

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département : Sciences de la matière



## **MEMOIRE DE MASTER**

**Domaine:** Chimie

**Filière:** Chimie des produits naturels

**Option:** Chimie organique et matériaux organiques

**Thème :**

# **Etude de quelques activités biologiques de l'extrait aqueux de l'écorce de la grenade**

Présenté par: Ali Sabrine et Abdou Djihane

Devant le jury :

MANSOURI Lakhdhar	<b>M.A.A</b>	Université de Tébessa	<b>Président</b>
MESSAI Laid	<b>M.C.A</b>	Université de Tébessa	<b>Rapporteur</b>
SOUDANI Kaouthar	<b>M.A.A</b>	Université de Tébessa	<b>Examinatrice</b>

Date de soutenance: 22/09/2020

**Note.....Mention.....**



**Déclaration sur l'honneur de non-Plagiat**

(A joindre obligatoirement au mémoire; Remplie et signée)

Nous soussignés

Nom, prénom: Ali Sabrina & Abdou Djehane

N° de carte d'étudiant: (1) 34025917 (2) 34025975

Régulièrement inscrits (es) en **Master** au **Département Sciences de la Matière**

Année universitaire: 2019/2020

Domaine: **Sciences de la matière**

Filière: **Chimie**

Spécialité: chimie des produits naturels

Intitulé du mémoire: étude de quelques activités biologiques de l'écorce de la grenade.

Attestons que notre mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Nous certifions également que nous n'avons ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article, ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé:

Les étudiants seront convoqués devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont:

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année du master.
- L'exclusions définitive.

08 أكتوبر 2020  
  
 (1):

Fait à Tébessa, le: 8/10/2020

Signature des étudiants (es):

(2):

## Résumé

Cette étude vise à évaluer les propriétés antioxydantes *in vitro* de l'extrait aqueux de l'écorce du *Punica granatum* L, et lui comparer à celui de l'extrait de dichlorométhane et l'extrait de l'acétate d'éthyle. L'évaluation de l'activité antioxydante est réalisée par deux méthodes ; la méthode de la réduction du radical libre DPPH, et la méthode de la réduction de fer ferrique (méthode de FRAP).

Les tests phytochimiques montrent la présence de certains métabolites actifs comme les flavonoïdes les tanins les Terpenoïdes, les composés réducteurs.....

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le radical libre DPPH, et la réduction de fer ferrique montrent que l'extrait aqueux de l'écorce de grenade a une capacité de réduction de fer et de piégeage du radical DPPH<sup>\*</sup> relativement importante à comparaison d'autre extrait (l'extrait de dichlorométhane et l'acétate d'éthyle)

## تلخيص

يهدف هذا العمل إلى دراسة الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلص المائي لقشور الرمان في المختبر و مقارنتها بمستخلص ثنائي الكلوروميثان و مستخلص الأسيتات الإيثيلية. يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين ؛ ارجاع الجذر DPPH، وارجاع الحديد الثلاثي (méthode de FRAP).

تظهر الاختبارات الكيميائية الفيتاوية وجود بعض الجزيئات النشطة مثل الفلافونويدات، والتانينات، والتربينات، و المركبات المرجعة...

تظهر نتائج اختبار النشاط المضاد للأكسدة باستخدام DPPH ، وارجاع الحديد الثلاثي، أن المستخلص المائي لقشر الرمان له قدرة عالية على ارجاع الحديد و عزل الجذر DPPH مقارنة بالمستخلصات الاخرى(مستخلص الاسيتات الايثيلية و مستخلص الكلورميثان الثنائي)

## Abstract

This work aims to study in vitro the antioxidant properties of *Punica granatum* L peel aqueous extract, and compare it with dichloromethane extract and ethyl acetate extract. The evaluation of antioxidant activity is carried out by two methods; the DPPH free radical reduction method, and the ferric iron reduction method (FRAP method).

Phytochemical tests show the presence of some active metabolites such as flavonoids, tannins, terpenoids, reducing compounds.....

The results of the antioxidant activity evaluation by using the free radical DPPH, and ferric iron reduction show that pomegranate peel aqueous extract has an ability to reduce iron iron-reducing and DPPH<sup>•</sup> trapping capacity relatively important compared to other extracts (dichloromethane extract and dehydrate acetate).

## *Remerciement*

*Nous voudrions tout d'abord adresser toute nos gratitudees au promoteur de ce mémoire Mr. MESSAI Laïd pour avoir encadré et dirigé ce travail*

*Nous remercions également les membres de jury monsieur Mansouri Lakhdar et madame Soudani Kaouthar*

## *Dédicace*

*A nos très chers parents pour nous avoir toujours  
encouragés pour réussir dans nos études durant toutes ces  
années.*

*A nos frères surtout Dhia et Ayoub*

*A nos chères sœurs Wafa et Wided et Nariméne*

*A tous les membres de nos familles.*

*A tous les amies surtout Khadija, Nour et Nouara, Maroua  
et Sabah*

### Liste des tableaux

Tableau n°01: Classification de <i>Punica granatum</i>	5
Tableau n°02: la composition de l'écorce de la grenade	8
Tableau n°03: Structures de quelques acides benzoïques	21
Tableau n°04: exemples des activités biologiques et propriétés de quelques terpènes	28
Tableau n°05: Propriétés de quelques composés des huiles essentielles.	29
Tableau n°06: Résultats de tests de présences des principes actifs	42
Tableau n°07 : Rendement de chaque extrait	44
Tableau n°08 : les absorbances mesurées à 570 nm de chaque extrait avec le DPPH	45
Tableau n°09 : valeur d'IC <sub>50</sub> pour chaque extrait	47

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Feuilles lancéolées <i>Punica granatum</i>	6
<b>Figure 02</b> : Les fleurs de la grenade	7
<b>Figure 03</b> : Le fruit (grenade) et ses différentes parties	7
<b>Figure 04</b> : Motif flavan (a) et flavon(b) et numérotation systématique	19
<b>Figure 05</b> : Structure chimique d'acide gallique (A) et acide ellagique (B)	20
<b>Figure 06</b> : Structure des tannins condensés	20
<b>Figure 07</b> : Quelques exemples de coumarines	21
<b>Figure 08</b> : Structure des acides benzoïques	21
<b>Figure 09</b> : Structures de quelques acides cinnamiques	22
<b>Figure 10</b> : Quelques exemples d'alcaloïdes	23
<b>Figure 11</b> : quelques structures des terpènes	23
<b>Figure 12</b> : Les différentes formes mésomériques et les liaisons hydrogènes intramoléculaires intervenant dans la stabilisation d'un ion phénolate de la quercétine	25
<b>Figure 13</b> : Auto-oxydation du catéchol (a) et formation de dimères (b,c)	25
<b>Figure 14</b> : Oxydation des polyphénols par la polyphenoloxidase	26
<b>Figure 15</b> : le matériel végétal	32
<b>Figure 16</b> : montage à reflux	33
<b>Figure 17</b> : les étapes d'extraction solide-liquide	35
<b>Figure 18</b> : extraction liquide-liquide par l'éther de pétrole	35
<b>Figure 19</b> : extraction liquide-liquide par DCM	36
<b>Figure 20</b> : la surface de la phase aqueuse	36
<b>Figure 21</b> : l'extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle	37
<b>Figure 22</b> : les extraits secs obtenues depuis la fractionnement	37
<b>Figure 23</b> : Réduction de radical DPPH	38
<b>Figure 24</b> : Forme libre et réduite du DPPH	38
<b>Figure 25</b> : spectrophotomètre UV-Vis	38
<b>Figure 26</b> : Réduction de radical $Fe^{3+}$ en $Fe^{2+}$	39
<b>Figure 27</b> : les absorbances mesurées à 570 nm de chaque extrait avec le DPPH	45
<b>Figure 28</b> : la variation de l'absorbance de solution méthanolique de DPPH en fonction de la concentration	46
<b>Figure 29</b> : les pourcentages d'inhibition de chaque extrait à différentes concentration	46
<b>Figure 30</b> : les courbes de tendances des pourcentages d'inhibition	47
<b>Figure 31</b> : Courbes de pouvoir réducteur des extraits de l'écorce de grenade sur le fer ferrique.	48

## Liste des abréviations

EPPG	l'extrait de la poudre de la peau de grenade
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène
EPG	L'extrait de la peau de grenade
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
LDL	low density lipoprotein
HHDP	l'acide hexahydroxydiphénique
PG	Punicalagine
PL	Punicallin
AE	acide ellagique
SOD	superoxyde dismutase
EAPG	l'extrait aqueux de la peau de grenade
HEs	huile essentielle
LPS	Lipopolysaccharides
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
HCl	acide chlorhydrique
NaOH	hydroxyde de sodium
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniaque
UV-Vis	Ultraviolet-visible
V/V	Rapport volume/ volume
IC <sub>50</sub>	la concentration inhibitrice médiane
TRAP	Total radical- trapping antioxidant parameter
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity

