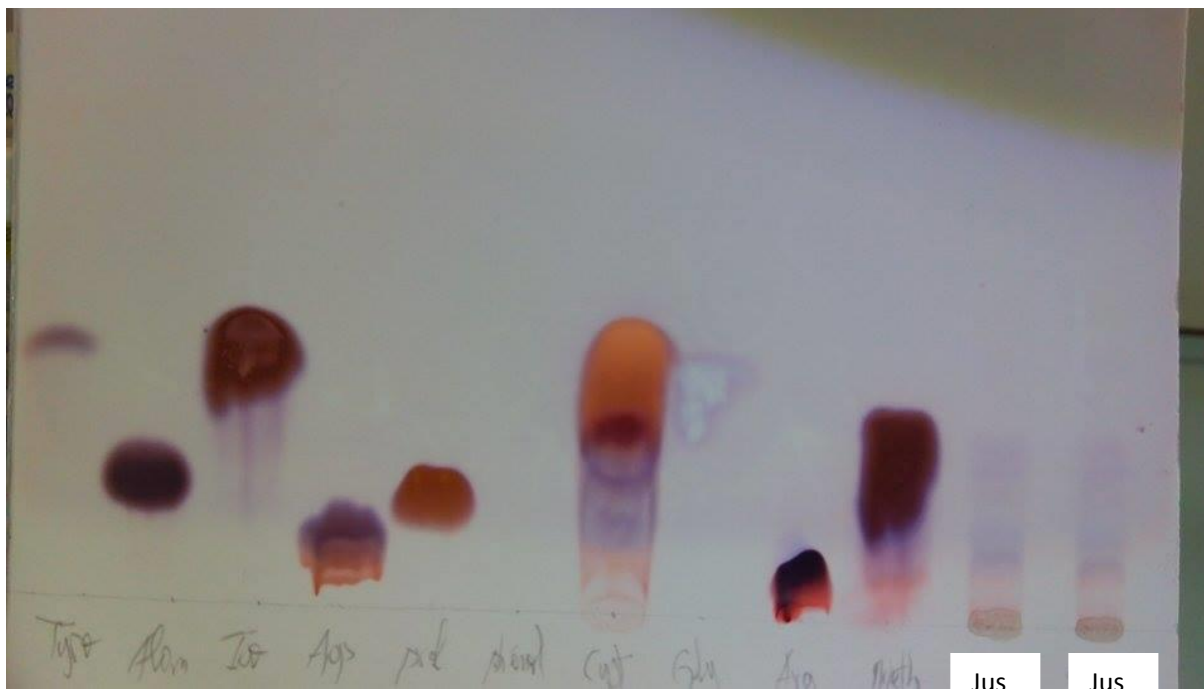
### I.1.5 Détection des acides aminés par CCM :

Selon l'étude analytique par CCM le jus de grenade d'Algérie contient trois acides aminés qui sont la Proline, Méthionine, Valine, Aspartique. Par contre

Tableau 8 : Résultats de criblage des acides aminés

Espèce	Extrait et organe	Pro	Asp	Cys	Asn	Tyr	Met	Gly	Ile	Arg	Prg
<i>Punica granatum</i>	Jus de la grenade	+++	+++				+++				

## Chapitre IV : Résultats et discussion


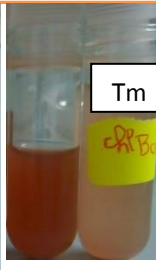
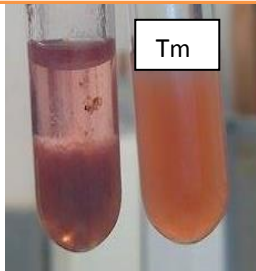
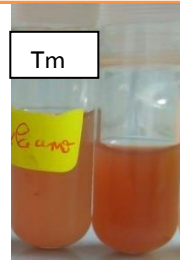
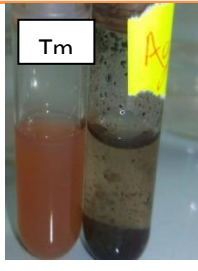


**Figure 42: PlaqueCCM des acides aminés après révélation par ninhydrine**

Lansky et al. (2007) ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans la grenade de France, il y a la valine, proline et méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g de proportion comestible selon le codex alimentarius en 2009.

### I.2 Criblage des sels minéraux

Le tableau.9 :montre les types de sels minéraux existant dans leJus de la grenade

Espèce	Photographie des résultats	Photographie des résultats				
		potassium	chlorures	Calcium	sulfates	Fer
<i>Punica granatum</i>	Jus de la grenade					
		+++	+++	+++	+++	+++

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### I.3 Métabolites secondaires :





#### I.3.1 Criblage des Flavonoïdes:

Les résultats des tests phytochimiques, qui ont été mené sur chacun des organes de la plante de grenade (tige, feuille, fleur, écorce, Jus) et les organes de henné (tige, feuille, fleur, graine) sont indiqués dans le (tableau 10) :

**Tableau 10 : Résultats de criblage des Flavonoïdes (HCl + Mg)**

Espèce	Extrait et réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait méthanolique HCl + Mg	+++	+++	++	+++
Espèce	Extrait et réactif	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait méthanolique HCL + Mg	+++	+++	+++	+++


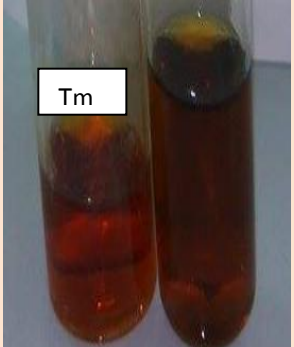
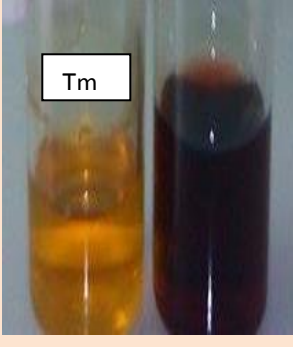
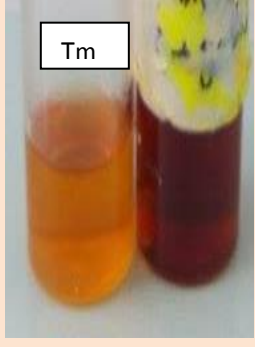
**Tableau 11 : Photographie de criblage des Flavonoïdes du *Punica granatum* L**

Réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
HCl + Mg				



## Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 12 : Photographie de criblage des Flavonoïdes du *Lawsonia inermis*

Réactif	fleur	feuille	Tige	graine
HCl + Mg				

Montrent que *P.granatum* et *Lawsonia inermis*L sont riches en flavonoïdes. Les études menaient par **Sarita (1991)** et **(Gupta et al,1992)**révèle aussi que la plante du henné contientdes flavonoïdes. Kim et coll. (2002) ont trouvé des flavonoïdesdans les feuilles du **grenadier**.

### I.3.2 Criblage d'Anthraquinones:

Le réactif KOHutilisé pour la détection des anthraquinones a démontré que tous les organes de grenade et hennécontiennent ces métabolites secondaires (**letableau13**).

Tableau 13 :Résultats de criblage des Anthraquinonesdu *Punica granatum* L et*Lawsonia inermis*.

Espèce	Extrait et réactif	Ecorce	feuille	tige	
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait chloroformique + KOH	+++	+++	+++	
Espèce	Extrait et réactif	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait chloroformique +KOH	+	+++	++	+++

## Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 14 : Photographie de criblage des anthraquinones du *Punica granatum L*

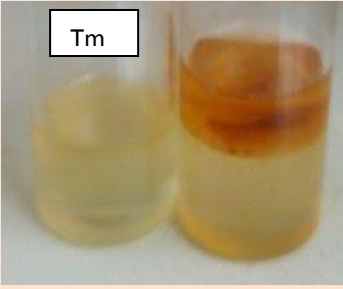
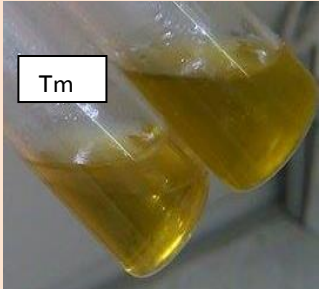


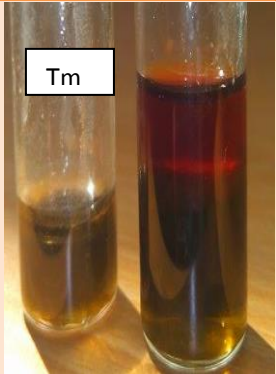
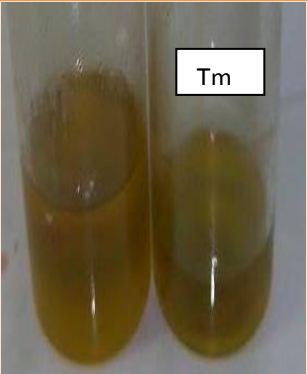
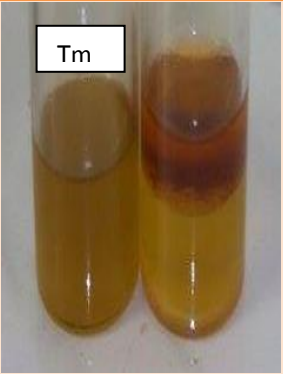
Réactif	Ecorce	feuille	tige
KOH			

Tableau 15 : Photographie de criblage des anthraquinones du *Lawsonia inermis*

Réactif	fleur	feuille	tige	graine
KOH				

### I.3.3 Criblage des Quinones:

Le criblage phytochimique des Quinones de plantes *Punica granatum* et *Lawsonia inermis* et les résultats sont résumés dans le (tableau16) :

Tableau 16 : Résultats de criblage des Quinones du *Punica granatum* et *Lawsonia inermis*

Espèce	Extrait et réactif	Ecorce	fleur	feuille	tige
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait éthérique +NaOH	+++	+++	++	+

Espèce	Extrait et réactif	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait éthérique+NaOH	+++	+++	++	+++

## Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 17 : Photographie de criblage des Quinones du *Punica granatum* L

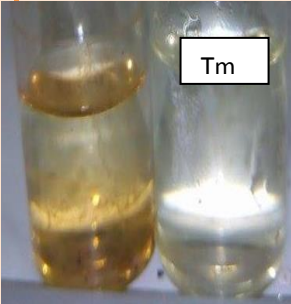
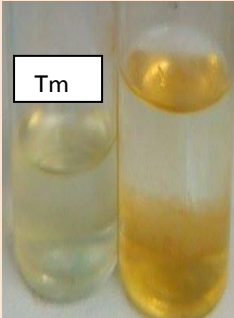
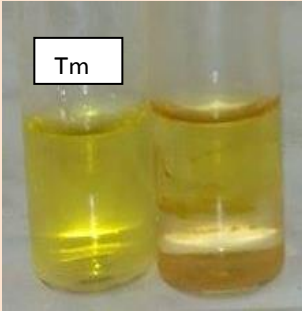
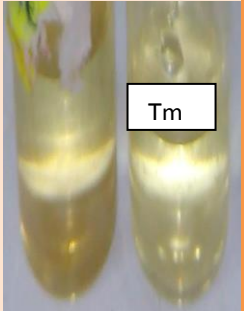
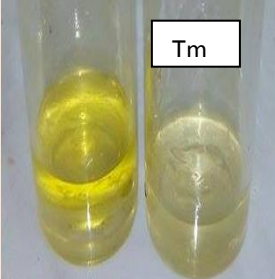


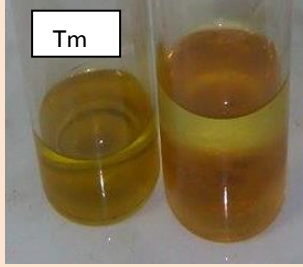
Réactif	Ecorce	fleur	feuille	tige
NaOH				

Tableau 18 : Photographie de criblage des Quinones du *Lawsonia inermis*

Réactif	fleur	feuille	tige	graine
NaOH				

Nos résultats montrent que *Lawsonia inermis* est plus riche en quinones que *Punica granatum* L. Les études menées par (Wichtl, 1999) ont montré que les principaux composants sont de type 1,4-naphtoquinone, représentés principalement par la 2-hydroxy-1 naphtoquinone appelé couramment la Lawsone ce qui va en accord avec nos résultats. D'autre part (Shivananda Nayak *et al*, 2007) a évoqué que les composants responsables des propriétés colorantes dans la plante *L.inermis* appartiennent à la famille des quinones.

## Chapitre IV : Résultats et discussion





### I.3.4 Criblage de d'Anthocyanes:

Le criblage phytochimique a montré quela grenade est plus riche en quantités d'anthocyanes que le henné (**tableau 19**) :

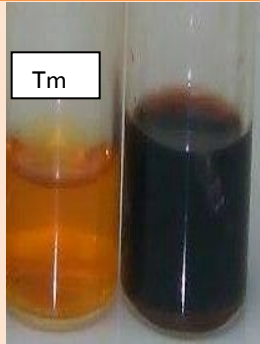



**Tableau 19 : Résultats de criblage des Anthocyanes (HCl concentré +bain marie)**

Espèce	Extrait et réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait méthanolique HCl concentré +bain marie	+++	+++	+++	+++
Espèce	Extrait et réactif	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait méthanolique HCL concentré + bain marie	+++	+++	++	+++

**Tableau 20 : Photographie de criblage des Anthocyanes du *Lawsonia inermis***

Réactif	fleur	feuille	tige	graine
HCl concentré +bain marie				

**Tableau 21 : Photographie de criblage des Anthocyanes du *Punica granatum L***

Réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
HCl concentré +bain marie				

## Chapitre IV : Résultats et discussion











Nos résultats sont en accord avec ceux rapporté par (Lansky et Newman, 2007) et qui ont cité la présence de cyanidin, Cyanidin 3-Oglucoside, Cyanidin 3.5- di-O-glucoside, Delphinidin 3- O-glucoside, Pelargonidin 3- O—glucoside.

### I.3.5 Criblage des Tanins:

Tableau 22 :Résultats de criblage des Tanins du *Punica granatum* Let *Lawsoniainermis*.

Espèce	Extrait	réactif	Ecorce	fleur	feuille	tige	Jus
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait méthanolique	Fe Cl <sub>3</sub>	+++	+++	+++	+++	+++
		Gélatine	+++	+++	++	+++	+
		Gélatine+ Salé	+++	+++	+	+++	+
Espèce	Extrait	réactif	fleur	feuille	tige	graine	
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait méthanolique	Fe Cl <sub>3</sub>	+++	+++	+++	+++	
		Gélatine	++	++	+++	+++	
		Gélatine+ Salé	+	++	+++	+++	

Tableau 23 : Photographie de criblage des Tanins du *Punica granatum* L

Réactif	Ecorce	fleur	feuille	tige	Jus
Témoin					
Fe Cl <sub>3</sub>					

## Chapitre IV : Résultats et discussion


















Gélatine					
Gélatin e+ Salé		\			

Tableau 24 : Photographie de criblage des Tanins du *Lawsonia inermis*

Réactif	fleur	feuille	tige	graine
Témoin				
Fe Cl <sub>3</sub>				

## Chapitre IV : Résultats et discussion



Les réactifs spécifiques des tanins ont révélé que les deux espèces *Punica granatum* L. et *Lawsonia inermis* sont riches en tanins comme a été rapporté pour la grenade par (Squillaci and Di Maggio, 1946). Pour le henné (Sarita, 1991) a précisé que les feuilles de cette espèce contiennent (7 à 8 %) ou (5 à 10 %) tanins principalement l'acide gallique (Cowan, 1999 ; Wichtl, 1999).