## Contenu

Introduction générale .....	1
<b>Partie théorique</b> .....	<b>I</b>
<b>Chapitre I</b> .....	<b>II</b>
I.1. Historique.....	3
I.2. La grenade dans les religions .....	3
I.3. Description botanique .....	4
I.4. Nomenclature .....	4
I.5. Classification botanique.....	5
I.6. Distribution géographique.....	5
I.7. Les exigences de milieu .....	5
I.7.1. Conditions climatiques.....	5
I.7.2. Le sol.....	5
I.7.3. L'eau.....	6
I.8. Composition chimique des différents organes du grenadier .....	6
I.8.1. Racine et écorce de l'arbre.....	6
I.8.2. Les feuilles .....	6
I.8.3. Les fleurs.....	6
I.8.4. Le fruit.....	7
I.8.4.1. La partie comestible .....	7
I.8.4.2. L'écorce de la grenade .....	8
I.9. Conservation.....	8
I.10. Utilisation de la grenade.....	8
I.10.1. Utilisation agroalimentaire .....	8
I.10.2. Utilisation industrielle .....	9
I.10.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	9
I.11. Toxicité de grenade.....	10
I.12. Les activités biologiques de l'écorce de grenade.....	10
I.12.1. L'activité antioxydante.....	10
I.12.2. L'activité antibactérienne .....	11
I.12.3. L'activité antifongique .....	12
I.12.4. Autres activités biologiques.....	12
I.12.4.1. Activité anticancéreuse.....	12
I.12.4.2. Activité anti-inflammatoire.....	13

I.12.4.3.L'activité antidiabétique.....	13
<b>Chapitre II</b> .....	III
II.1.Introduction.....	18
II.2.Les composés phénoliques.....	18
II.2.1. Les polyphénols.....	18
II.2.2.Classification.....	18
II.3.2.1.Les flavonoïdes.....	18
II.2.2.2.Les tanins .....	19
II.2.2.2.1.Tannins hydrolysables.....	19
II.2.2.2.2.Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols.....	20
II.2.2.3.Les coumarines.....	20
II.2.2.4.Les acides phénoliques.....	21
II.3.Les composés azotés.....	22
II.3.1.Les alcaloïdes .....	22
II.3.1.1.Les alcaloïdes vrais.....	22
II.3.1.2.Les proto-alcaloïdes .....	22
II.3.1.3.Les pseudo-alcaloïdes .....	22
II.4.Les terpénoïdes.....	23
II.5.Les huiles essentielles.....	23
II.6.quelques activités biologiques et les propriétés des composés phénoliques.....	24
II.6.1. Propriétés physico-chimiques des polyphénols.....	24
II.6.1.1. Réactivité des composés phénoliques .....	24
II.6.1.2.Stabilité des polyphénols.....	25
II.6.1.3.Les phénomènes de complexation .....	26
II.6.2.activités biologiques des composés phénoliques.....	26
II.7.Quelques activités biologiques et propriétés des alcaloïdes .....	27
II.8.Quelques activités biologiques et propriétés des terpènes .....	28
II.9.Quelques activités biologiques et propriétés des huiles essentielles .....	28
II.9.1.Propriétés physicochimiques.....	28
II.9.2.Activité biologique des huiles essentielles.....	29
<b>Partie pratique</b> .....	IV
<b>Chapitre III</b> .....	V
III.1.Introduction .....	32
III.2.Matériels et méthodes.....	32
III.2.2.Méthodes.....	32
III.2.2.1.Les tests de présences .....	33

III.2.2.1.A.Les tests réalisés sur l'extrait de l'eau chaude.....	33
A.1.Détection de l'amidon .....	33
A.2.Détection des saponosides .....	33
A.3.Détection d'alcaloïde.....	34
A.4.Détection des coumarines .....	34
III.2.2.1.B.Les tests réalisés sur l'extrait éthanoïque .....	34
B.1.Détection des flavonoïdes .....	34
B.2.Détection des tanins galliques .....	34
B.3.Détection des composés réducteurs.....	34
B.4.Détection des stérols et triterpènes .....	34
III.2.2.2.Extraction (solide-liquide) .....	35
IV.2.2.3.Fractionnement (extraction liquide-liquide) .....	35
III.3.Evaluation de l'activité antioxydante .....	37
III.3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	37
III.3.1.1.Mode opératoire .....	37
III.3.1.2.Le pourcentage de piégeage du radical DPPH .....	39
III.3.1.3.Détermination IC <sub>50</sub> .....	39
III.3.2. La méthode de FRAP .....	39
<b>Chapitre IV</b> .....	VI
IV.1.les tests de la présence des molécules actives.....	42
IV.2. Le rendement d'extraction.....	44
IV.2.1.Le rendement de l'extrait brute.....	44
IV.2.2. Le rendement de chaque fraction .....	44
IV.3.évaluation de l'activité antioxydante .....	45
IV.3.1.Test de DPPH.....	45
IV.3.1.1.Les pourcentages d'inhibition.....	46
IV.3.1.2Détermination IC <sub>50</sub> .....	47
IV.3.2.Test de FRAP .....	48
Conclusion.....	49
<i>Annexe</i> .....	VII
Généralité sur l'activité antioxydante .....	51
1. Stress oxydant.....	51
2. Généralité sur les espèces réactives, sources et cibles.....	51
3. Antioxydant .....	52
4. Sources d'antioxydants.....	52
5.Étude d'activité des antioxydants.....	52

5.1. Test au DPPH.....	52
5.2. Test FRAP .....	52
5.3. Test TRAP.....	53
5.4. Test TEAC.....	53
5.5. Test ORAC .....	53

---

## Introduction générale

Depuis l'Antiquité, Les plantes ont fourni à l'homme tous ses besoins en termes d'abris, de vêtements, de nourriture, de saveurs et de parfums, mais surtout elles étaient une source de médicaments et de remèdes à fin de soigner les différentes maladies [1].

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques n'ont fait que confirmer les effets sanitaires bénéfiques des fruits, des légumes et des plantes en général [2]. Plusieurs études épidémiologiques ont fortement suggéré qu'une forte ingestion de produits végétaux est associée à une diminution significative du risque de nombreuses maladies. Ces derniers représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques [3].

C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale, et leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [4].

Parmi les plantes médicinales ayant un intérêt thérapeutique important figure le grenadier (*Punica granatum L.*). Ce fruit avec une histoire médicale est très fréquemment consommé et employé en médecine traditionnelle en Algérie. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antioxydante de l'extrait de l'écorce de ce fruit.

Dans notre présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier *in vitro* l'effet antioxydant des extraits naturels (aqueux, dichlorométhane et acétate d'éthyle) de l'écorce *Punica granatum* vis-à-vis de radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et leur pouvoir réducteur sur le fer ferrique et comparer entre les effets de chaque extrait.

---

## Références

- [1]- N. Douaouri, Thèse de Doctorat, Contribution à une étude phytothérapeutique, antiinflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo, Université de Mostaganem, 2018
- [2]- S. Haddou, A. Messika, S. Nazoun, Étude de l'effet antibactérien in vitro des extraits polyphénolique de la peau de grenade «*Punica granatum* » vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu, Université de Blida-1-, 2018, p1
- [3]- N. Zeghad, Mémoire de Magistère, Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Université de Constantine, 2009, p1
- [4]- S. Zatoun, K. Ghanem, Mémoire de Mastère, quantitative et activité antioxydante du *Punica granatum*, Université d' El-Oued, 2017, p2

---

*Partie*  
*théorique*

# *Chapitre I*

## I.1. Historique

Le terme grenade vient du latin « *malum granatum* » qui signifie: « *fruit à petits grains* » [1]. en latin pomus et granatus, signifie une tête de série ou de pomme granulaire [2].

La grenade est originaire de l'Iran aux vallées de l'Himalaya en Inde il y a 5000 ans. Elle fût disséminée à travers le Moyen-Orient par les migrants. En effet sa facilité de conservation et sa grande teneur en eau en fit une nourriture de voyage très adaptée [3].

Ila été largement utilisé dans la médecine traditionnelle en Amérique, en Asie, en Afrique et en Europe pour le traitement de différents types de maladies. Il est disséminé par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du II<sup>ème</sup> siècle avant JC, le grenadier est importé à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois [4].

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 [5].

Hippocrate (460-377 av. J-C.) Surnommé le père de la médecine recommandait la grenade contre les leucorrhées, pour favoriser «l'écoulement rouge » chez les femmes, pour « faire concevoir », pour soigner un œil qui pleure et qui est douloureux, et pour beaucoup d'autres maux. Un peu plus tard, D'après Dioscoride, médecin grec né vers 40 après JC, si l'on mange trois fleurs de grenadier, même de petite taille, on ne souffrira pas des yeux de toute l'année [4].

## I.2. La grenade dans les religions

Dans l'Islam, la grenade est une métaphore de l'intégration de la multiplicité dans l'unité (en rapport à la quantité de graines dans une seule grenade) [3].

Dans la tradition chrétienne, le grenadier associe l'annonce du sacrifice du Christ, figuré par le liquide doux et sanguin qui s'écoule du fruit quand on l'ouvre. Son jus rouge, couleur sang, évoque également le martyre des saints [4].la Bible fait référence à la grenade comme l'un des 7 fruits bénis de la Terre Promise [3].

Dans la religion juive Elle représente la nostalgie de la terre promise pour les Hébreux en exil. Dans la Torah sont décrits les huit vêtements du Cohen Gadol, le « grand prêtre », qui doit les revêtir lors de son entrée dans des lieux sacrés [4].