### I.3.6 Criblage des Alcaloïdes:

Tableau 25 : Résultats de criblage des Alcaloïdes

Espèce	Extrait et réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait méthanolique + Réactif Mayer	+++	+++	++	+++
Espèce	Extrait et réactif	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait méthanolique + Réactif Mayer	+++	+++	+++	+++

## Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau 26 : Photographie de criblage des Alcaloïdes du *Punica granatum* L


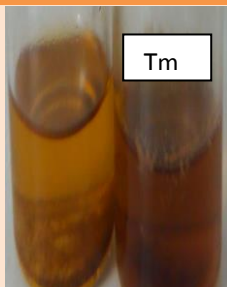
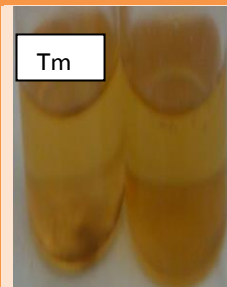
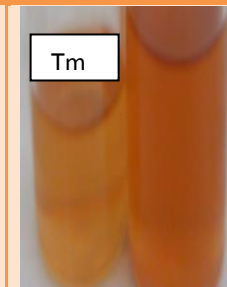
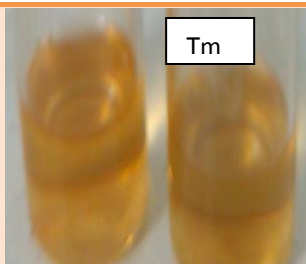
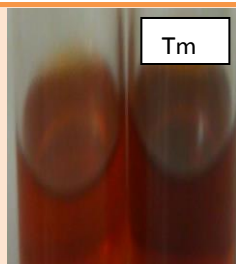
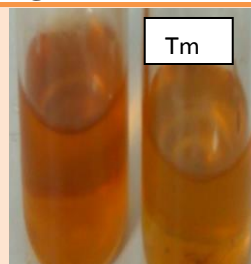
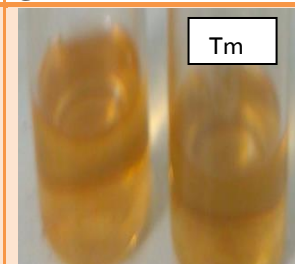
Réactif	Ecorce	feuille	tige	Jus
Réactif Mayer				

Tableau 27 : Photographie de criblage des Alcaloïdes du *Lawsonia inermis*

Réactif	fleur	feuille	tige	graine
Réactif Mayer				

Les tests de détection des alcaloïdes dans les 2 plantes *Punica granatum* L. et *Lawsonia inermis* a permis d'identifier la présence de quantités considérables de ces métabolites secondaires dans tous les organes étudiés de ces espèces. Par ailleurs c'est en 1878 qu'un pharmacien français, **Charles Tanret**, découvre des alcaloïdes dans cette écorce, dont le principal qu'il appelle pelletièreine, et 3 autres, qu'il nomme iso pelletièreine, pseudo pelletièreine et méthyl pelletièreine. Le nom de pelletièreine fut choisi en l'honneur du célèbre pharmacien et chimiste français, **Joseph Pelletier (1788-1842)**, à l'origine de la découverte de la quinine et de la strychnine. Ces alcaloïdes représentent environ 0,70% de l'écorce de racine du grenadier. (Paris).

### I.3.7 Criblage des saponosides :

Tableau 28 : Résultats de criblage des saponosides

Espèce	TSET	Ecorce	fleur	feuille	tige	Jus
<i>Punica granatum</i>	Matériel végétal + Eau distillé	–	–	–	–	–



## Chapitre IV : Résultats et discussion

Espèce	TSET	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Matériel végétal + Eau distillé	–	–	–	–

Tableau 29 : Photographie de criblage des saponosides du *Punica granatum L*








TSET	Ecorce	feuille	tige
Matériel végétal + Eau distillé			

Tableau 30 : Photographie de criblage des saponosides du *Lawsonia inermis*

TSET	fleur	feuille	tige	graine
Matériel végétal + Eau distillé				

\*Et il en déduire le manque saponosides dans les deux usines grenade et henné

### I.3.8 Criblage des triterpènes et stéroïdes:












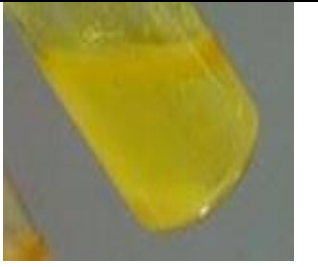
Tableau 31 : Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes du *Punica granatum* et *Lawsonia inermis*.

Espèce	Extrait	réactif	Ecorce	feuille	tige
<i>Punica granatum</i>	Test : Extrait méthanolique	H2SO4 CONC.	+++	+++	+++

## Chapitre IV : Résultats et discussion

		5 gouttes H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	++	+++		
		Gélatine+ Salé	++	++	+++		
Espèce	Extrait	réactif	Plante	fleur	feuille	tige	graine
<i>Lawsonia inermis</i>	Test : Extrait méthanolique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CONC.	+++	+++	+++	+++	+++
		5 gouttes H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	++	+++	+	++
		a. picrique	++	+++	+++	+	+++





















Tableau 32 : Photographie de criblage des triterpènes et stéroïdes du *Punica granatum* L

Réactif	Ecorce	feuille	tige
Témoin			
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CONC.			
5 gouttes H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
a. picrique			

## Chapitre IV : Résultats et discussion

--	--	--	--

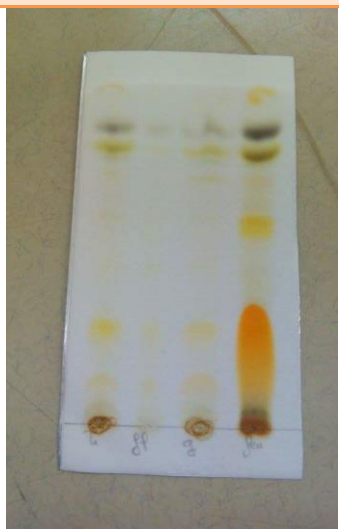

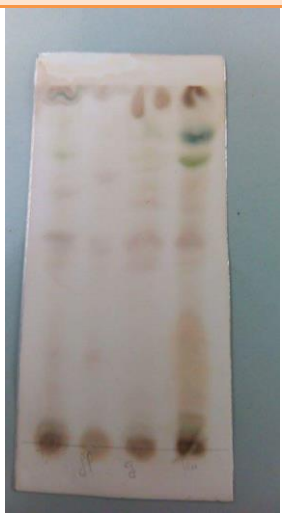



Tableau 33 : Photographie de criblage des triterpènes et stéroïdes du *Lawsonia inermis*

Réactif	Plante	fleur	feuille	tige	graine
<b>Témoin</b>					
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> CONC.</b>					
<b>5 gouttes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>					
<b>a. picrique</b>					

Les réactifs spécifiques de la détection des stéroïdes ont montré que tous les organes de *Punica granatum* L. (Ecorce, feuille, tige,) et *Lawsonia inermis* (Fleurs, feuille, tige, graine) sont riches en stéroïdes. D'autre part ces deux espèces contiennent des quantités différentes en stéroïdes, en triterpènes et en stéroïdes lactoniques.

### I.3.9 Criblage des coumarines :

Tableau 34 : photographie de détection des coumarines

	NATURELE	UV 366 nm	Révélation par acide
Espèce	Photographie du résultat 1	Photographie du résultat 2	Photographie du résultat 3
<i>Lawsonia inermis</i>			
<i>Punica granatum</i>			

L'étude analytique des extraits chloroformiques des différents organes par CCM en utilisant le système suivant (Toluène : acétate à proportion 36 :14 ) et visualisée sous UV 366 nm, montre que presque toutes les organes de *P. granatum* et *L. inermis* sont riche en coumarines

## *Chapitre IV : Résultats et discussion*

---

Il a été rapporté que l'extrait chloroformique des feuilles de la plante du henné contient l'acide para-coumarique (Botros *et al*, 2004), des coumarines (SCCP., 2005) principalement la 7,7-diacétoxy coumarine (Bhardwaj *et al*, 1976).

D'après (Sarita (1991), les feuilles de henné contiennent des Xanthonés et des Coumarines.

Il a été rapporté aussi que le grenadier est pourvu de principaux composés phénoliques tels que l'acide p-coumarique aux niveaux de différents organes (Lansky and Newman, 2007).

### **I.4 la détermination du PH :**

Nous avons mesuré le pH de jus de grenade et avons constaté que sa valeur est acide (PH=4,5).



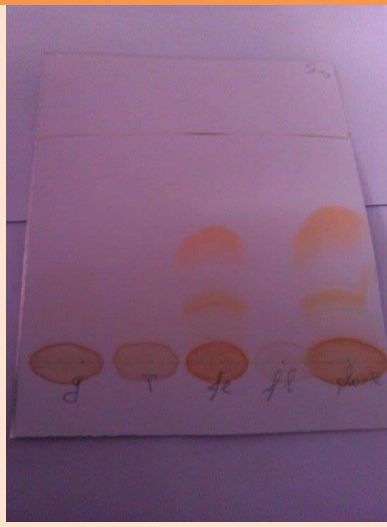

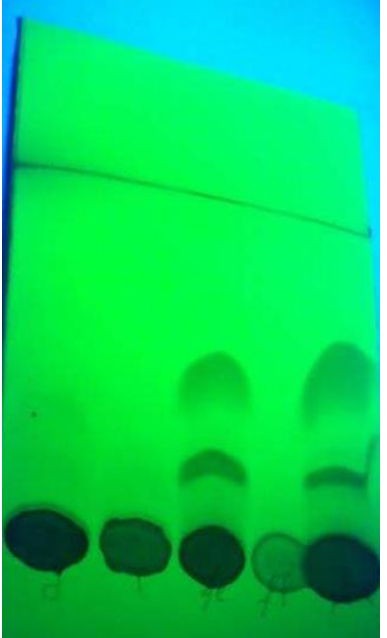
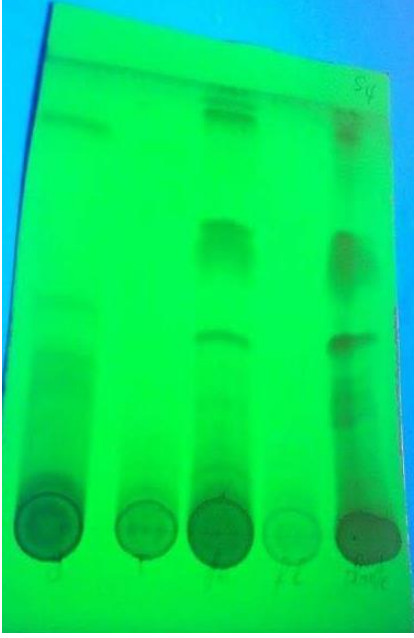
**Figure 43 :Photo décrit comment mesurer le PH par le PH mètre**

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### I.5 Chromathographie sur couche mince :

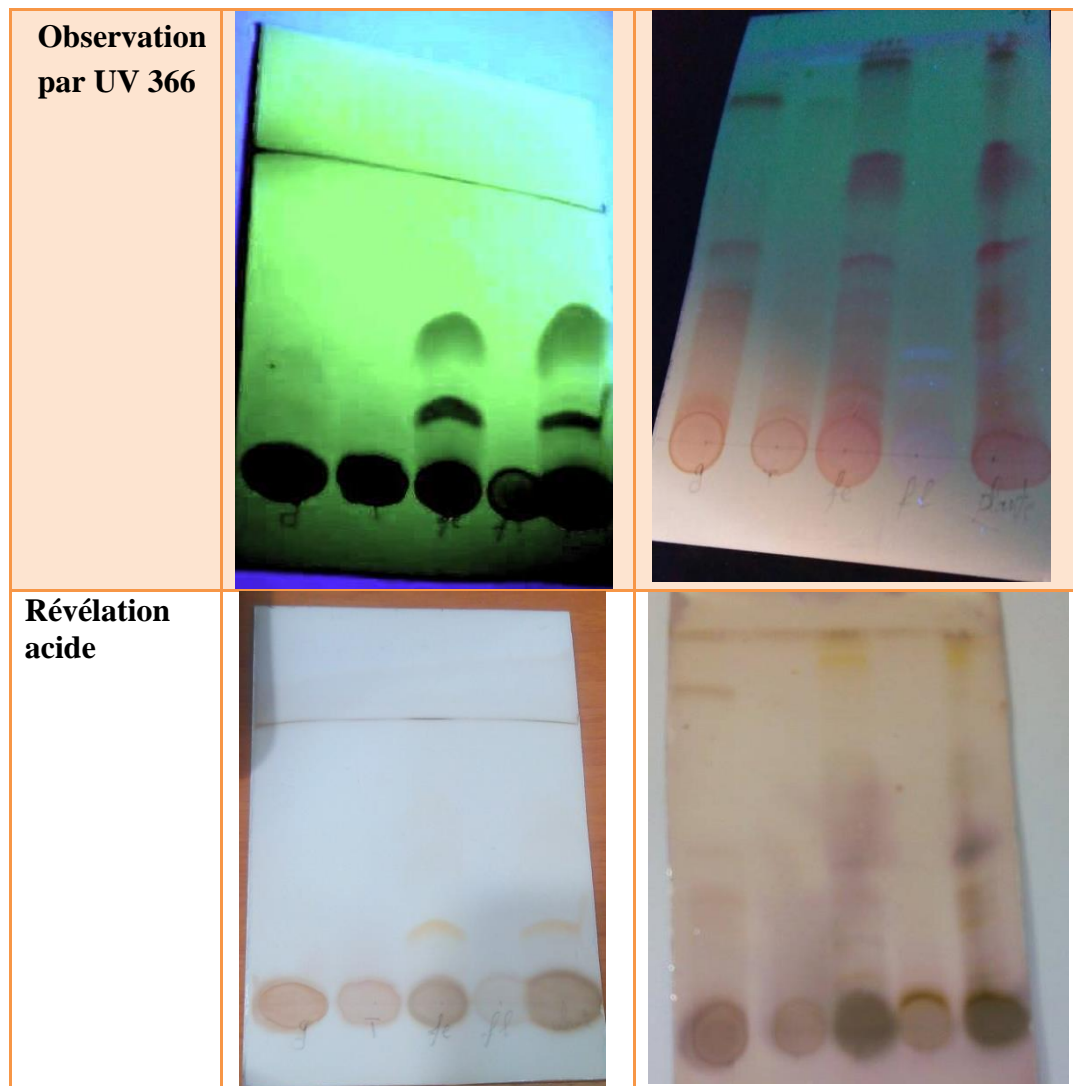
#### I.5.1 CCM *Lawsonia inermis*

Tableau 35 : photographie de CCM D'extrait méthanolique.