## I.3. Description botanique

La grenade est le fruit d'un arbuste appelé grenadier, de nom latin *Punica granatum* L. appartenant à la famille des Punicacées [2].

Le grenadier est un petit arbre ou un grand arbuste (2 à 7 m de hauteur), Le tronc est recouvert d'une mince écorce grise; se ramifie irrégulièrement en branche plus ou moins épineuses et hérissées, portant des feuilles opposées à court pétiole, ovales, entières, vertes luisantes, sans stipules [6], peuvent mesurer de 3 à 8 cm de long [7]. Ses fleurs de couleur rouge pourpre ou grenat [7], Son fruit (la grenade) La grenade est sphérique quelque fois aplati, de 5 à 12cm de diamètre, à écorce dure et coriace de couleur jaune-rouge violacée [6], Cette baie renferme de nombreuses petites graines de couleur rose à rouge contenues dans des loges, séparées par des pulpes gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre [8]. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit, le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216g [2]. De point de vue botanique, le fruit de grenadier se compose de 3 parties: l'épiderme (écorce) qui est la partie extérieure du fruit représente 28 à 32% du poids total du fruit, les arilles et les pépins. Alors que le taux en graines varie de 55 à 60% du poids total du fruit [2]. La saveur de la grenade, douce et légèrement acidulée, est la résultante d'un équilibre harmonieux entre deux de ses constituants: les glucides, d'une part et les acides organiques, d'autre part [6].

## I.4. Nomenclature

- **Nom scientifique** : *Punica granatum*
- **Nom français** : grenadier
- **Nom anglais** : pomegranate
- **Nom espagnol** : Granada
- **Nom italien** : Melograno
- **Nom arabe** : Romane

## I.5. Classification botanique

Tableau I : Classification de *Punica granatum* [9]

Sous-embranchement	Spermaphytes
Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae (Lythraceae)
Genre	Punica
Espèce	<i>Punica granatum</i> .L

## I.6. Distribution géographique

L'aire de répartition de la grenade se situe en Moyen-Orient, sa terre d'origine [8]. Les pays d'origine de l'arbre s'étendent de la Turquie via le Caucase (Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie) et du Tadjikistan, Turkménistan et Ouzbékistan à l'est jusqu'en Iran, Afghanistan et Pakistan. Dans le bassin méditerranéen et au Proche Orient, par exemple en Iran, Arménie, Égypte, Espagne, Maroc, Algérie, Tunisie, Syrie, Liban et Anatolie, depuis des milliers d'années [7]. 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 [8].

## I.7. Les exigences de milieu

### I.7.1. Conditions climatiques

Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes [10]. En dehors des régions subtropicales, le grenadier pousse fort bien dans toutes les régions où la température ne descend pas en dessous de -15°C [4].

### I.7.2. Le sol

Le grenadier n'est pas exigeant en ce qui concerne la nature de son sol. Il s'adapte à une large gamme de sols et tolère les terrains acides, alcalins, crayeux... Il est également assez

résistant à la salinité de la terre. Néanmoins, il donne de meilleurs résultats dans un terrain profond et gras : les terres d'alluvions lui conviennent mieux. Les terrains alcalins, argilo limoneux, lui sont favorables [10].

### I.7.3. L'eau

Les arboriculteurs turcs et perses prétendent que le grenadier doit avoir « les pieds dans l'eau et la tête au soleil ». En effet, il est nécessaire que ses racines soient au frais et largement irriguées, afin d'obtenir des fruits de bonne qualité et en grande quantité [10].

## I.8. Composition chimique des différents organes du grenadier

Les différents procédés d'analyse chimique, comme les techniques chromatographiques, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, permet aux chercheurs d'identifier et préciser la composition des différents organes du grenadier :

### I.8.1. Racine et écorce de l'arbre

La composition chimique des extraits préparés à partir des racines et écorce de l'arbre se distingue des autres parties de l'arbre par de forte concentration en alcaloïdes [2].

### I.8.2. Les feuilles

Les feuilles du grenadier contiennent des flavones, telles que la lutéoline et l'apigénine avec des propriétés anxiolytiques. Elles renferment également des tanins, comme la punicaline et la punicalagine [8].



**Figure 1 [8] :** Feuilles lancéolées *Punica granatum*

### I.8.3. Les fleurs

Les fleurs du grenadier contiennent de l'acide gallique et des triterpènes ursolique, acide oléanolique, comme l'acide asiatique, acide maslinique [8].



Figure 2 [7] : Les fleurs de la grenade

## I.8.4. Le fruit

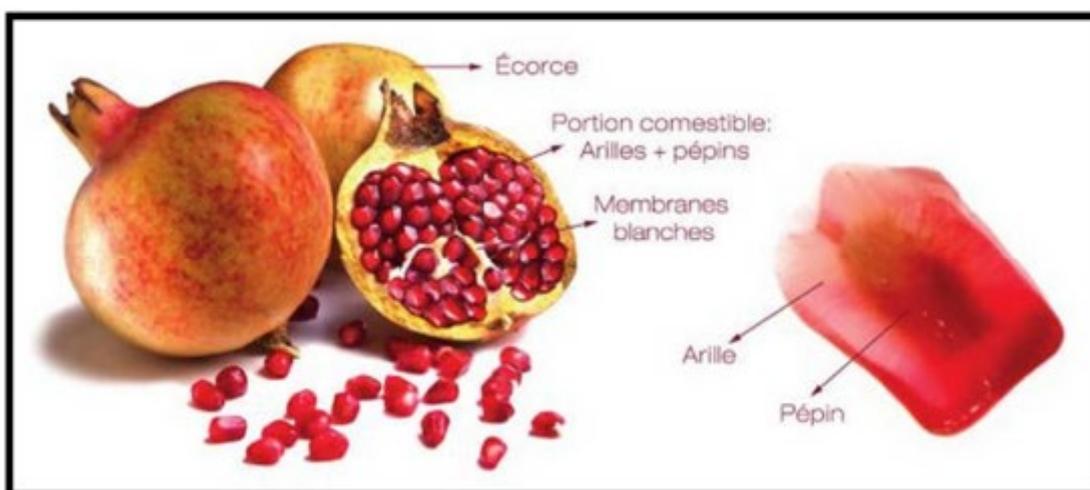


Figure 3 [8] : Le fruit (grenade) et ses différentes parties.

Il se compose en deux parties :

### I.8.4.1. La partie comestible

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse) [8]. les graines représentent une proportion 20% de l'arille, il est riche essentiellement en acides gras insaturés (Ac. linoléique, Ac. Linoléique, Ac. Punicoïque, Ac. Oleique, Ac stéarique, Ac. palmitique), acides aminés, polyphénols [9]. Le jus représente une proportion 80% de l'arille, dont la composition est la suivante : eau 85 %, sucres 10% (fructose et glucose), Acides organiques 1,5% (Acide ascorbique, Acide malique, Acide citrique), polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes) [9]. L'anthocyanine c'est le composé responsable de la couleur du fruit de la grenade, en raison de l'importance de ce dernier dans la couleur des jus respectifs.

Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, maturité, le secteur de production et conditions saisonnières [2]. Les pépins ont une teneur en acide gras qui oscille entre 12 et 20 % de leur poids total (poids sec) [8].

## I.8.4.2. L'écorce de la grenade

Environ (48 à 50 %) du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches [9], qui sont une source très importante de composés bioactifs.

**Tableau 2** : la composition de l'écorce de grenade

Flavonoïdes	Flavones	Référence
Tannins	Ellagitanins (punicaline, pédunculaine et punicalagine la granatine A et la granatine B)	[9]
Acides polyphénoliques	acides hydroxy benzoïques (l'acide gallique et l'acide ellagique), des acides hydroxy-cinnamiques	[9]
les alcaloïdes	pelletiérine, méthylpelletiérine , pseudopelletiérine	[10]
Autres composition	Les proantocianidines et les minéraux (potassium, azote, calcium, phosphore, magnésium, sodium)	[8]

## I.9. Conservation

On peut conserver les grenades [10]:

- durant 2 semaines à température ambiante
- durant un mois dans le bac du réfrigérateur
- jusqu'à quatre mois à 5°C

Elles peuvent aussi être transformées en jus ou en sirop pour une conservation de plusieurs mois en bouteille [10].

## I.10. Utilisation de la grenade

### I.10.1. Utilisation agroalimentaire

- Des études expérimentales ont montré que l'extrait de la poudre de la peau de grenade (EPPG) peut être utilisé comme conservateur naturel dans les produits carnés [11].
- Une étude récente a démontré que l'extrait méthanolique de la peau de grenade améliore la stabilité oxydative de l'huile de tournesol, à différentes concentrations [11].
- Une étude a porté sur la formulation d'un jus et d'une gelée de jus de grenade additionné d'un extrait de l'écorce. Les résultats montrent que l'additionnée de l'extrait de l'écorce

présente des propriétés rhéologiques similaires à celles des gelées commerciales. Ainsi, un jus de grenade moins sucré, pauvre en calories a été fabriqué, par l'ajout de l'extrait de l'écorce de grenade, ce jus est riche en antioxydants tout au long de la période de conservation (08 semaines) [11].