Système	S1(hexane.acetate)	S2(Acetate.MeOH.H2O)
NATURALE		
Observation par UV 254		

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---




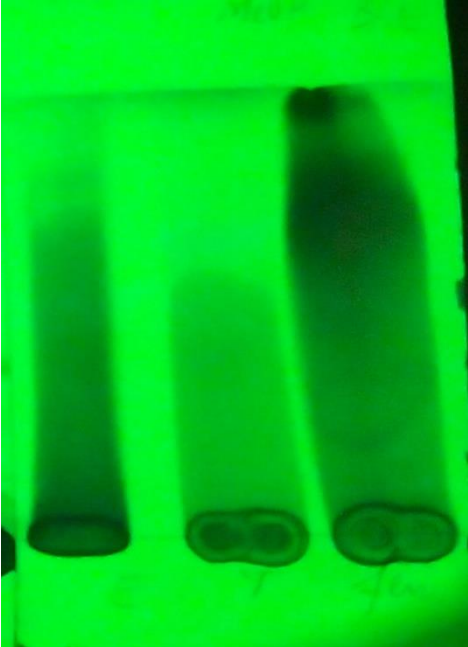


L'étude analytique des extraits méthanolique par CCM d'EMLI, en utilisant les systèmes suivants (sur Photographies) et visualisée sous UV 254 et 366 nm, montre que presque tous les organes de *Lawsonia inermis* sont très riche en métabolites secondaire surtout composés phénoliques et terpènes ce qui confirme les résultats obtenus par les criblages précédents.

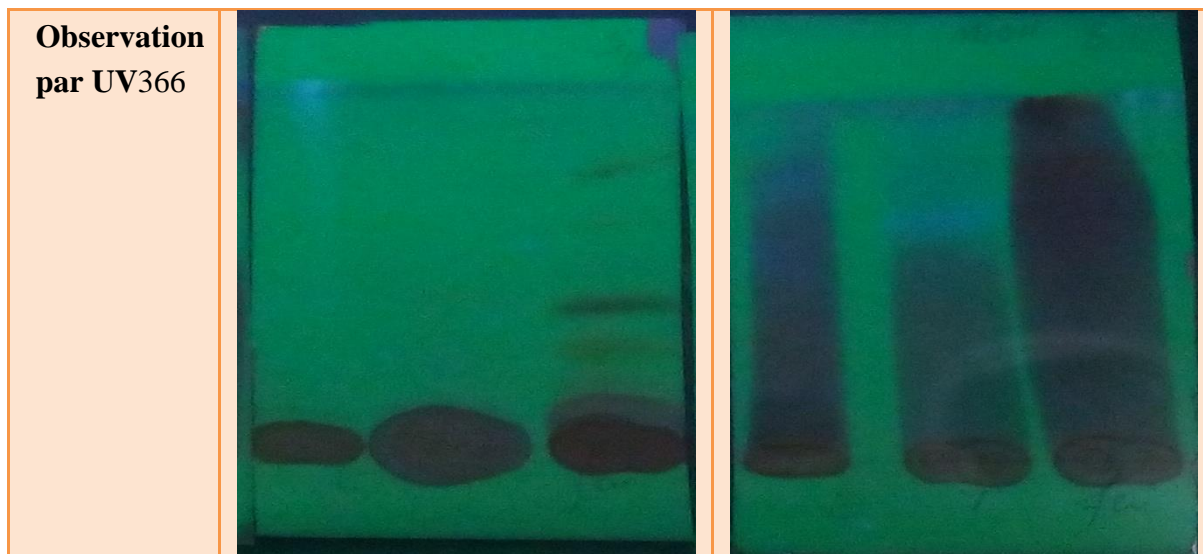
## Chapitre IV : Résultats et discussion

### I.5.2 CCM par *Punica granatum L*

Tableau 36 : photographie de CCM D'extrait méthanolique.

Système	S1 (hexane. Acétate)	S2(Acetate.MeOH.H2O)
NATURALE		
Observation par UV 254		





L'étude analytique des extraits méthanolique par CCM d'EMPG, en utilisant les systèmes suivants (sur photographies) visualisée avec UV : 254 et 366 nm, montre que presque toutes les organes de *Punica granatum* L sont très riche en métabolites secondaire surtout flavonoïdes et terpènes ce qui confirme les résultats obtenue par les criblages précédent.

### II. Extraction des flavonoïdes :

L'extraction des parties aériennes de *Punica granatum* L et *Lawsonia inermis*. Est faite par macération dans le mélange méthanol / eau (70/ 30 : v/v) et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

**Phase éther de pétrole** : obtenue après affrontement par l'éther de pétrole mais elle est éliminée car elle ne contient que des matières grasses, des chlorophylles, et des impuretés.

**Phase chloroforme** : obtenue après affrontement par chloroforme avec la phase aqueuse.

**Phase acétate d'éthyle** : obtenue après affrontement par l'acétate d'éthyle, avec la phase aqueuse ce qui a permis d'extraire les flavonoïdes, en entraînant les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides (**Benkiki, 2006**)

**Phase n- butanol** : obtenue après affrontement par butanol avec la phase aqueuse.

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### Chromatographie analytique sur couche mince :

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm Les

Différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavones et des flavonols.

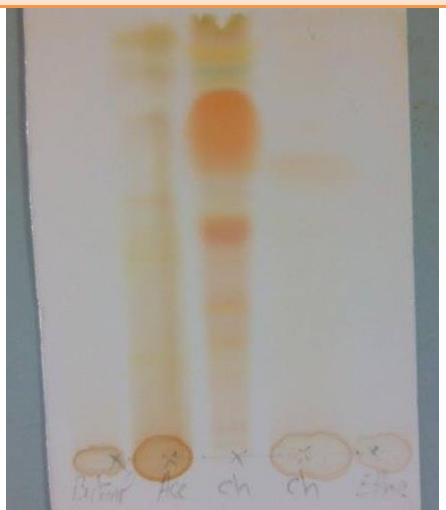

**Tableau 37 : Comportement chromatographique des phases de *Punica granatum L* et *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice dans le système solvant**

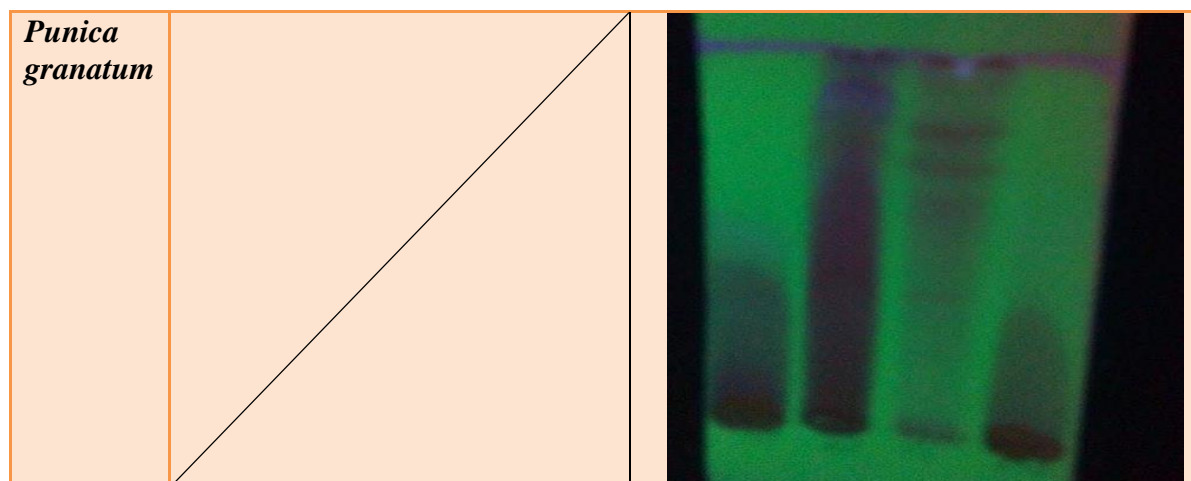
<i>Punica granatum L</i>							
Phase éther de pétrole		Phase chloroforme		Phase acétate d'éthyle		Phase butanol	
Spot coloré Sous UV à 365nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
Marron claire	0.14	Marron	0.71	Marron	0.99	Orange	0.04
		Marron	0.86	Marron	1	Marron	0.14
<i>Lawsonia inermis</i>							
Phase éther de pétrole		Phase chloroforme		Phase acétate d'éthyle		Phase butanol	
Spot coloré Sous UV à 365nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf

## Chapitre IV : Résultats et discussion

-	-	Marron claire	0.14	Marron claire	0.21	Marron claire	0.014
-	-	Marron	0.42	Marron claire	0.29	-	-
-	-	Marron	0.57	Maron claire	0.43	-	-
-	-	Marron	0.71	Orange	0.57	-	-
-	-	Marron claire	0.81	Marron claire	0.98	-	-

Tableau 38 : Comportement chromatographique des phases de *Punica granatum* et *Lawsonia inermis* sur plaque de gel de silice par UV 365 nm

	Natural	UV 365nm
Espèce	Photographie du résultat	
<i>Lawsonia inermis</i>		



### III. Dosage des polyphénols :

Les taux de polyphénols totaux existants dans les extraits méthanoliques (EMPG) et (EMLI) et jus de grenade calculés sont présentés dans le (**tableau 39**). Il apparait que les quantités des composés phénoliques totaux dans EMPG et le jus de grenade ( $435 \pm 8,8$ ); ( $178,44 \pm 22,6$ ) respectivement sont plus riches que celle de *L. inermis* ( $155,64 \pm 3,4$ ). Nous pouvons conclure que l'extrait de *Lawsonia inermis* est moins riche en polyphénols

**Tableau 39 :Taux de polyphénols existant dans les extraits EMPG et EMLI et (Jus).**

Echantillon dosé	Taux de polyphénols
	Mg /EAG/ gms
<b>EMPG</b>	<b><math>435 \pm 8,8</math></b>
<b>EMLI</b>	<b><math>155,64 \pm 3,4</math></b>
<b>JUS</b>	<b><math>178,44 \pm 22,6</math></b>

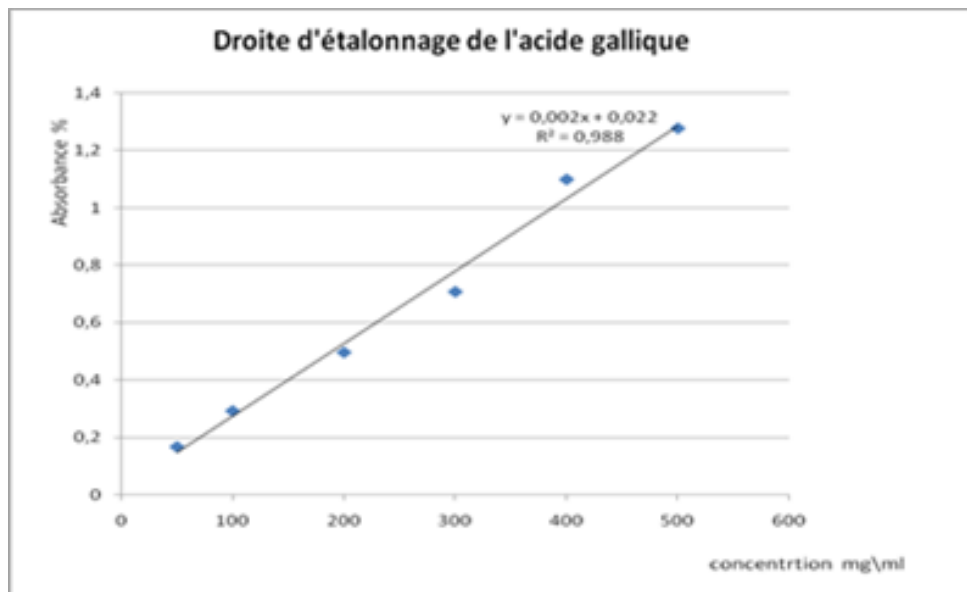


Figure 44 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

#### IV. Chromatographie analytique sur colonne :

La technique de chromatographie sur colonne de gel de silice (CC) est utilisée pour isoler des métabolites secondaires des extraits méthanoliques *Lawsonia inermis* et *Punica granatum L*, le contrôle de ces fractions sur des plaques CCM de gel de silice nous a permis de sélectionner des fractions obtenues à fin de continuer la séparation.

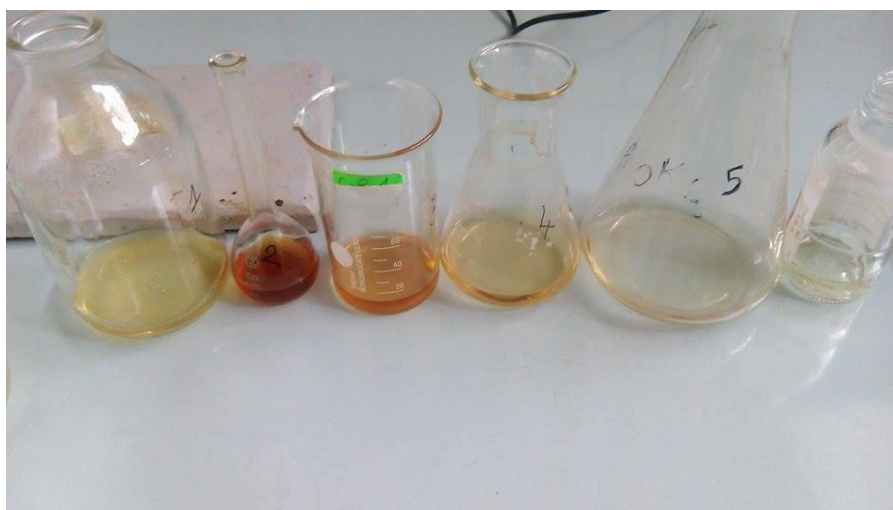


Figure 45 : photo de fractions obtenues de Chromatographie sur colonne *Punica granatum L*



**Figure 46 : photo de fractions obtenues de Chromatographie sur colonne Lawsonia inermis**


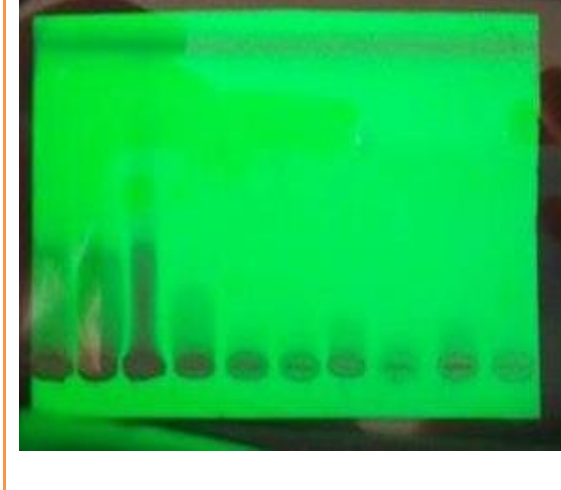
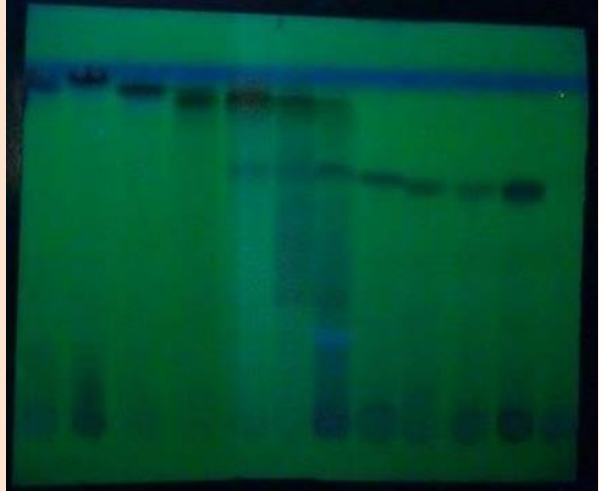
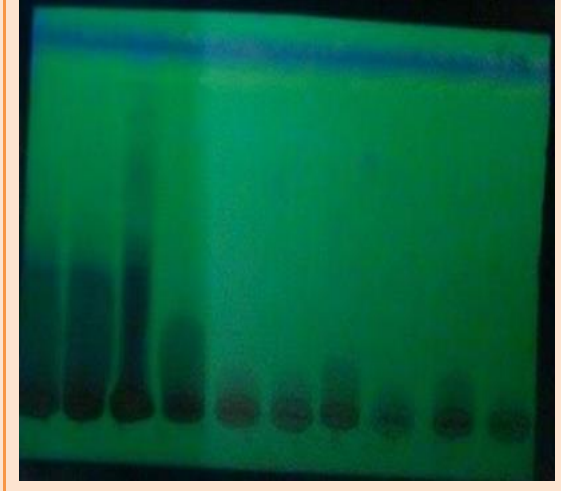
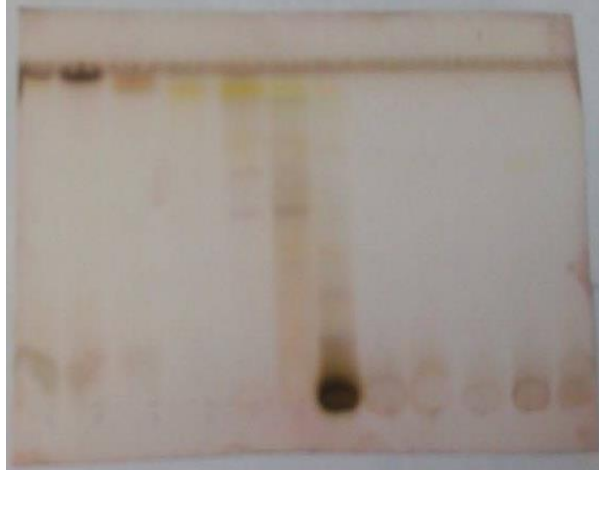
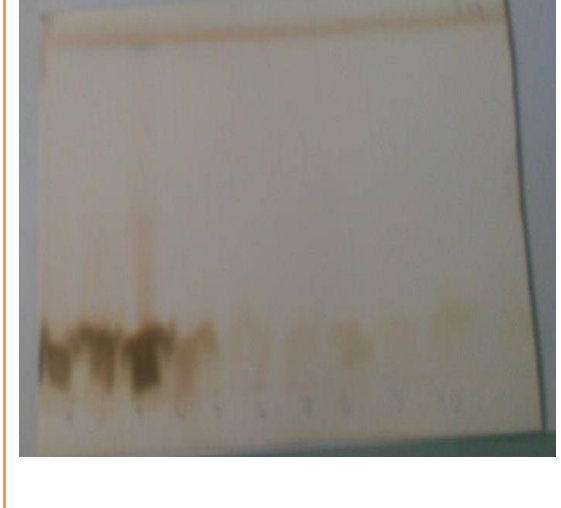
### V. Chromatographie analytique sur couche mince :

**Tableau 40 :** Le mode d'obtention des différentes fractions isolées de Lawsonia inermis et Punica granatum L, leurs fluorescences sous UV à 365nm

Espèce	<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Punica granatum L</i>
Naturel		

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

<b>Observation par UV 254</b>		
<b>Observation par UV 366</b>		
<b>Révélation</b>		

L'étude analytique par CCM des fractions obtenues par CCM révèle que des fractions semblables, et contiennent des spots de flavonoïdes et terpènes.

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

### VI. Activité antioxydant :

Tableau 41 : Le pourcentage d'inhibition d'EMLI et EMPG et Jus (de la grenade)

Espèce	<i>Lawsonia inermis</i>	<i>Punica granatum</i> L	jus de la grenade
S1 (3mlSM +2mlMOOH)	95,74%	94,08%	94,82%
S2 (2mlSM +3mlMOOH)	94,36%	91,58%	93,71%
S3 (1mlSM +4mlMOOH)	39,18%	88,53%	89,92%
S4 (1mlS3 +1mlMOOH)	30,12%	78,37%	21,84%
S5 (1mlS4 +2mlMOOH)	15,06%	41,58%	18,48%

$$\frac{AB-AE}{AB} = \%$$

AB



## Chapitre IV : Résultats et discussion

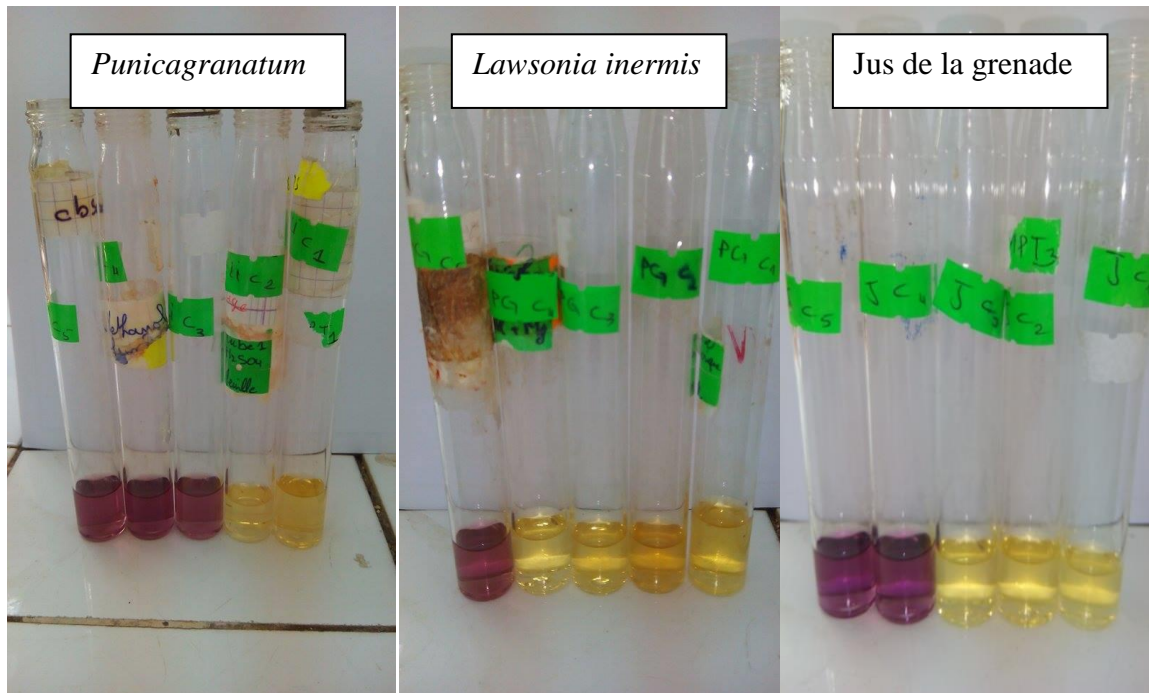


Figure 47 : photo du résultat antioxydant (*Lawsonia inermis* et *Punica granatum* et jus de la grenade)

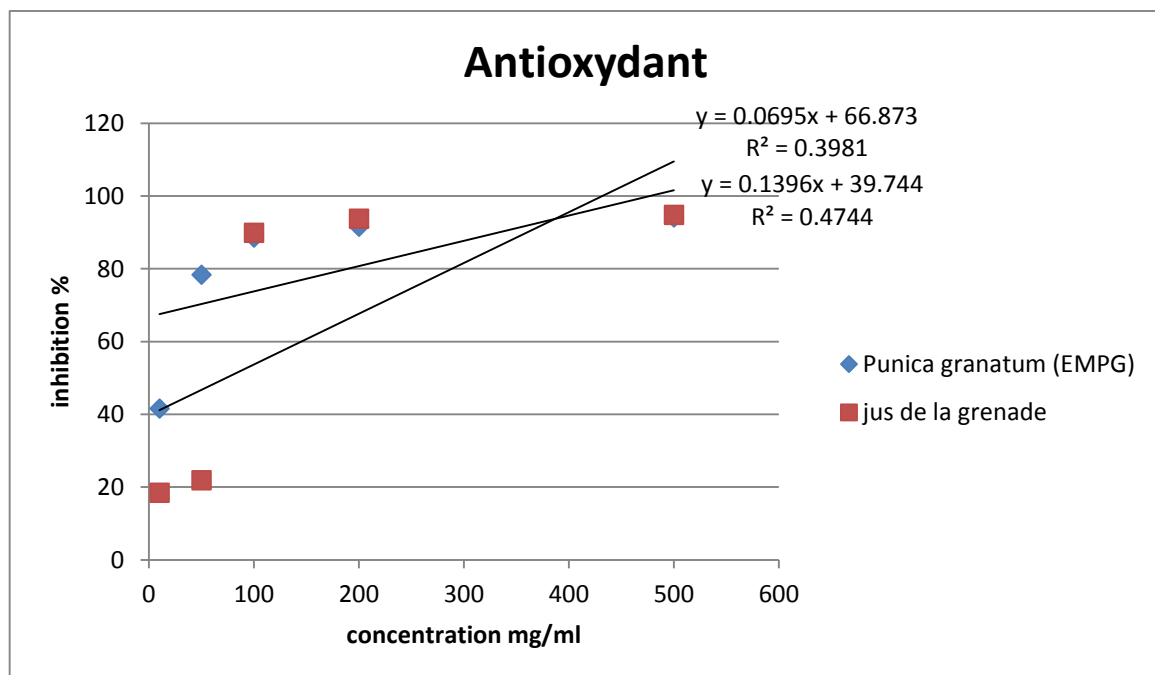


Figure 48 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des extraits d'écorce l'EMPG et jus de la grenade (*Punica granatum*) concentration

\*Concentration inhibition 50% (CI) : jus de la grenade

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

$$y = 0.139x + 39.74$$

Alors pour  $y = 50\%$ , l'IC50 sera comme suit :

$$50 = 0.139x + 39.74$$

$$\text{Donc : } x = (50 - 0.139) / 39.74 = 1.25468 \text{ mg/ml}$$

Donc : IC 50 = **1254.68  $\mu\text{g/ml}$** .

**\*Concentration inhibition 50% (CI) : EMPG**

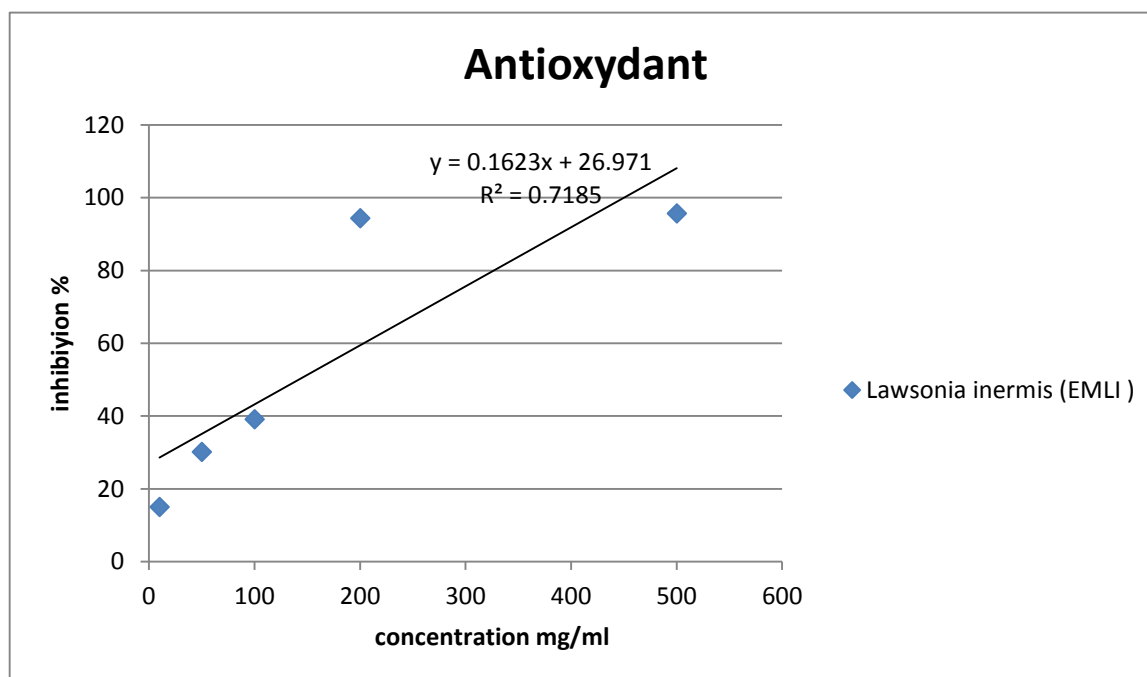
$$y = 0.069x + 66.84$$

Alors pour  $y = 50\%$ , l'IC50 sera comme suit :

$$50 = 0.069x + 66.84$$

$$\text{Donc : } x = (50 - 0.069) / 66.84 = 0.74702 \text{ mg/ml}$$

Donc : IC 50 = **747.02  $\mu\text{g/ml}$**



**Figure 49** : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des EMLI (*Lawsonia inermis*)

**\*Concentration inhibition 50% (CI) :**

$$y = 0.162x + 26,97$$

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

Alors pour  $y = 50\%$ , l'IC50 sera comme suit :

$$50 = 0.162x + 26.97$$

$$\text{Donc : } x = (50 - 0.162) / 26.97 = 1.84905 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Donc : IC } 50 = \mathbf{1849.05 \text{ } \mu\text{g/ml}}$$

Ces résultats montrent un meilleur effet antioxydant de l'EMLI, car environ 95,74 % du DPPH sont inhibés à une concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$  et que le Jus de la grenade et l'EMPG (l'écorce) dans la même famille a aussi un effet antioxydant fort puisque environ 94,08 % et 94,71 DPPH sont piégés par la même concentration, et Comparativement.