## **I.10.2.Utilisation industrielle**

### **I.10.2.1.Le tannage et la teinture**

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, des gris, bruns et noirs. L'écorce du fruit et les fleurs sont utilisées pour teindre le textile [4]. L'écorce de la grenade, a été utilisée en Inde comme une teinture depuis les temps les plus anciens, De l'encre a été produite à partir des feuilles en les macérant dans du vinaigre [2]. Dans les années 1950, le grenadier fournissait, grâce à l'écorce de ses fruits, une matière tannante, sans emploi dans les industries européennes, mais très utilisée dans le nord de l'Afrique pour la préparation des maroquins jaunes. L'écorce de grenade servait au tannage et à la teinture des cuirs, ainsi, il était employé, avec mordantage à l'alun, pour donner leur belle couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des babouches. L'industrie européenne de l'impression des tissus, au XIXème siècle, a intégré l'écorce de grenade et la racine de grenadier dans la vaste gamme des teintures naturelles [4]. Les substances colorantes issues du grenadier sont utilisées de façon traditionnelle, dans plusieurs pays pour la teinture des tapis [6].

### **I.10.2.2.L'encre**

L'écorce de la grenade fut quelques fois utilisée pour remplacer la noix de galle, dans la préparation de l'encre [4].

## **I.10.3.Utilisation dans la médecine traditionnelle**

Dans la médecine traditionnelle, toutes ses parties, racines, écorce, fruits, pépins sont utilisées pour traiter maladies. L'écorce du fruit est utilisée par de nombreux peuples contre les diarrhées, les ulcères, les parodontoses, les stomatites et les pharyngites [6]. Les fleurs séchées sont utilisées pour guérir les bronchites et les inflammations buccales [2].

Dans le monde, la plus célèbre utilisation a été celle d'un vermifuge, tueur et expulseur des Vers intestinaux, Les alcaloïdes contenus dans les racines, l'écorce de l'arbre et l'écorce du fruit induisent le relâchement du ténia et de son emprise sur la paroi intestinale, ce qui facilite son expulsion [2].

Au Mexique, une décoction des fleurs est utilisée pour soulager l'inflammation oral et de la gorge. Les huiles essentielles des graines favorisent la régénération de l'épiderme. Les feuilles, les graines, les racines et l'écorce ont montré une activité hypotendue, antispasmodique dans l'essai biologique. Comme contre-indication; chez les femmes enceintes, la peau séchée de grenade produit des glaires, l'utilisation d'une dose de 5g maximum du fruit séché, broyé, en poudre, en décoction peut être légèrement toxique [12].

## **I.11. Toxicité de grenade**

L'écorce du grenadier, au XIXème siècle, souvent utilisée pour ses propriétés anthelminthiques, semble montrer quelques effets secondaires non négligeables. Ainsi, après administration d'une décoction d'écorce de racine, il fut observé, chez plusieurs patients, l'apparition de vertiges, d'étourdissements, d'une sorte d'ivresse, parfois des syncopes, et de légers mouvements convulsifs. Cependant, ces accidents étant fugaces et ne laissant aucune trace après leur manifestation, ils furent tolérés par les médecins de l'époque [13].

L'écorce est riche en tannins peut être nuisible pour l'organisme .Il a été dit que la punicalagine, le tanin ellagique hydrosoluble et le polyphénol antioxydant très abondant dans le jus de grenade étaient toxiques pour le bétail [14].

## **I.12. Les activités biologiques de l'écorce de grenade**

Au cours de ces dernières années, le nombre de publications scientifiques liées aux propriétés bénéfiques du grenadier pour la santé, a considérablement augmenté fournissant ainsi une base scientifique pour certaines utilisations en médecine traditionnelle [15]. Les écorces de grenade représentent environ 40% du fruit de grenade, ils sont riches en dérivés d'acide ellagique tels que les ellagitanins, la punicalagine et la punicaline. De plus, certains dérivés de l'acide ellagique (hexoside d'acide ellagique, -pentoside, etc.) [16].

L'étude d'Ambigaipalan et al a révélé que la peau de grenade contenait 79 composés phénoliques, dont 16 acides phénoliques, 12 flavonoïdes, 35 tanins hydrolysables, 8 proanthocyanidines et 8 anthocyanes. Les acides phénoliques étaient les principaux composés phénoliques de la peau de grenade, suivis des tanins hydrolysables, des proanthocyanidines et des flavonoïdes, principalement présents sous forme insoluble [17], [18].

### **I.12.1. L'activité antioxydante**

L'extrait de la peau de grenade EPG, tel qu'évalué par le test de FRAP (Ferric reducing antioxidant power), s'est avéré être la source la plus riche d'antioxydants parmi les

extraits de pelure des fruits les plus consommés. De même, il a démontré une activité antioxydante 2,8 fois plus élevée que les extraits de graines et de feuilles du fruit [19].

Dans l'étude comparative de l'extrait de l'écorce de grenade avec l'extrait de la pulpe, les résultats ont montré que l'extrait de l'écorce a une capacité antioxydante nettement plus élevée que l'extrait de pulpe en piégeage ou prévention contre l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyle et peroxyde, ainsi que l'inhibition des LDL induite par l'oxydation de  $\text{CuSO}_4$  [20].

La capacité antioxydante de l'écorce de la grenade était positivement corrélée avec leur contenu en polyphénol. Les polyphénols les plus abondants dans les écorces de la grenade sont les ellagitanins, qui sont des esters de l'acide hexahydroxydiphenique (HHDP), Punicalagine (PG) est le principal ellagitanin de la peau de grenade, et son contenu peut atteindre 65,75% du total des polyphénols écorce de grenade. PG, PL et AE existent naturellement dans la peau de grenade, ils auraient une gamme d'activités biologiques. AE, PL et PG présentent tous de fortes activités antioxydantes in vitro, mais leurs capacités antioxydantes relatives variaient de différents types de radicaux libres. AE est plus efficace que PL et PG dans la protection contre les dommages oxydatifs in vivo, en particulier pour les lésions intestinales [21].

Des études histopathologiques sur le foie indiquent que l'extrait méthanolique de l'écorce est capable d'améliorer / maintenir l'activité des enzymes hépatiques impliquées dans la lutte contre les ROS. En outre, l'alimentation d'EPG offre une protection contre la toxicité de tétrachlorure de carbone  $\text{CCl}_4$  [22].

### I.12.2. L'activité antibactérienne

Dans l'étude de Sharmin Soni et al [20], l'extrait de la peau de la grenade a montré une activité antibactérienne contre 16 souches de huit salmonelles différentes ; sérotypes *S. typhi* ATCC 19943, *S. paratyphi A*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhimurium*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. dublin* ATCC 39184, *S. derby* ATCC 6960, *S. choleraesuis* ATCC 7001, *S. gallinarum*, *S. gallinarum*, *S. gallinarum*, *S. gallinarum* et *S. gallinarum* ATCC 9184. [20].

Une autre étude a été réalisée par Ahmed et al [23], sur différentes concentrations d'extrait d'écorce de grenade (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 mg / ml). Les résultats ont montré une sensibilité importante de *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaricus*, *Candida tropicalis* et *Candida albicans* aux concentrations à partir de 0,3 mg / ml, sauf *E. coli* qui a montré une sensibilité significative à la concentration 0,2 mg / ml. De même, ils ont confirmé que les composés phénoliques sont les composés les plus importants contre les bactéries, parmi eux

l'acide gallique, qui présente la plus grande activité d'inhibition des bactéries testé. L'effet inhibiteur des composés phénoliques pourrait s'expliquer par l'adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes, substrat et privation d'ions métalliques. L'action inhibitrice de l'extrait d'écorce de grenade est également attribuée aux tanins ou polyphénols qui sont des composants majeurs de la peau de grenade [23].

### I.12.3. L'activité antifongique

Les études de Gil et ses collaborateurs [24] montrent que parmi les principaux composés bioactifs ayant une activité antifongique dans les écorces de grenade sont les ellagitannines et les punicalagines [24].

le travail de Kanoun et al [25] a montré que l'extrait éthanolique possède un effet inhibiteur contre les deux souches *Ascochyta rabiei* (pass) Labr et *Fusarium oxysporum* f.sp.*Radicis –lycopersici* en fonction de la relation dose- effet [25].

Glazer et al [26] ont examiné l'effet des extraits aqueux de l'écorce sur les taux de croissance de six champignons filamenteux pourris, *A. alternata*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *S. botryosum*, *B. cinerea* et *Fusarium spp*. Il s'est avéré que, considérant que les taux de croissance de *P. expansum* et *B. cinerea* étaient améliorée comme prévu, aucun effet n'a été observé sur la croissance de *P. digitatum*, tandis que les taux de croissance de *A. alternata*, *S. botryosum* et *Fusarium spp* ont été inhibés par la présence de l'extrait aqueux de l'écorce [26].

### I.12.4. Autres activités biologiques

#### I.12.4.1. Activité anticancéreuse

Le cancer décrire le phénomène de croissance cellulaire sans contrôle. De nombreux facteurs contribuent à son développement [27]. Les ROS représentent un facteur causal dans le développement du cancer. Des dommages importants aux ROS de l'ADN conduisent finalement à des mutations somatiques et tumeurs des organes.

Le tanin, l'acide ellagique, l'acide phénolique, l'acide caféique, la flavone œstrogénique, la lutéoline et l'acide gras triénoïque conjugué, l'acide punique, sont des composés à action anticancéreuse connus trouvés en quantités substantielles dans les pelures, le jus et l'huile de graines fruit de grenade [28].