Bonne activité antioxydant. Si on compare, les valeurs des polyphénols totaux des extraits EMPG, il apparaît que celui qui est moins riche en polyphénols est le plus antioxydant. Ceci peut être expliqué par la présence d'autres métabolites dans l'extrait qui augmentent son activité antioxydant comme les d'Anthocyanes et anthraquinones et les tanins et aux sels minéraux.

Et la valeur de l'EMLI (*Lawsonia inermis*) plus grand jus de grenade et de l'EMPG (Ecorce) (*Punicagranatum L.*).




## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

### VII. Les activités biologiques :

#### VII.1 activités antibactériennes :

Tableau42 : Activité antibactérienne d'extrait méthanolique de l'écorce de la plante *Punicagranatum L.*




Souches	Zone d'inhibition (disques) mm	Photographie <i>Punicagranatum L.</i>
<b>Bacillus</b>	Témoin	
	11.5	
	10	
	11	
<b>E.coli</b>	Témoin	
	10	
	9	
	13.5	
<b>Staphylococcus</b>	Témoin	
	10	
	9.5	
	9	

\*l'activité antibactériennes test par la méthode de la diffusion sur disque et puits en montrant que les extraits méthanoliques de l'écorce de la plante *Punicagranatum* ont un effet

## Chapitre IV : Résultats et discussion

antibactérienne très puissants sur la croissance d'E.Coli et S.aureus et B.cereus sauf une exception du gel sur la souche B.cereus

**Tableau 43 : Activité antibactérienne d'extrait *Lawsonia inermis***





Souches	Zone d'inhibition (disques) mm	Photographie <i>Lawsonia inermis</i>
<b>Bacillus</b>	Témoin	
	11	
	6	
	11.5	
<b>E.coli</b>	Témoin	
	12.5	
	11	
	15	
<b>Staphylococcus</b>	Témoin	
	11	
	10	
	9	

\*L'extrait méthanolique henné a un effet d'inhibition très puissant sur les souches S.aureus et B.cereus et souches E.coli.

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### VIII. L' activité Antiinflammatoire

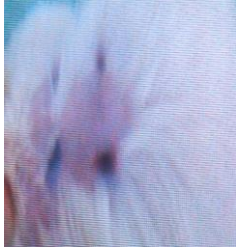

**Tableau 44 :** Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez les rats *Albino Wistar* femelle adulte (C traités par *Punica granatum* ; traités par D traités par *Lawsonia inermis*).

Période	Groupe (N=2)	Glycémie (mg/dl)	Poids corporel (g)	Les Photos
J -0	C (PG)	164	132	
	D(LI)	220	200	
J-3	C(PG)	111	130	
	D(LI)	97	200	


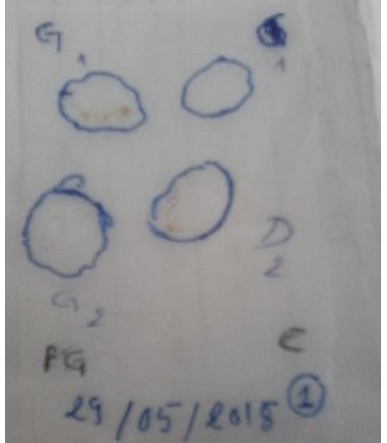
## Chapitre IV : Résultats et discussion

J-6	C(PG)	104	135	
	D(LI)	121	211	
J-9	C(PG)	61	135	
	D(LI)	89	217	
J-12	C(PG)	64	142	
	D(LI)	74	211	

## Chapitre IV : Résultats et discussion

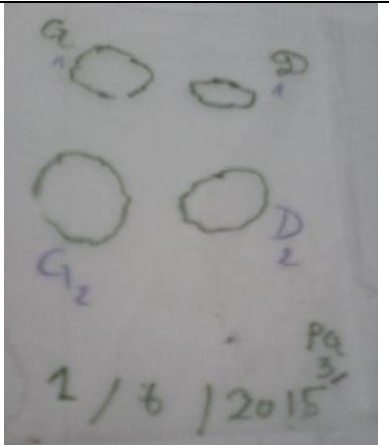

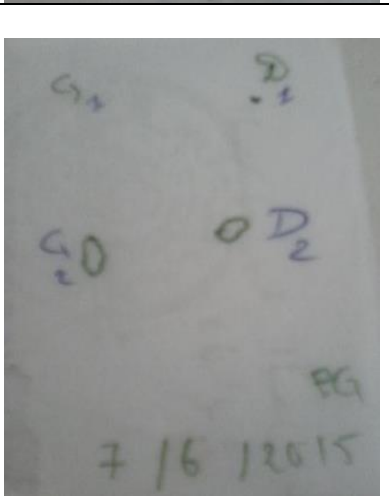
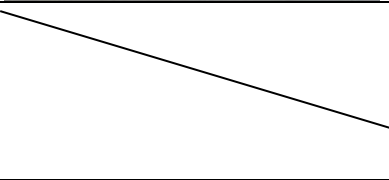
J-15	C(PG)	64	145	
	D(LI)	75	211	

**Tableau 45 :** Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez les rats AlbinoWistar femelle adulte (C traités par *Punicagranatum* ; traités par D traités par *Lawsonia inermis*).

Période	Groupe (PG)	Les photos
J-0	C	
J-3	C	



# Chapitre IV : Résultats et discussion

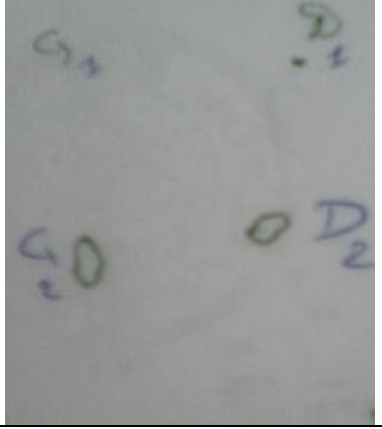
J-6	C	
J-9	C	
J-12	C	
J-15	C	

# Chapitre IV : Résultats et discussion

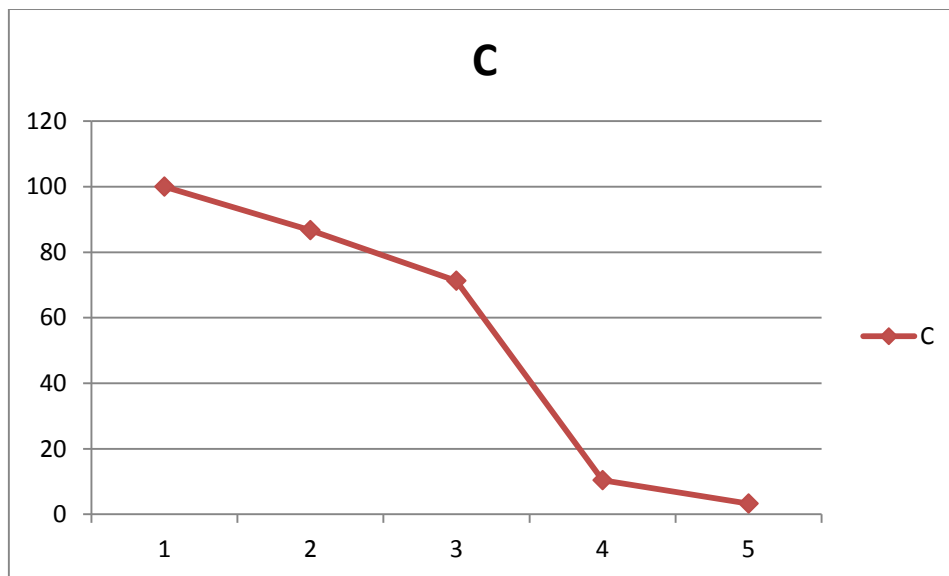
Période	Groupe (LI)	Les photo
J-0	D	
J-3	D	
J-6	D	
J-9	D	

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

J-12	D	
J-15	D	

### Résultat et discussion :

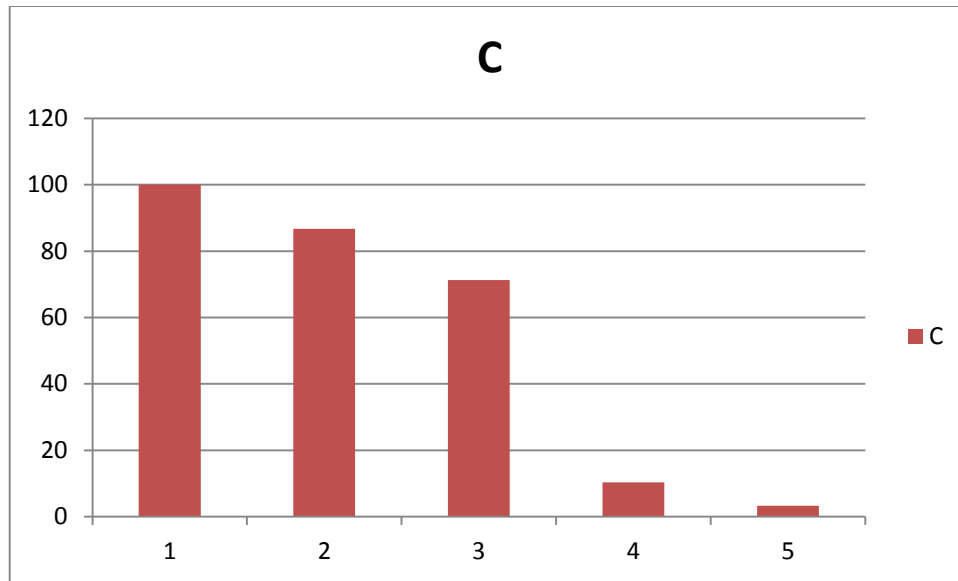


C= *Punica granatum*

**Graph 1 : évolution de la surface de plaies (%) du rats C en fonction du temps (jour)  
les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ectype test ANOVA n=6**

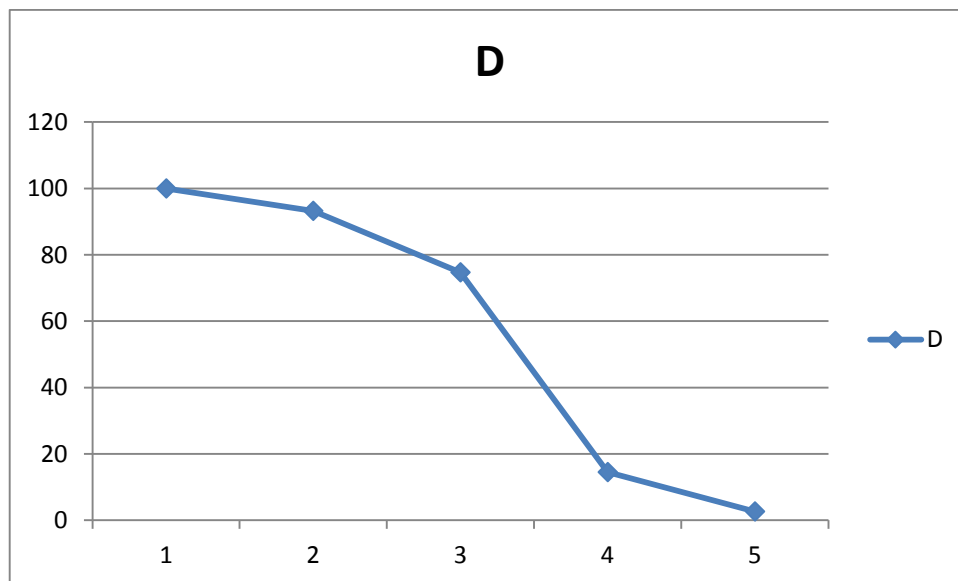
## Chapitre IV : Résultats et discussion

---



C= *Punica granatum*

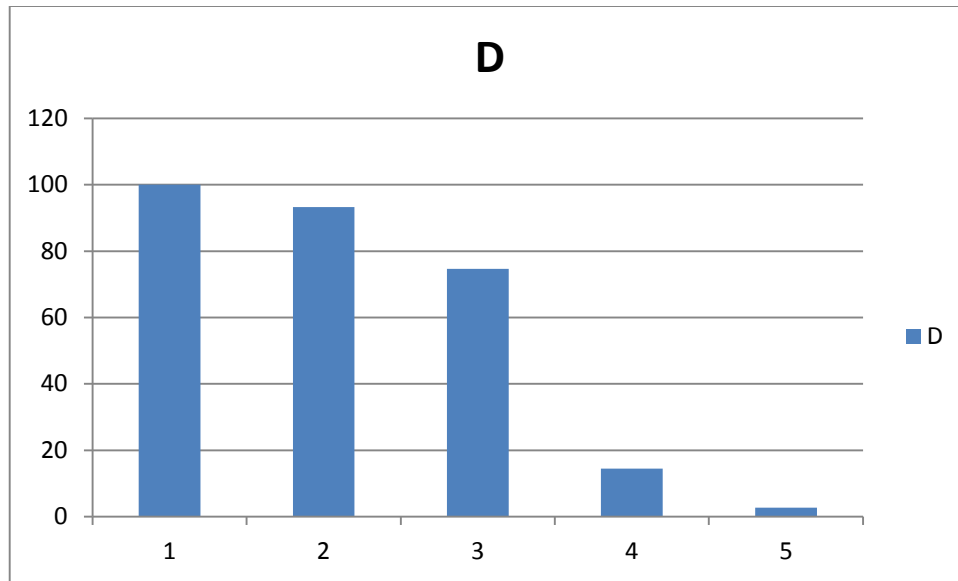
**Histogramme 1 :** évolution de la surface de plaies (%) du rats C en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6



D=*Lawsonia inermis*

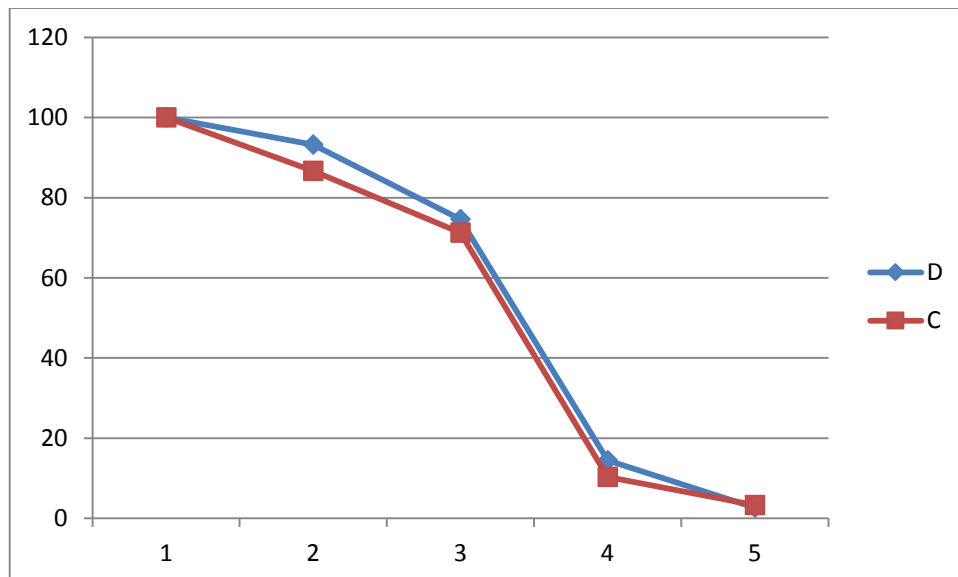
**Grphe 2 :** évolution de la surface de plaies (%) du rats D en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6