EPG réduise le risque de cancer de la peau en inhibant la prolifération des mélanocytes et la synthèse de mélanine. Plusieurs études ont confirmé la capacité des ellagitannins (500–10 000 mg /l) de EPG à inhiber la génération de radicaux libres dans la peau humaine irradiée

aux UVA et UVB, ainsi la protéger de la Fragmentation de l'ADN, les brûlures cutanées et la dépigmentation. Dans des études antérieures, l'application d'EPG et la génistéine (isoflavone) présentent une inhibition significative plus élevée de cellules MCF-7, et effets cytotoxiques dans le traitement des cellules cancéreuses du sein. en outre, EPG a montré le potentiel d'inhibition de l'expression du gène rapporteur dépendant du facteur nucléaire kappa B (NF-kB) associée à la prolifération, l'invasion et la motilité dans les phénotypes agressifs du cancer du sein [19].

#### **I.12.4.2. Activité anti-inflammatoire**

Les troubles inflammatoires sont dus à la production excessive de médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, leukotriène B4 et PAF, l'activité des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, et la production excessive d'espèces d'oxygène réactives (ROS). L'extrait aqueux de la peau de grenade EAPG est largement utilisé pour traiter les troubles de l'inflammation, les ulcères et les infections [29].

L'étude *in vitro* de Bachoual et al [29], a prouvé que l'EAPG n'a eu aucun effet sur les concentrations de superoxyde ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais il a été fortement inhibé l'activité MPO. Ces résultats suggèrent que la PGE inhibe directement une cible commune finale comme la NADPH oxydase ou la MPO, ou qu'elle récupère la ROS. L'effet inhibiteur de l'EAPG sur l'activité du MPO pourrait ainsi expliquer son action anti-inflammatoire *in vivo* [29].

Selon l'étude *in vivo* d'un groupe de chercheurs, l'administration de l'EPG (6 mg/jour/souris) durant 4 semaines réduit la cholestérolémie (cholestérol total et LDL), et amenuise l'expression de gènes inflammatoires (COX-2 et les interleukines 1b et 6) dans le colon et le tissu adipeux viscéral. Ces résultats révèlent l'intérêt de la consommation d'extrait de grenade riche en polyphénols dans le contrôle des désordres métaboliques et inflammatoires associés à l'obésité [30].

#### **I.12.4.3. L'activité antidiabétique**

Des études préliminaires ont montré qu'EPG possède une activité d'abaissement de la glycémie. Lors du traitement d'un groupe diabétique avec EAEG, une amélioration de poids corporel a été observée, ça explique l'activité antidiabétique d'EEG. Ils ont aussi constatés que l'EAEG réduit de manière significative la glycémie et développe le taux d'insuline et le nombre de cellules  $\beta$  des rats diabétiques. L'alloxan induit la production de radicaux libres et provoque de l'énergie tissulaire. Le pancréas est particulièrement sensible à l'action de

l'alloxane sur les radicaux libres. EAEG peut agir comme piègeur de radicaux libres et protéger les cellules  $\beta$  des dommages [31].

## Références

- [1]- L'encyclopédie visuelle des aliments .livre. Québec Amérique (EDS), Singapour, p 685
- [2]- H. Bakhtaoui, Mémoire de Mastère, Effet des extraits phénoliques des écorces de grenade (*Punica granatum*. L) sur l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt, Université de Mostaganem, 2019, p5, 6, 7, 14, 17, 18,19
- [3]- P. Cauchard, Mémoire de Magistère, La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement, Agrocampus d' Angers, 2013, p6
- [4]- E. Wald, Thèse de Doctorat, Le grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes, Université de Lorraine, 2009, p9, 12, 14, 20, 52,53
- [5]- H. Moualkia, M. Gourmati, Mémoire de Mastère, Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydante et anti- inflammatoire de plantes *Punica granatum* L et *Lawsonia inermis*, Université de Constantine, 2015, p13
- [6]- D. Benmeziane, B. Bedja, Mémoire de Mastère, effet de l'extrait acétonique de l'écorce de deux variétés de grande (quares et lahlou) sur *candida albicans* Université de Béjaia, 2012, p3, 4, 7,9
- [7]- M. Bdoudjenah, L. Merzouge, Mémoire de Mastère, Etude quantitative des polyphénols et le pouvoir antibactérien des extraits de l'écorce de fruit de grenadier (*Punica granatum* L.) Université de Mostaganem, 2016, p 24, 26,27
- [8]- C. Sanaa, Mémoire de Mastère, Effet de l'Irradiation sur les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes & cytoprotectrices de l'écorce de *Punica granatum*, Université de Carthage, 2013, p 17, 19, 21, 22,23
- [9]-S. Haddou, A. Messika, S. Nazoun, Mémoire de Mastère, Étude de l'effet antibactérien in vitro des extraits polyphénolique de la peau de grenade «*Punica granatum*» vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu Université d'El-Blida-1-, 2018, p6, 7, 8
- [10]- R. Miloud, Mémoire de Mastère, Contribution à la valorisation d'une plante médicinale de grenadier (*Punica granatum* L) de la région de Biskra, Université de Biskra, 2019, p13, 14,15
- [11]- H. Benyahia, F. Hadbi, Mémoire de Mastère, Microencapsulation de la poudre de l'écorce de grenade(PEG) par coacervation complexe (pectine/caséine): Essai d'incorporation dans le yaourt, Université de Boumerdes, 2016, p8, 9
- [12]- L. Belaid, Mémoire de Mastère, Conservation de la margarine par des extraits de grenade (*Punicagranatum* L.), Université de Bejaia, 2016, p9

- [13]- M. R-G-Y Athmen, Thèse de Doctorat, L'effet de *Punica granatum* Sur la Flore gastrique ; étude in vitro et in vivo chez le rat, Université de Mostaganem, 2019, p9
- [14]- S. Bendjabeur, Mémoire de Magistère, Evaluation de pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *Punica granatum* L.) en vue de leur utilisation alimentaire, Ecole national supérieur agronomique, El Harrach Alger, 2012, p44
- [15]- N. Douaouri, Thèse de Doctorat, Contribution à une étude phytothérapeutique, antiinflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo, Université de Mostaganem, 2018, p39, 40
- [16]- M. Çam, Y. Hıslı, Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels, Food Chemistry 123 : 878–885, 2010
- [17]- Z. Derakhshan, M. Ferrante, M. Tadi, F. Ansari, A. Heydari, M. S. Hosseini, G. Oliveri Conti, E. Khalili Sadarabad, Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds, Food and Chemical Toxicology, 114 :108-111, 2018
- [18]- P. Ambigaipalan, A-C De Camargo, F. Shahidi, Phenolic compounds of pomegranate by products (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. Journal of agricultural and food chemistry. 64: 6584-6604, 2016
- [19]- T. Ismail, P. Sestili, S. Akhtar, Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects, Journal of Ethnopharmacology 143: 397–405, 2012
- [20]- S. Soni, V. Lambole, D. Modi, B. Shah, Phytopharmacologie of *Punica Granatum* linn. – a review, pharma science monitor, 3 : 2222-2245, 2012
- [21]- S.Yu-qing<sup>1</sup>, T. Xin, M. Xiao-ming, X. Zi-wei<sup>1</sup>, W. Tian<sup>1</sup>, In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin, Journal of Integrative Agriculture, 16(8): 1808–1818, 2017
- [22]- K-C. Murthy, G-K. Jayaprakasha, R-P. Singh, Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in Vivo Models, agricultural and food chemistry, 50: 4791-4795, 2002
- [23]- S-A. Ahmed, N.H. Abood, A-A. Al-Janabi, Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extract on Some Pathogenic Microorganisms, Eng. & Tech. Journal, 31 : 316-324, 2013
- [24]- M-I. Gil, F-A. T. Barbera'n, B-H. Pierce, D-M. Holcroft, A-A. Kader, Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing, J. Agric. Food Chem., 48 : 4581–4589, 2000

- [25]- K. Kanoun, B. Abbouni, M.L. Bénine, F –Z. Benmahdi, B. Marouf, Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica Granatum* linn sur deux souches phytopathogènes *Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr. et *Fusarium Oxysporum* F.SP.Radiciis –Lycopersicy, *European Scientific Journal*, 10 (12): 301-315, 2014
- [26]- I. Glazer, S. Masaphy, P. Marciano, I. Bar-Ilan, D. Holland, Z. Kerem, R. Amir, Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts, *agricultural and food chemistry*, , 60 : 4841–4848, 2012
- [27]- G. Aiche– Iratni, Thèse de Doctorat, activités biologiques d'intérêt médical d'extraits de feuilles *Pistacia lentiscus* et d'*Origanum majorana* Université de Tizi-Ouzou, 2016, p12
- [28]- E. Lansky, G.Harrison, P.Froom, W. Jiang , Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel, *Investigational New Drugs* 23: 121–122, 2005
- [29]- R. Bachoual, W. Talmoudi, T.Boussetta, F. Braut, J. El-Benna, An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1224–1228, 2011
- [30]- AM. Neyrinck, VF. Van Hée, F. De Backer, P. Cani, N. Delzenne, Effets anti-inflammatoires et hypolipémians des polyphénols de grenade chez la souris obèse : implication potentielle du microbiote intestinal, *Diabetes & Metabolism*, 38 : P270, 2012
- [31]- E. Khalil, Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats ,*The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 16 : 92 – 99, 2004

# *Chapitre II*

### II.1.Introduction

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, terpènes, les alcaloïdes) qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines différents. Dans ce chapitre, nous avons essayé de les définir, classer, et présenter quelques activités biologiques et propriétés de ces composés.

### II.2.Les composés phénoliques

#### II.2.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [2].

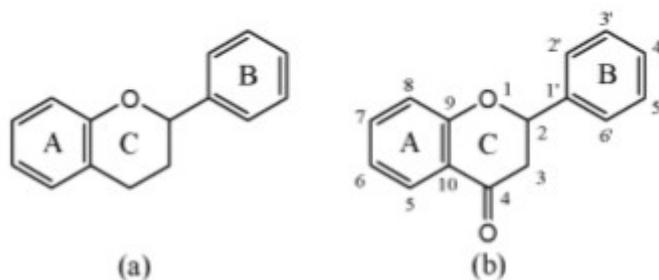
#### II.2.2.Classification

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les flavonoïdes.
- Les tanins.
- Coumarines.
- Les acides phénoliques.

#### II.3.2.1.Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux (**Figure 4**) : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines coumestanes, roténoïdes etc. Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 [1].



**Figure 4** : Motif flavan (a) et flavon(b) et numérotation systématique

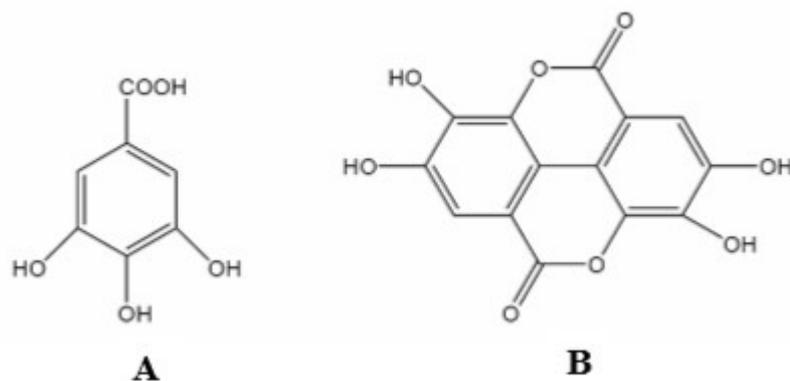
Les flavonoïdes Présentes dans la plupart des plantes, Ils sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie. Des flavonoïdes comme l'hésperidine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. Les relations structure activités antioxydantes des flavonoides et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation [3].

#### II.2.2.2.Les tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire compris entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines. On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique:

##### II.2.2.2.1.Tannins hydrolysables

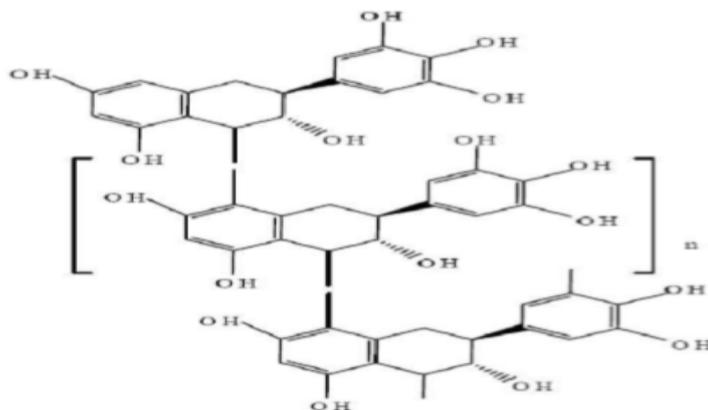
Ils sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Figure 5**).



**Figure 5** : Structure chimique d'acide gallique (A) et acide ellagique (B)

#### II.2.2.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères [6].



**Figure 6 [5]** : Structure des tannins condensés

#### II.2.2.3. Les coumarines

L'expression de coumarines (**Figure 7**) a été introduite en 1820 par Vogel pour désigner tout hétérocyclique ayant un atome d'oxygène. Ce sont des substances phénoliques obtenues par fusion de benzène avec le  $\alpha$ -pyrone, aboutissant à la formation d'un noyau benzopyrane. Les coumarines sont fréquemment hydroxylées en position 7 et ces hydroxyles peuvent être méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique [5].

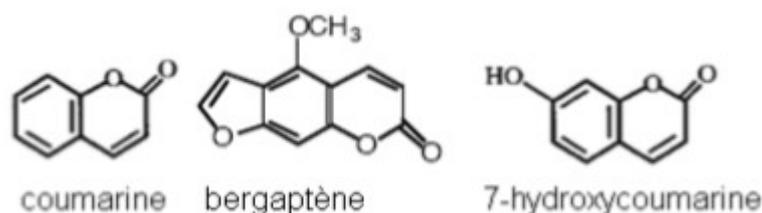


Figure 7 : Quelques exemples de coumarines

#### II.2.2.4. Les acides phénoliques

La dénomination générale d'acides phénoliques englobe, d'une part les acides benzoïques en C6- C1 et d'autre part les acides cinnamiques en C6-C3. Les principaux acides benzoïques sont : l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique et l'acide gallique. Ce dernier est largement répandu comme constituant des tannins hydrolysables. Les structures des principaux acides benzoïques sont données dans la (Figure 8) et (Tableau 2).

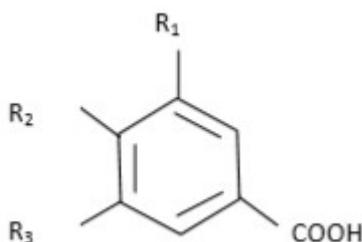


Figure 8 : Structure des acides benzoïques.

Tableau 3 : Structures de quelques acides benzoïques.

Les dérivés de l'acide benzoïque	Substitutions		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Acide p-hydroxy benzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH
Acide vanillique	CH <sub>3</sub> O	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide syringique	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O

Les principaux acides benzoïques sont : l'acide hydrocaféique, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide trans-cinnamique. Aux acides cinnamiques se rattachent les coumarines, constituées également par un élément en C6-C3, dans lequel la chaîne en C3 est sous forme d'un hétérocycle oxygéné (Figure 9) [5].

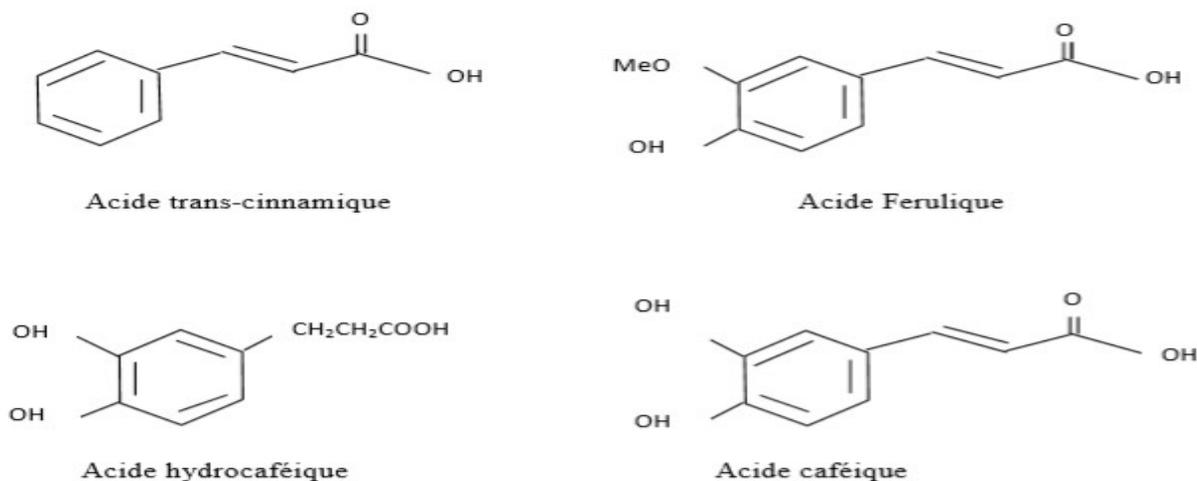


Figure 9 : Structures de quelques acides cinnamiques

### II.3. Les composés azotés

#### II.3.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules de structures complexes cycliques et azotées, relativement stables plus ou moins basiques. Les alcaloïdes sont insolubles dans l'eau [4].

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Ils peuvent être classés en fonction de leur précurseur. On distingue ainsi trois grandes classes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent un atome d'azote dans un hétérocycle [4]. On distingue :

##### II.3.1.1. Les alcaloïdes vrais

Ils présentent le plus grand nombre d'alcaloïdes. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un azote dans un hétérocycle. Ils possèdent un large spectre d'activité biologique [4].

##### II.3.1.2. Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne dérivent pas d'acides aminés et pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques [4].

##### II.3.1.3. Les pseudo-alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes sont des acides aminés simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique.

Les alcaloïdes les plus utilisés comme médicaments dans la pharmacopée usuelle sont des dérivés de la morphine utilisés pour leur propriété analgésique [4].