## Chapitre IV : Résultats et discussion



D=*Lawsonia inermis*

**Histogramme 2** : évolution de la surface de plaies (%) du rats D en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6

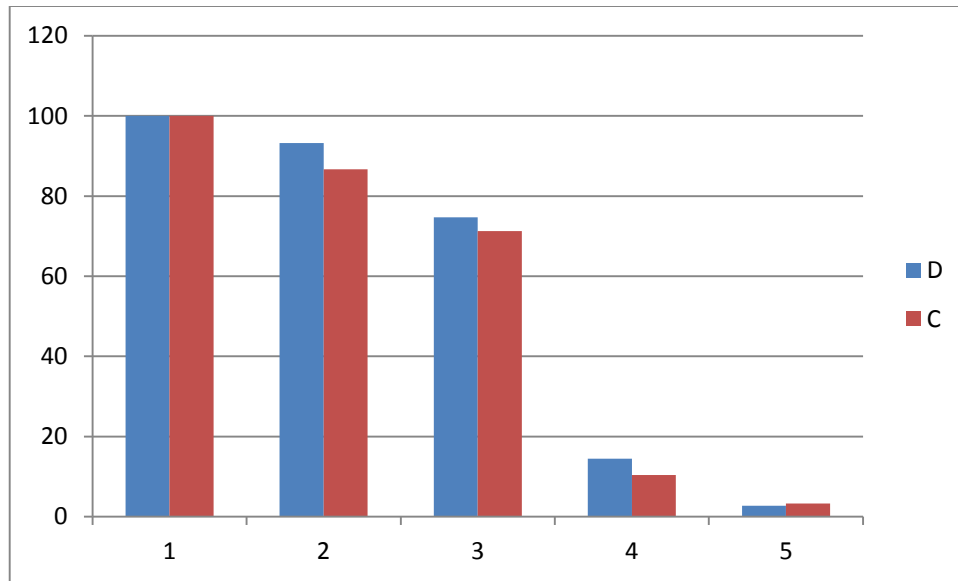


D=*Lawsonia inermis*

C= *Punica granatum*

**Graphe 3** : comparaison d'évolution de la surface de plaies (%) du rats C et D en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6

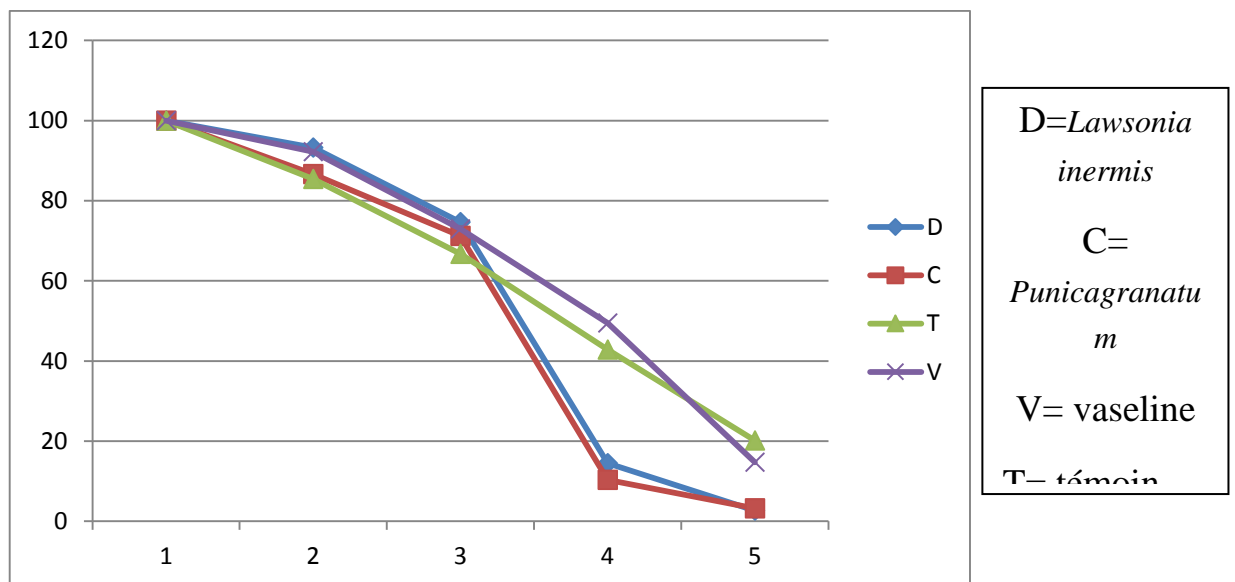
## Chapitre IV : Résultats et discussion



D=*Lawsonia inermis*

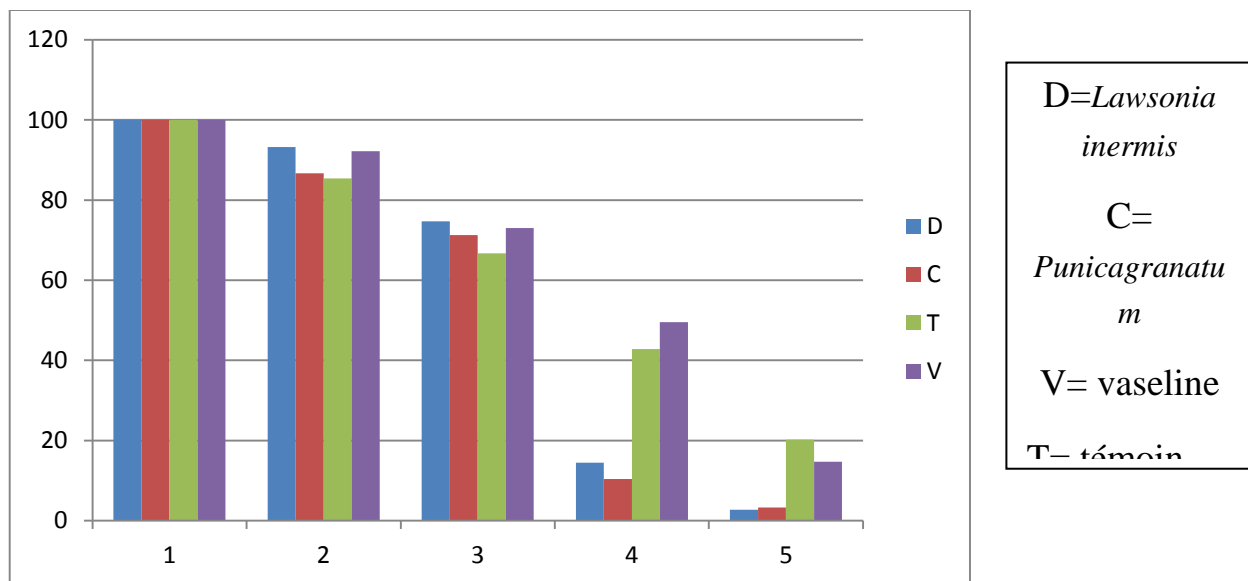
C= *Punica granatum*

**Histogramme 3** comparaison dévotion de la surface de plaies (%) du rats C et D en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6



**Graphe 4** : comparaison dévotion de la surface de plaies (%) du rats C et D et V et T en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6

## Chapitre IV : Résultats et discussion



**Histogramme 4 : comparaison d'évolution de la surface de plaies (%) du rats Cet D et V et T en fonction du temps (jour) les résultats sont exprimés moyenne  $\pm$  ecartype test ANOVA n=6**

### Interprétation :

D'après les graphes et les histogrammes en divises le graphe de C et D en 2 phases

**Premier phase :** les 4 jours premier qui présente la phase vasculaire et inflammatoire l'effet du deux plantes est faibles par a port au témoin.

**Deuxième phase :** du 5 eme jour jusqu'à l'afin 15 jour qui présente la phase de réparation et régénération des tissus les plantes c :(Punica granatum L) et d : (Lawsonia inermis) accélérées cette phase, mais le c et plusrapide que d.

Donc les plantes (Punica granatim L et Lawsonia inermis) possèdes des composes phénoliques accélères la réparation et la régénération des tissus de la peau.

conclusion



## Conclusion

Au terme de ce travail concernant la caractérisation de métabolites secondaires et évaluation des activités biologiques des espèces *Punica granatum L* et *Lawsonia inermis* appartenant à la famille des Lytéraceae l' une des famille les plus importantes de la flore Algérienne et les plus utilisées en médecine traditionnelle, nous pouvons dire que ces plantes sont riches en flavonoïdes quinones , anthraquinones, tanins, alcaloïdes, stérols, stéroïdes et triterpenes

Nos travaux de recherche ont élucidé aussi que le jus de *Punica granatum L.* est riche en sucres réducteurs, lipides, acides aminés et sels minéraux (Cl, Ca, Fe, K...), ainsi que la présence de la a Majorité des métabolites secondaires.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que l'extrait hydro méthanolique et le jus de *Punica granatumL.* Sont plus riches en composés phénoliques avec des quantités :  $435 \pm 8,8$  mg EAG.g MS et  $178,44$  mg EAG.g MS que l'extrait hydro méthanolique de *Lawsonia inermis* avec un taux de  $155,64 \pm 3,4$  mg EAG.g MS.

L'analyse chromatographique sur couche mince (CCM) et sur colonne (CC) , nous a permis d' obtenir des fractions et de séparer certains nombre de métabolites secondaires, tel que le Lawsonsone , molécule qui occupe 88% des métabolites secondaires de henné. Elle est responsable de la coloration des cheveux et de toutes les activités biologiques.

L'étude de l'activité antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH, a révélé que les espèces *Punica granatum* et *Lawsonia inermis* possède un pouvoir antioxydant puissant. L'extrait hydro méthanolique de *L. inermis* a inhibé 95,74 des radicaux libres, tandis que L'extrait hydro méthanolique et le jus de *P. granatum* ont neutralisé 94,08 et 94,82 de DPPH.

La méthode de diffusion sur disque et des puits, nous a montrés que les extraits des deux plantes ont un effet positif sur la croissance des bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* L'étude in vivo de l'activité anti-inflammatoire et anti-cicatrisation ont montré que les feuilles de *L. inermis* et l'écorce de *P. granatum L.* ont un pouvoir puissant de régénération et de réparation des tissus de la peau et ont diminuée la durée des inflammations des plaies.

Référence

Bibliographique

# *Références*

- **Alais, C. et Linden, G. 1997.** Abrégé de biochimie alimentaire. Ed. Masson.  
pp: 13-69.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005.**  
Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer.* 113(3), 423-433.
- Ali Kalla ;( 2012)** Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : ituranthos scoparius, Rantherium adpressum et Traganum nudatn, -Le Titre de Doctorat en Science ; L'UNIVERSITE MENTOURI - CONSTANTINE
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2006.** High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A* 896, 87–93.
- AMOURETTI M.C., COMET G.** - Cahier d'histoire des techniques – Des hommes et des plantes : plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 1992. 174 pages. Page 81
- Ann. Dematl,V .(2005)** .les grandes fonctions de la peau .132 :8S49-68
- Artik, N., Murakami, H., Mori, T., 1998.** Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing.* 12, 492 499.

- Aviram m.,dornfeld L.** - Pomegranate juice consumption inhibits serum converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis. 2001. N°158. Pages 195-198
- Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hofman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T., Fuhrman, B., 2002.** Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under Exp. Clin. Res.* 28, 49– 62.
- **Badiaga, M. 2011.** Etude Ethnobotanique, Phytochimique, et Activités Biologique de *Nauclea latifolia* Smith, une Plante Médicinale Récoltée au Mali. Thesis, University of Bamako, Bamako, Mali.
- **Bartosz G (2003)** Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem* 37: 219– 292
- Badri, B.M. and S.M. Burkinshaw. 1993.** Dyeing of wool and nylon 6.6 with henna and Lawson. *Dyes Pigments*, 22(1):15-25.
- Ben-Arie, R., Segal, N., Guelfat-Reich, S., 1984.** The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109(6), 898-902
- Benkiki N. 2006.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat de l'université Haj Lakhdar de Batna.
- Benmehdi. H; 2000.** valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Département de chimie faculté des sciences Université Tlemcen.

- Bohrom N .1997** : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales : moyen efficace de lutte contre les ravageurs de denrées alimentaires stockées.  
Université du Maroc pp162
- Boullard B.** - Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances.  
Editions Estem. 2001. 636 pages. Pages 437-438.
- Bounatirou S. et al., 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoffm. & Link. *Food Chem.*, **105**, 146-155.
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3eme ed. Lavoisier, Paris. 1120 p.
- CRETE P., (1965),** Précis de botanique Systématique des angiospermes, tome II, 2<sup>e</sup> éd., Masson et C<sup>ie</sup>, Collection de précis de pharmacie, Paris, 429 p.
- Cazin f.J.** - Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées. Editions de l'envol. 1868. 1189 pages. Pages 497-501.
- Celiktas, o.y. et al. 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* , depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v.100, p.553-559.
- Chaudhari, S.M., Desai, U.T., 1993.** Effects of plant growth regulators on flower sex in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 63(1), 34-35.
- Clark, R. A. F.,** Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol*, 1985. **13** (5): 701-725.
- Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP.** Fetal wound healing. *Front Biosci*. 2003;8:s1240–1248.

- Cowan, mm., 1999.** Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 4, p. 564-582.
- **Dialla B.E., 2005.** Pratiques et savoirs paysans au Burkina Faso : une présentation de quelques études de cas. Série Documents de travail, DT-CAPES N° 2005-20, 25p
- Dean, F.M., 1963.** Natural occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworth's . Lenders. Pp 148.
- Desjardins, Y., 2008.** Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables (Tomas-Barberan and Gil). Dans: *Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products*, Woodhead Publishing, Cambridge, Angleterre, pp.1-64.
- Doillon, C. J., Dunn, M. G., Berg, R. A. et Silver, F. H.,** Collagen deposition during wound repair. *Scanning Elect Microsc*, 1985. **11** : 897-903.
- DUCOURTHIAL G.** - Flore magique et astrologique de l'Antiquité. Editions Belin. 2003. 655 pages. Pages 69, 187-188 ET 513.
- Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4(7): 685-688.
- Elgarejo, P., Salazar, D.M., Artes, F., 2000.** Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 185-190
- Elodie WALD, 2009.** 1 grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolution thérapeutique récentes. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université Henri Poincaré- NANCY 1

- Erika ,F., Janos,M.and(2004)** « determination of surface characteristics of particulate fillers by inverse gas chromatography at infinite dilution : a critical approach'' J. colloid interf .Sci . 269(1-2), 115-123
- Erika Bourquet, 2008** ,les techniques de laboratoire : purification et analyse des composés organiques.
- Ernst E., 2000.** Adverse effects of herbai drugs in dermatology. British Journal of Dermatoiology; 143: 923-929.
- **Favier A 2003-** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actualité chimique, 108-115.
- Fleuriet, A., Jay-Allemand. C.. Macheix. J.J., 2005.** Composes phenoliques des vegetaux un exemple des metabolites secondaires d'importance economique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121-216.
- Flora von Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D., 1885.** Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany
- Flora von Deutschland, O.W.T., Schweiz, O.U.D., 1885.** Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber Gera. Germany.
- Forestier J.P., 1981.** Un séné, Cassia obovata, utilisé comme cosmétique : le 'henné neutre'. **International Joirrnalof Cosmetic Science** ;3: 211-226.
- FOURNIER P.** - Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France.Editeur Paul Lechevalier. 1948. Tome II.504 pages. Pages 286 à 291.
- **Gibbons et coll., (2008).** fonctionnement biologique normal de l'organisme

- Gabbiani ,1998** ,Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms.
- Gabor, M., Cody, V., Middleton, E.J., Harborne, J.B., Beretz, A., Liss, A.R., 1988.**Plants Flavonoids in biology and Medicine II; Biochemical. Cellularand Medicinal properties. New York. 1-15 p.
- Gallo F., Multari G., Giambenedetti M. ET Federici E., 2008.** Chemical Fingerprinting of Lawsonia inermis L. using FIPLC, HPTLC and Densitometry. Phytochemical Analysis; 19:550-559.
- Gbolade A.A., 2009.** Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. Journal ofEthnopharmacolog; 121:135-139
- Gonzalez-Gallego, J., S. Sanchez-Campos and M.J. Tunon, 2007.** Anti inflammatory properties of dietary flavonoids. Nutr. Hosp., 22: 287-293.
- Grinnell ,1994,** Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway
- Grotzinger E. ET Campbell M. I., 1974.** 4-(2'-carboxyphehyl)-4-oxobutyrate: an obligatdryintermediate in Lawsons biosynthesis. Phytochemlstry; 13 : 923 -926.
- Guignard, J.L., 1996.** Abrège de biochimie vegetale.Ed. Masson. Paris. 160
- Guillaume g., mach-chieu-** Pharmacopée et médecine traditionnelle chinoise - Plantes chinoises, plantes occidentales. Edition Présence. 1987. 701 pages. Pages 617 et 618.
- Gupta S., AH M., Alam M., Niwa M. et Sakai T., 1992.**24, 0 ethylcholest-4-en-33-oI from the roots of **Lawsonia inermis**. Phytochemistry; 31: 2558 - 2560.
- Gupta S., Ali M. et Alamo M.S., 1993.** A naphthoquinone from Lawsonia inermis stem bark. Phytochemistiy, 33: 723-724.
- Gwenola le Naour, Thomas Brugnot, Quand les syndicats deviennent " prestataires "** in Les mobilisations sociales à l'heure du précariat.



Chabanet Didier, Dufour Pascale, Royall Frédéric (Ed.), 2011, p. 61-80,  
ISBN 978-0 7425-2935-9

- **Hämäläinen ,2007**, Introduction to Source Estimation: Distributed Anatomically Constrained Source Models
- **Heilerová L., Bučkova M., Tarapčík P., Silhár S., Labuda J., 2003**. Czech Journal Food Science 21 (2): 78- 84.
- Handa G., Kapil A., Sharma S., et Singh J.** 1997. Lawsonia inermis acid a new anticomplementary triterpenoid from Lawsonia inermis seeds. Indian J. Chem. Sec!; 36, 252-256.
- Harbone, J.B., Grayer, R.J., 1988**. The flavonoids, Advances. In: research since 1980. Harboirne J B, Chapman and Hall, London, 1-20 p.
- Haslam, E., 1998**. Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge, pp 422.
- Hatcher P.E., 2003**. Biological Flora Of The British Isles: Impatiens noli tangere L. Journal- of Ecology; 91, 147-167.
- Hemingway, R.W., 1992**. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande. Hemingway R W, Laks P. E. New York.
- 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. Technol. 210, 39– 42.
- Hunt, M. K., Lederman, R., Potter, S., Stoddard, A., & Sorensen, G. (2000)**. Results of employee involvement in planning and implementing the Treatwell 5 A-Day Work-Site Study. Health Education Behavior, 27(2), 223-231.

- Jain S.K., 1973.** Medicinal Plants. National Book Trust, India, p. 91.
- Jean-Michel Hurltel., 2006 :** Huiles essentielles et médecine. Aromathérapie
- Jones ,J.D.G,and Dangl,J.L.( 2006).** The plant immune system.Nature  
444,323-329
- Joseph Pelletier (1788-1842)** et 75<sup>e</sup> anniversaire de la fondation de la Société  
d'histoire de la Pharmacie. p. 135–15.
- Joy P.P., Thomas J., Mathew S., ET Skaria B.P. 2001.** Medicinal Plants.  
Tropical Horticulture Vol. 2, (eds. Bose, T.K., Kabir, J., Das, P. and  
Joy, P.P.). Naya Prokash,Calcutta, pp. 449-632.
- Kabouche, 2007.** d'Architecte hmonp (Habilitation à la Maîtrise  
d'OEuvre), Architecture .
- Kanitakis, J., Anatomy,** histology and immunohistochemistry of normal  
human skin. Eur J Dermatol, 2002. 12(4): 390-401.
- Kanitakis, J.,** Immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol,  
1998. 8(8): 539-547.
- Karim Boukhari,2004,** « Le Roi a dit », Telquel, n°141.
- Kazandjieva.J., Grozdev.I. ET Tsankov.N., 2007.** Temporary henna tattoos.  
Clinics in Derma!ology; 25, 383-387.
- Khare C.P., 2007.** Indian Medicinal Plants. Springer Science +Business  
Media, LLC.
- Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A.,  
Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R.,  
Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E., 2002.** Chemo  
preventive and adjuvant therapeuticpotential of pomegranate (Punica

granatum) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 71, 203–217.

- Lahouel M. 2005.** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- Lahouel, M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., Bousseboua, H. ; (2006).** The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*, 61(4), 347-355.
- Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007.** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. ethnopharm.* N°109. Pages 177-206.
- Lavai R., 2008.** LE HENNÉ, La plante aux multiples usages. [http://www.imderplam.com/interplantinjfiches\\_plantes/henne.htm](http://www.imderplam.com/interplantinjfiches_plantes/henne.htm)
- Lekouch N., Sedki A., Nejmeddine A., ET Gamon 5,2001.** Lead and traditional Moroccan pharmacopoeia. *The Science of the Total Environment*; 280 ; 39-43.
- Lemoine E.** - Guide des fruits du monde - Les fruits de nos régions, les variétés exotiques. Collection les compagnons du naturaliste. Editions Delachaux et Niestlé. 1998. 192 pages. Page 151.
- Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P. 2008.** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. 192 p.

- Makoi JHR, Ndakidemi PA (2007)** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *Afr J Biotechnol* 6:1358-1368
  
- Malagas, D., 1992.** Arbres et arbustes guerisseurs des savanes Maliennes. ACCT - Karthala. p. 232.
  
- Malekzadeh F., 1968.** Antimicrobial Activity of Lawsonia inermis. *Applied*
  
- Matulich J. et Sullivan J., 2005.** A temporary henna tattô causing hair and clothing dye allergy. *Contact Dermatitis*; 53: 33-36.
  
- McMillan D.b.C., Snehal D. S., John E. Oatis, J.r. et David J. J., 2004.** Role of Oxidant Stress in Lawsons-Induced Hemolytic Anemia. *Toxicological sciences* ;82: 647-65 five.
  
- Meddleton, E., Kardasnam, J.C., 1993.** The flavonoids *Advances*. In: research since 1986. J B Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652 p.
  
- Mehendale A.R. et Thomson R.H., 1975.** Binaphthoquinones in *Lomatia Ferruginea*. *Phytochemistry*; 14: 801-802.
  
- Melgarejo, P., 1993.** Seleccion y tipificacion varietal de granado (*Punica granatum L.*) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).
  
- Melgarejo, P., Salazar, D.M.S., 2003.** Tratado De Fruticultura Para Zonas Aridas Y Semiaridas. Vol. 2: Algarr.416 p.
  
- Merad Chiali R., 1973.** Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne. Les eventaires du Grand-Alger; Partie II. Thèse de Doctorat d'état en - pharmacie, Université d'Alger, Institut des Sciences Médicales: pi 42-144.
  
- **Murari R., SESHADRI T.R .and Singh R .( 1976)** lacoumarin frof lawsania inermis . *phytochemistry* 15:1789 .

- **Medic-Sanic, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A., 2004.** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemical acta.* 361-366 p.
- **Melgarejo, P., Salazar, D.M., Artes, F., 2000.** Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 185-190
- **Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW (2001)** ORCAnisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* 6: 212–219
- **Merghem R. 2009.** *Elément de biochimie végétale, 1ère édition.* Edition Bahaeddine, pp 149-158
- **Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418–425.
- **Napoli, C.A., Fahy, D., Wang, H.Y., Taylor, L.P., 1999.** White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiology.* 120 (2), 615-622.
- **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 Infect. Dis.* 4, 41.
- **Nohynek G. J., Fautz R., Benech-Kieffer F. et Toutain H., 2004.** Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology;* 42: 517-543.

- Nus B., Oie C. H. et Steen F. H., 2005.** Survey Of chemical substances in kohi and henna products. Danish Ministry of the Environment, environmental Protection agency.
- Nutrient**data for this listing was provided by USDA SR-21. Each "~" indicates a missing or incomplete value
- Oliveres-Ghouti C., 2006.** Les risques des tatouages : de l'éphémère à l'éternel... Journal de pédiatrie et de puériculture, •19: 268-271.
- Oyedeji A.O., Ekundayo O. ET Koenig W.A., 2005.** Essential Oil Composition of Lawsonia inermis L. Leaves from Nigeria. Journal of Essential Oil Research : JEOR.
- **Pourrut B, G Perchet, J Silvestre, M Cecchi, M Guiresse and E Pinelli (2008).**"Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in Vicia faba roots." Journal of Plant Physiology 165(6): 571-579.
- PARIS R.R., MOYSE H.** - Matière médicale. Collection de précis de pharmacie. Editions Masson. 2° édition. Tome II. 1981. 518 pages. Pages 448 à450.
- Paul I., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. Dorling Kindersiey Limited, Londres, p: 226.
- Pilcher CD. 1999.** Phenological, physiological, and ecological influences of transgenic Bt corn on European corn borer management. PhD dissertation. Iowa State University, Ames, IA.
- Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., 2001.** Antibacterial activity of Punica granatum. Fitoterapia. N°72. Pages 171-173.
- Psotova, J., Lasovsky, J., Vicar, J., 2003.** Metal chelating properties. Electrochemical behavior. Scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. Biomed. 174-153 p.

- **Rizk AM.** Constituents of Plants Growing in Qatar I.A. Chemical Survey of Sixty Plants. *Fitotrapia*.1982;52:35.
  
- Ribereau-Gayon, J., 1968.** Les composephénoliques des végétaux. Traite d'œnologie. Edition Dunod. Paris. 254 p.
  
- Roques H., 1960.** Précis de botanique pharmaceutique: Phanérogamie. Librairie Maloine S.A.: p546.
  
- Rostkowska H., Nowak. M.J., Lapinski L. et Adamowicz.L., 1998.** Molecular structure and infrared spectra of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone; Experimentai matrix isolation and theoretical Hartree—Fock and post Hartree—Fock study. *Spectrochimica Acta Part A*, 54: 1091-1103.
  
- **Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), 2005.** Opinion on Lawsonia inermis (Henna) COLIPA N° C169. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted by the SCCP during the 6<sup>th</sup> pienary meeting of 13.
  
- **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999):** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
  
- Sacchetti, B., Scelfo, B. Strata, P. (2005)** The cerebellum: synaptic changes and fear conditioning. *Neuroscientist*, 11, 217–227.
  
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1990.** Nutritional consequences of dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton. Florida: CRC press. Pp 113-146.
  
- Sandrine follet, 2003 ,** dermatologie du lapin de compagnie. Doctorat veterinaire
  
- Sarita.G. – Mohd.A .- Sarwar.A.(1991)** Ethycholest 4 en 3 b ol from the roots of Lawsonia inermis. *Phytochemistry*, vol 31 n° 7 PP 2558-2560.

- Sarkhosh, A., Zamani. Z., Fatahi, R., Ebadi, A., 2006.** RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes. *Sci. Hortic.* 111(1), 24-29
- Sauriasari R., Wang D.H., Takemura Y., Tsutsui K., Masuoka N., Sano K., Horita M., Wang B.L. et Ogino K. 2007.** Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicology*; 235:103-111.
- Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), 2005.** Opinion on *Lawsonia inermis* (Henna) COLIPA N° C169. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted by the SCCP during the sixteenth meeting of 13.
- Serini G, Gabbiani G.** Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 1999;250:273–283
- Sharma V.K., 1990.** Tuberculostatic activity of henna (*Lawsonia inermis* Linn.). *Tubercule* ;71, 293-295.
- Shivananda N. B., Isitor.G, Davis. E. M. et Pillai. G. K., 2007.** The Evidence based Wound Healing Activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phototherapy Research*; 21, 827— 831.
- Smith J.M., Zhang Y., Koboldt C.M., Muhammad J., Zweifel B.S., Shaffer A.F., Talley J.J., Masferrer J., Seibert K., Isakson P.** Pharmacological analysis of cyclo-oxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95:13313–13318
- SPICHIGER R.-E., SAVOLAINEN V., et al.** - Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Editions Presses polytechniques et universitaires romandes. Troisième édition. 2004. 413 pages.



- Squillaci, G., Di Maggio, G., 1946.** Acute morbidity and mortality from decoctions of the bark of *Punica granatum*. *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1946, 1095–1096.
- **Tapas, A.R., D.M. Sakarkar, and R.B. Kakde. 2008.** Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7: 1089 1099
- **Tortora, G.J., Grabowski, S.R., & al., 1994.** Principe d'anatomie et de physiologie. Anjou, CEC collégial et universitaire.
- **Tsai, W. 2002.**, "Social structure of cooperation within a multiunit organization: Coordination, competition, and intra-organizational knowledge sharing.", *Organization Science*, 13, 179-190.
- Talaat S. M. et Hauke M. E., 1961.** The Biochemistry and Physiology Of Henna (*Lawsonia Alba*):It is Use as a Remedy for Intestinal Amoebiasis. *Transactions of the royal society of Tropical medicine and hygiene.* 55: 56-62.
- Trease GE, Evans WC.** A text book of Pharmacognosy. Tindal, Oxford: ELSB/Bailliere; 1987.
- Treutter, D., 2006.** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Letter.* 4, 147-157.
- **Van Elswijk, D.A., Schobel, U.P., Lansky, E.P., Irth, H., van der Greef, J.,2004.** Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum L.*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 65, 233–241.