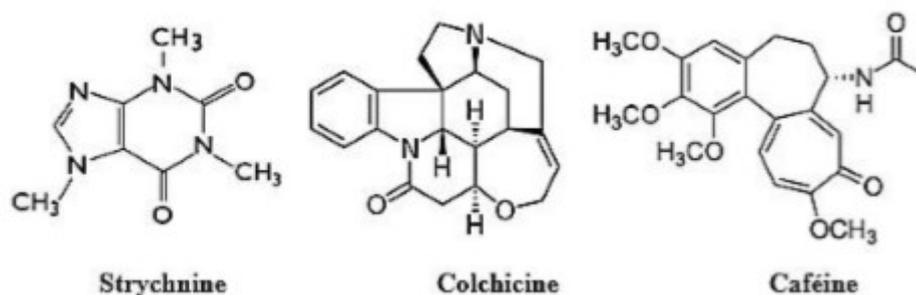


Figure 10 [9] : Quelques exemples d'alcaloïdes

### II.4. Les terpénoïdes

Les terpènes ou isoterpénoïdes sont des composés issus de la condensation de l'isoprène, cycliques ou acycliques. Ils peuvent être classés en fonction du nombre de carbone en mono terpène, sesquiterpène, di terpène, tri terpène, et tetraterpènes, au-delà, on parle de poly terpène. Ils jouent des rôles très variés pour la plante. Ce sont des composés protecteurs des végétaux face aux stress [4].

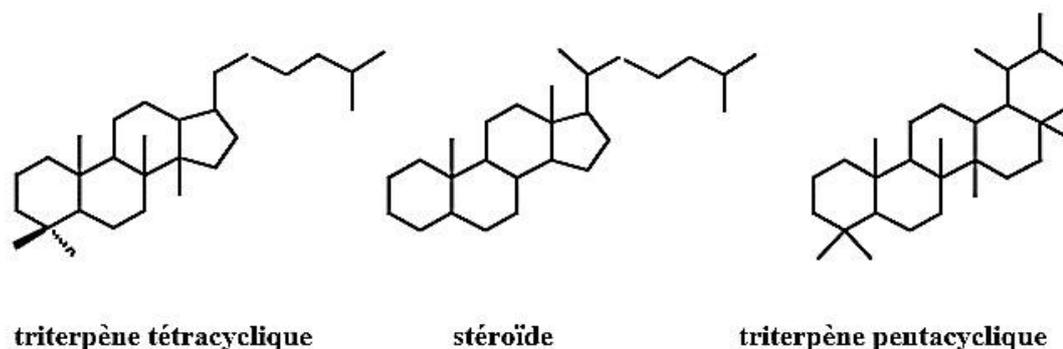


Figure 11[9] : quelques structures des terpènes

### II.5. Les huiles essentielles

Le terme huiles essentielles, également appelées huiles volatiles ou huiles étherées, est utilisé pour désigner les extraits de plantes aromatiques. Il s'agit d'un mélange de nombreux composants tels que les terpènes, les amines, le soufre, les composés halogénés (chez les algues marines), les hydrocarbures non terpéniques, et d'autres (les acides, les alcools, les aldéhydes, les phénols ...etc.). Ce sont des composés à faible solubilité dans l'eau, mais solubles dans les graisses, l'alcool, les solvants organiques et d'autres substances hydrophobes et sont généralement liquides à température ambiante. Ils sont stockés dans des cellules

spécialisées des plantes, généralement des cellules sécrétrices ou des conduits (les conduits à résine), des glandes ou trichomes (poils glandulaires) et peuvent être extraites des feuilles, fleurs, bourgeons, graines, fruits, racines, bois ou de l'écorce des plantes. Les huiles essentielles sont souvent décrites comme des métabolites secondaires des plantes. [7].

## II.6. quelques activités biologiques et les propriétés des composés **phénoliques**

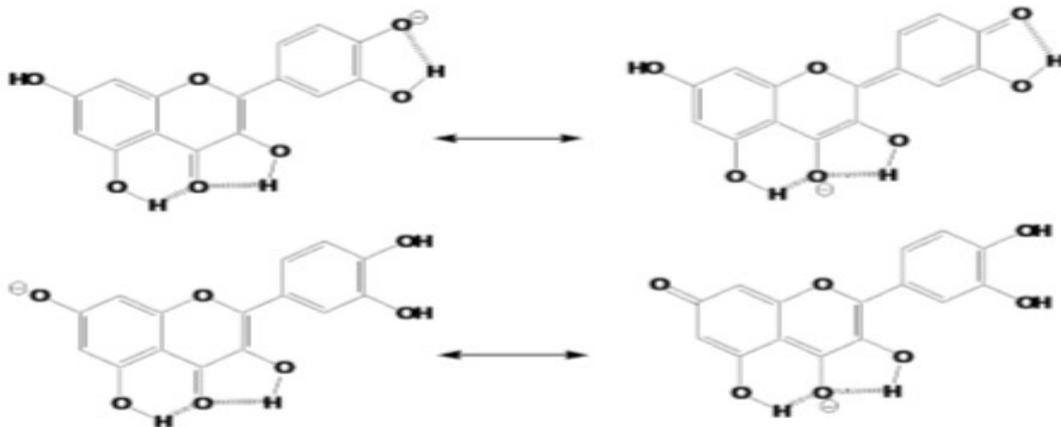
### II.6.1. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

#### II.6.1.1. Réactivité des composés phénoliques

Les polyphénols sont constitués d'au moins un cycle benzénique substitué par une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Leur réactivité est alors très fortement influencée par les propriétés chimiques du cycle, ainsi que par la présence et la nature des substituants. En effet, la délocalisation des électrons à l'intérieur du cycle est énergétiquement favorable. Elle affecte la réactivité des composés aromatiques en favorisant le maintien de l'aromaticité par des phénomènes d'induction électronique, d'hyperconjugaison, de résonance et d'encombrement stérique. Les polyphénols réagissent alors de manière très spécifique dans des réactions de type acido-basique, d'oxydo-réduction, de complexation, de tautomérie ou d'isomérisation qui seront à l'origine de leurs propriétés biochimiques [8].

La première propriété des polyphénols à considérer est leur acidité. En général, les composés phénoliques sont des acides faibles ( $pK_a \leq 10$ ) avec des  $pK_a$  plus faibles que ceux des alcools. En effet, l'ion phénolate qui se forme à la suite de la libération d'un proton du groupement phénolique est relativement stable grâce à l'existence de plusieurs structures mésomériques comme le montre la (**Figure 12**) dans le cas de la quercétine [8].

Par ailleurs, le  $pK_a$  des composés phénoliques dépend fortement de la structure globale de la molécule ainsi que de la nature des substituants sur le noyau aromatique. Par conséquent, en milieu aqueux, les composés phénoliques seront soit sous forme neutre soit sous forme anionique pour des pH usuels ( $3 \leq pH \leq 10$ ). Ainsi en jouant sur le pH du milieu d'extraction, en fonction des  $pK_a$  des composés polyphénoliques, il est possible d'extraire sélectivement les polyphénols dans la phase aqueuse ou dans des solvants organiques [8].

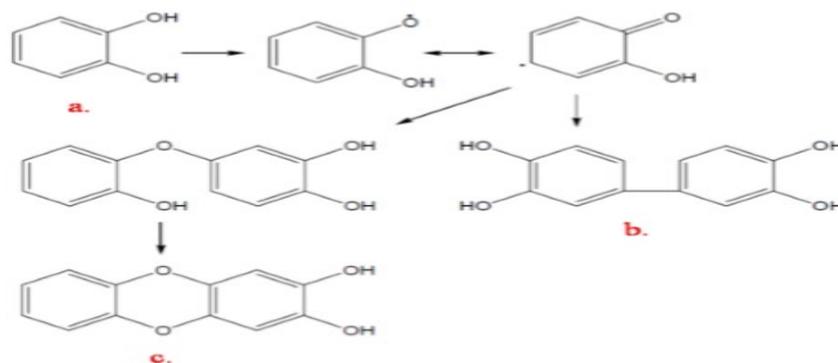


**Figure 12:** Les différentes formes mésomériques et les liaisons hydrogènes intramoléculaires intervenant dans la stabilisation d'un ion phénolate de la quercétine

**II.6.1.2. Stabilité des polyphénols**

La capacité des polyphénols à être facilement oxydés conditionne leur stabilité et leur évolution dans les produits alimentaires. En effet, l'oxydation des polyphénols peut être responsable du brunissement des tissus. Ce phénomène apparaît souvent chez les fruits après les avoir coupés. L'oxydation peut également être à l'origine de la formation de métabolites toxiques pour les plantes et animaux. Mais ces composés toxiques peuvent également inhiber le développement de microorganismes pathogènes.

Hormis leur structure, un grand nombre de facteurs physiques ou biologiques influence la stabilité des polyphénols comme la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme (tyrosinase, peroxydase, polyphénol oxydase), d'ion métallique ou d'oxydant dans le milieu. En effet, les principales voies d'oxydation des polyphénols sont les phénomènes d'auto-oxydation et d'oxydation enzymatique [8].