- Wichtl M., 1999.** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3ème édition. Edition française par Robert Anton. Technique et documentation. p :262-264.
- Wichtl M., 1999.** Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3ème édition. Edition française par Robert Anton. Technique et documentation. p: 262-264
- Witte JL, Kim JS, Sessler DI, et al.** Tramadol reduces the sweating, vasoconstriction, and shivering thresholds. *Anesth Analg* 1997 ; 87 : 173-9.
- Wong K. C. et Teng Y. E., 1995.** Volatile components of *Lawsonia inermis* L. Flowers. *Journal of Essential Oil Research*; 7: 425-8.
- Wysocki, A. B., Skin anatomy,** physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*, 1999. 34(4): 777-797.
- Yamaguchi Y, Kubo T, Tarutani M, Sano S, Asada H, Kakibuchi M, et al.** Epithelial-mesenchymal interactions in wounds: treatment of palmoplantar wounds by nonpalmoplantar pure epidermal sheet grafts. *Arch Dermatol.* 2001;137:621–628.
- Yogisha S., Samiulla S. D., Prashanth D., Padmaja R., Amit A., 2002.** Trypsin inhibitory activity of *Lawsonia inermis*. *Filouterai* ;**73 :690-691.**

Annexes

## *Liste des tableaux*

**Tableau.1** : Variétés de grenadiers à fruits. (afaq f., malik a., et al ,2005)

**Tableau.2** : Composition du jus de grenades en acides organiques, en sucres et en minéraux (mg/100 g de la partie comestible du fruit) (Elodie WALD ; 2009)

**Tableau.3** : quatre (04) lots d'animaux répartis comme suit :

**Tableau.4** : Résultats de mise en évidence des composées réducteurs.

**Tableau.5** : Résultat de mise en évidence d'amidon

**Tableau.6** : Résultats de mise en évidence des lipides

**Tableau.7** : Résultats de mise en évidence la protéine

**Tableau.8** : les types de sels minéraux existant dans le Jus de la grenade

**Tableau.9** : les types de sels minéraux existant dans le Jus de la grenade

**Tableau.10** : Résultats de criblage des Flavonoïdes (HCl + Mg)

**Tableau.11** : Photographie de criblage des Flavonoïdes du Punica granatum L

**Tableau.12** : Photographie de criblage des Flavonoïdes du Lawsonia inermis

**Tableau.13** : Résultats de criblage des Anthraquinones du Punica granatum L et Lawsonia inermis.

**Tableau.14** : Photographie de criblage des anthraquinones du Punica granatum L

**Tableau 15** : Photographie de criblage des anthraquinones du Lawsonia inermis

**Tableau.16** :.Résultats de criblage des Quinones du Punica granatum et

Lawsonia inermis

**Tableau.17** :.Photographie de criblage des Quinones du Punica granatum L

**Tableau.18** : Photographie de criblage des Quinones du Lawsonia inermis

**Tableau.19** : Résultats de criblage des Anthocyanes (HCl concentré +bain marie)

**Tableau.20** : Photographie de criblage des Anthocyanes du Lawsonia inermis

**Tableau.21**: Photographie de criblage des Anthocyanes du Punica granatum L

**Tableau.22** :Résultats de criblage des Tanins du Punica granatum L et Lawsonia inermis

**Tableau.23** : Photographie de criblage des Tanins du Punica granatum L

**Tableau.24** : Photographie de criblage des Tanins du Lawsonia inermis

**Tableau.25** : Résultats de criblage des Alcaloïdes

**Tableau.26**: Photographie de criblage des Alcaloïdes du Punica granatum L

**Tableau.27** :Photographie de criblage des Alcaloïdes du Lawsonia inermis

**Tableau.28** : Résultats de criblage des saponosides

**Tableau.29** : Photographie de criblage des saponosides du Punica granatum L

**Tableau.30**:Photographie de criblage des saponosides du Lawsonia inermis

**Tableau 31** :Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes du Punica

granatum et Lawsonia inermis.

**Tableau 32** :Photographie de criblage des triterpènes et stéroïdes du Punica granatum L

**Tableau 33** :Photographie de criblage des triterpènes et stéroïdes du Lawsonia inermis

**Tableau 34** :photographie de détection des coumarines

**Tableau 35** :photographie de CCM D'extrait méthanolique.

**Tableau 36** :photographie de CCM D'extrait méthanolique

**Tableau 38** : Comportement chromatographique des phases de Punica granatum et Lawsonia inermis sur plaque de gel de silice par UV 365 nm

**Tableau 39** :Taux de polyphénols existant dans les extraits EMPG et EMLI et (Jus).

**Tableau 40** :Le mode d'obtention des différentes fractions isolées de Lawsonia inermis et Punica granatum L, leurs fluorescences sous UV à 365nm

**Tableau 41** :Le pourcentage d'inhibition d'EMLI et EMPG et Jus (de la grenade)

**Tableau 43** :Activité antibactérienne d'extrait méthanolique de l'écorce de la plante Punica granatum L.

**Tableau 44** :Activité antibactérienne d'extrait Lawsonia inermis

**Tableau 45** :Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez les rats Albino Wistar femelle adulte (C traités par Punica granatum ; traités par D traités par Lawsonia inermis).

**Tableau 46** :Effet de la Cicatrisation et traités sur l'évolution des paramètres généraux, poids corporel (g) chez les rats Albino Wistar femelle adulte (C traités par *Punica granatum* ; traités par D traités par *Lawsonia*

## *Liste des figures*

**Figure.1** : photo Arbres du grenadier

**Figure .2** : Fleurs et fruits du Grenadier (*Punicagranatum* L) (Flora Von Deutschland and Schweiz. 1885).

**Figure.3**: Diagramme d'une fleur de *Punicagranatum* L.

**Figure.4**: Fruits du grenadie  
**Figure.5** : Répartition géographique de la grenade en algerie

**Figure.6** : Utilisation du grenadier dans les produits cosmétiques et médicaux

**Figure.7** : Photo des différentes parties de la plante *L. inermis*

**Figure.8** : Diagramme de la fleur de henné

**Figure.9** : Répartition géographique du henné en Afrique.

**Figure.10** : Les différents composants isolés des feuilles de *L.inermis*

**Figure.11** : Glucide (glucose) avec 6 carbone et 5 OH et 1 groupement aldéhyde

**Figure.12** : Différentes classes des composés phénoliques.

**Figure.13** : Structures chimiques de quelques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 1996).

**Figure.14** : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxy cinnamiques (Malagas, 1992)

**Figure.15** : Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

**Figure.16** : squelette de base des flavonoïdes

**Figure 17** : Structures chimiques de quelques flavonols Van Elsw



**Figure.19** : Unités des tanins condensés : (a) flavan-3-ols et 5-desoxyflavan-3-ols ; (b) flavan-3-4-diols ou leucoanthocyanidines et (c) anthocyanidines correspondantes.

**Figure.20** : Bactérie d'*E. Coli*

**Figure.21** : *Bacillus cereus*

**Figure.22** : *Staphylococcus aureus*

**Figure.25** : photos de plantes utilisées dans la recherche

**Figure.26** : Distribution géographique de la récolte *Lawsonia inermis* et *Punicagranatum*

**Figure.27** : Photos de macération de la matière végétale *Lawsonia inermis*.

**Figure.29** : filtrée à l'aide d'un entonnoir

**Figure.30** : photo du standard d'acides aminés

**Figure.33** : Evaporation rotative (Rotavapor)

**Figure.34** : les principales étapes du dosage des polyphénols

**Figure.35** : Protocole d'extraction des flavonoïdes

**Figure.36** : Le début de la chromatographie sur colonne

**Figure.37** : Développement de la plaque CCM

**Figure.38** : réalisation de l'activité antimicrobienne

**Figure.39** : photo du rat *Albinowistar*

**Figure.40** : Étapes montrent les appareils et les opérations de préparation des rats

**Figure.41** : Photos processus pour obtenir les plaies apparaissent homogènes

**Figure 42** : les différentes étapes de plaies et traitements

**Figure.43** : Plaque CCM des acides aminés après révélation par ninhydrine

**Figure.44** : Photo décrit comment mesurer le PH par le PH mètre

**Figure.45** : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

**Figure.46** :photo de fractions obtenues de Chromatographie sur colonne *Punicagranatum L*

**Figure.47** :photo du résultat antioxydant (*Lawsonia inermis et Punicagranatum et jus de la grenade*

**Figure 48** :pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des extraits d'écorce l'EMPG et jus de la grenade (*Punicagranatum*) *concentration*

## Liste des abréviations

AA : Acide aminé

HCl : Acide chlorhydrique

AM : coefficient d'Absorbance Molaire

Abs : Absorbance

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

DCPIP : 2,6 DichloroPhénol-IndoPhénol

Eq AG : Equivalent en Acide Gallique

Eq Q : Equivalent en Quercétine

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

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Anhydre acétique

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Picrate de sodium

cc : Concentré

Ms : Matière sèche

AcOEt : Acétate d'éthyle

ATB : Antibiotique

CCM : Chromatographie sur couche mince

cm : Centimètre

MeOH : Méthanol

CHCl<sub>3</sub> : Chloroforme

Mg : magnésium

Et al. : Et autre auteurs

mg : Milligramme

min : Minutes

ml : Millilitre

mm : Milimètre

n-BuOH : n- butanol

nm : Nanomètre

rpm : Rotation par minute

UV : Ultra-violet

[C] : Concentration

µg : Microgramme

°C : degré Celcius

EtOH : Ethanol

g : gramme

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

ICH50 : Concentration inhibitrice de l'hémolyse à 50%

Kg : Kilogramme

m : mètre

MeOH : Méthanol

µM : micromètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

LI : *Lawsonia inermis*

PG : *Punica granatum L*

E.M.L.I : Extrait méthanolique *Lawsonia inermis*

E.M.P.G : Extrait méthanolique *Punica granatum L*

CCM : Chromathographie sur couche mince

S : Systhème

Arginine : Arg

Aspartic acid : Asp

Asparagine : Asn

Cysteine : Cys

Glycine : Gly

Isoleucine : Ile

Methionine : Met

Phenylalanine : Phe

Proline : Pro

Tyrosine : Tyr

## Résumé

Nous avons recherchés les principales substances bioactives et valorisées les effets biologiques du *Lawsonia inermis* et *Punica granatum L*, des plantes utilisées dans le monde, et en Algérie.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie aérienne de *Lawsonia inermis* et *Punica granatum L* a montré la présence des polyphénols tels que les flavonoïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, des tanins, des stérols, des coumarines. Le dosage des phénols totaux effectué sur l'extrait méthanolique a été déterminé par la colorimétrie, de valeur appréciable.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits hydro méthanolique des souches étudiées montre un effet de potentialité moyenne.

Ce pendant *P.granatum L* et *Lawsonia inermis* possèdent un pouvoir excellent de réduction des radicaux libres, le DPPH.

Ainsi qu'un excellent pouvoir de réparation et de régénération des tissus de la peau.

**Mots-clés** : *Lawsonia inermis*, *Punica granatum L*, polyphénols, activité antioxydante, flavonoïdes, anti-inflammatoire.

## **Abstract**

Qualitative phytochemical analysis of Lawsonia inermis et Punica granatum L extracts confirmed the presence of various secondary metabolites like alkaloids, anthroquinones, coumarins , flavonoïds , tannins, anthocyanins , phenols, saponins , steroids, triterpenoids , and essential oil.

The total phenolic content has been determined by spectrophotometric dosage. The results showed that the plants are rich in total phenols. The results suggest that the phytochemical properties for curing various ailments and possess potential anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities.

**Key word:** Lawsonia inermis , Punica granatum, flavonoïds s, **anti**-inflammatory activity. Antioxidant activity.

## الملخص

بحثنا في المواد النشطة بيولوجيا الرئيسية وتقدر الآثار البيولوجية للأوراق الحناء والرمان L، النباتات المستخدمة في العالم، والجزائر

الفحص الكيميائي النباتي النوعي التي تجرى على جزء جوي للحناء والرمان أكد عن وجود polyphénolss مثل الفلافونويدات، الانثوسيانين، قلويدات والعفص والجامدة، الكومارين، وتم تحديد تقرير من إجمالي الفينولات التي أجريت على مستخلص الميثانول من خلال لون قيمة كبيرة.

تقييم نشاط مضادات الميكروبات من الميثانول مقتطفات سلالات المائية درس يبين متوسط التأثير المحتمل.

ومع ذلك فان الرمان و حناء لديها قوة ممتازة خفضت DPPH الجذور الحرة.

و ايضا لديها قوة كبيرة لإصلاح وتجديد أنسجة الجلد.

**الكلمات المفتاحية:** الحناء، الرمان، الفلافونويدات ، النشاط المضاد للاكسده ، اللوسون ، النشاط المضاد للالتهاب



---

**NON et Prénom : MOUALKIA HALIMA et GOURMATI MERYEM**

***Mémoire de fin de cycle***

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

***Filière : Biologie et physiologie végétale***

***Option : Métabolisme secondaires et molécule bioactive***

***Thème :***

**Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti-inflammatoire de plantes *Punica granatum L* et *Lawsonia inermis*.**

---

**Résumé :**

Nous avons recherchés les principales substances bioactives et valorisées les effets biologiques du *Lawsonia inermis* et *Punica granatum L*, des plantes utilisée dans le monde, et en Algérie.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie aérienne de *Lawsonia inermis* et *Punica granatum L* a montré la présence des polyphénols tels que les flavonoïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, des tanins, des stérols, des coumarines, Le dosage des phénols totaux effectué sur l'extrait méthanolique été déterminé par la colorimétrie, de valeur appréciable.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits hydro méthanolique des souches étudiées montre un effet de potentialité moyenne.

Ce pendant *P. granatum L* et *Lawsonia inermis* possèdent un pouvoir excellent de réduction des radicaux libres, le DPPH.

Ainsi qu'un excellent pouvoir de réparation et de régénération des tissus de la peau.

**Mots-clés :** *Lawsonia inermis*, *Punica granatum L*, polyphénols, activité antioxydante, flavonoïdes, anti-inflammatoire.

---

***le : 24/06/2015***

***Devant le jury :***

- ***Présidente : Dr. CHOUGUI SAIDA Maître de conférence // A***
  - ***Promoteur : Mr. CHIBANI SALIH // M.A.A Université des frères Mentouri Constantine***
  - ***Examinatrice : Mr. KBAILI ZOUBIR // M.A.A Université des frères Mentouri Constantine***
-