**Figure 13 [8] :** Auto-oxydation du catéchol (a) et formation de dimères (b,c)

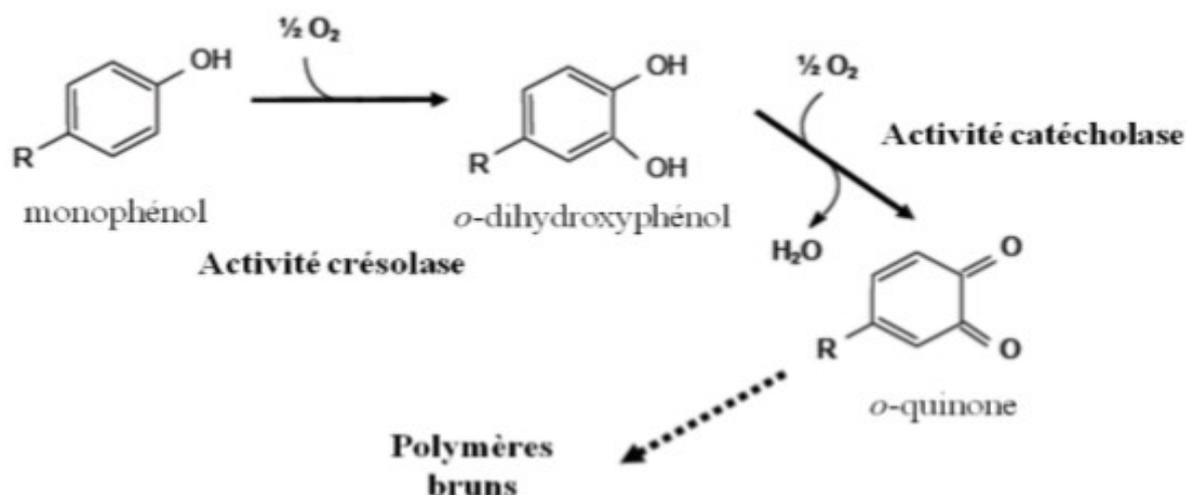


Figure 14 [8] : Oxydation des polyphénols par la polyphénolase

### II.6.1.3. Les phénomènes de complexation

Les polyphénols sont capables d'interagir et de se complexer avec diverses biomolécules telles que les protéines et les polysaccharides. La complexation peut s'effectuer d'une part par les groupements phénoliques (fonction OH) via des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et, d'autre part, par les noyaux aromatiques via des interactions de van der Waals et des effets hydrophobes. Les polyphénols peuvent aussi former des complexes stables avec les métaux de transition ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), bien que pouvant conduire parfois à l'oxydation du polyphénol. Cette capacité des polyphénols à complexer les protéines et les métaux de transition est probablement à l'origine de leur inhibition de nombreuses enzymes. Par ailleurs, la complexation des protéines salivaires avec les polyphénols agit directement sur les propriétés organoleptiques du vin, en particulier pour la sensation d'astringence [8].

### II.6.2. activités biologiques des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux [12]. Ils peuvent en effet intervenir dans:

- La fertilité, la pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine [12].
- Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [12].

- De nos jours, les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose [12].
- Ils diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires renforçant leur résistance, ils agissent contre les radicaux libres [12].
- Plusieurs études épidémiologiques et cliniques attestent le rôle incontestable des composés phénoliques dans l'inhibition d'innombrables bactéries pathogènes voir même toxiques, fongicides et antibiotiques. Ces métabolites secondaires peuvent conduire à la diminution de l'activité enzymatique ainsi qu'à la croissance microbienne [8].

### II.7. Quelques activités biologiques et propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, à forte dose sont très toxiques. Ce sont des composés azotés naturels et dont le goût est amer. Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Les alcaloïdes issus du métabolisme des acides aminés sont des alcaloïdes vrais [11].

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain. Les pyrrolizidines et les tropanes sont les plus importants. Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présents dans les plantes qui font partie des familles botaniques Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae et Orchidaceae [11].

Aussi, comme alcaloïdes naturelles, La cocaïne est un alcaloïde peu abondant présent dans les Erythroxyllum. La source la plus importante de ce composé est l'Erythroxyllum coca, utilisé depuis l'antiquité comme anesthésique local, dans le domaine de l'odontologie. Aujourd'hui, en raison de ses propriétés neurotoxiques elle a été remplacée par d'autres drogues moins toxiques mais au cours des interventions chirurgicales des yeux, de l'appareil auditif, du nez et de la gorge, la cocaïne est encore largement utilisée [11].

La lobéline, extraite de la Lobelia inflata, est utilisée dans les préparations pour lutter contre le tabagisme. L'extrait brut de la plante est largement employé dans le traitement de l'asthme et de la bronchite [11].

## II.8. Quelques activités biologiques et propriétés des terpènes

Les terpènes sont généralement lipophiles [4]. Ils sont universellement présents en faible quantité dans les organismes vivants, où ils jouent de nombreux rôles essentiels dans la physiologie des plantes ainsi que des fonctions importantes dans toutes les membranes cellulaires [13]. Ces substances sont aussi émises à des taux pouvant influencer la composition chimique de l'atmosphère. Il convient ainsi, comme pour toute substance bioactive et thérapeutique, de tenir compte de la tolérance par l'homme de ces substances naturelles, très bien étudiée et référencée dans plus de 1800 articles. Par ailleurs, pour les effets pharmacologiques plus de 2 000 publications depuis 1995 ont été consacrées aux propriétés des terpènes telles que les propriétés anti-inflammatoires, décongestionnantes, antiseptiques, antivirales, antifongiques, anti-parasitaires, mucolytiques, cholagogues, cicatrisantes [14]. Le tableau ci-dessous représente quelques activités biologiques des terpènes

**Tableau 4 :** exemples des activités biologiques de quelques terpènes

Terpènes	Activités biologiques	Référence
<b>mono-terpènes</b>	Biologiquement actifs (bactériostatiques, signalisation plantes/insectes).	[9]
<b>tri-terpènes</b>	Ils peuvent être utilisés comme des cardiotoniques, des sapogénines spirostanoïdes qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, ou comme anti-inflammatoires	[9]
<b>tétra-terpènes</b>	Des pigments aux propriétés antioxydantes comme le lycopène de la tomate.	[9]
<b>Sesquiterpènes</b>	De nombreuses lactones sesquiterpéniques sont antibactériennes antifongiques, certaines structures sont antiparasitaires	[13]

## II.9. Quelques activités biologiques et propriétés des huiles essentielles

### II.9.1. Propriétés physicochimiques

Toutes les HEs sont volatiles, odorantes et inflammables, ils sont généralement incolores ou de couleur jaune pâle à l'état liquide à température ambiante. Leurs densités sont souvent inférieures à 1. Seules trois HEs officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HEs de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les alcools et dans les majorités des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation [9].

### II.9.2. Activité biologique des huiles essentielles

Dans le domaine de la santé et de la médecine, les huiles essentielles ont un large éventail de propriétés biologiques, telles que antimicrobienne, anticancéreuse, analgésique, antioxydante, anti-inflammatoire, d'autres possèdent des effets immuno-modulateurs et antiplaquettaire, et les activités anti-thrombotiques [7]. Le tableau ci-dessous représente quelques Exemples des activités biologiques de quelques composés des HEs.

**Tableau 5** : Propriétés de quelques composés des huiles essentielles [7].

Composés	Propriétés
$\Delta$ -Limonène	Anti-tumoral
Mycènes	Analgésique
$\beta$ -Caryophyllène	Anti-inflammatoire
Linalool	Sédatif
Géraniol	Antifongique
Terpinène-4-ol	Actif contre <i>Pseudomonas vaginalis</i>
Farnesol	Actif contre <i>Trichomonas vaginalis</i>
Thymol	Actif contre <i>Cryptococcus neoformans</i>
Eugénol	Sédatif et vasodilateur
Carvacrol	Anti convulsif et antibactérien
Citronellal	Antifongique et insecticide
1,8 cinéole	Anti-inflammatoire et expectorant
Népetalactone	Analgésique et sédatif

*Références*

- [1]- J. Hadj Salem, Thèse de doctorat, Extraction, Identification, Caractérisation Des Activités Biologiques de Flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique, Institut national polytechnique de Lorraine, 2009, p 22-23
- [2]- S. Athamena, Mémoire de Magister, Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique, Université de Batna, 2009, p 17
- [3]- A. Diallo, Thèse de doctorat, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae), Université de Bamako, 2005, p 14-15
- [4]- G. Aiche – Iratni, Thèse de doctorat, Activités biologiques d'intérêt médical d'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* et d'*Origanum majorana*, Université de Tizi-Ouzou, 2016, p 10-11
- [5]- N. Boussalah, Mémoire de Magister, Propriétés antioxydantes de deux variétés de grenade (*Punica granatum* L.) de la région de Béjaïa, Université de Bejaïa, 2010, p 23-24-31
- [6]- N. Belyagoubi-Benhammou, Thèse de doctorat, Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Université de Tlemcen, 2012, p 11-12
- [7]- A. Bouyahyaoui, Thèse de Doctorat, Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des Cupressacées de la région de l'Atlas algérien, Université de Mostaganem, 2017, p 18-19-22-23
- [8]- N. Boussetta, Thèse de Doctorat, Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne, Université de Technologie Compiègne, 2010, 13-14- 34-35-36-37-38
- [9]- H. Beddiar, Mémoire de Master, Etude de « *Juniperus phoenicea* L » de la région de Tébessa : Compositions chimiques, activités antioxydantes et activités microbiologiques, Université de Tébessa, 2016, p 13 -14- 26-27
- [10]- A. Mekhoukhe, Mémoire de Magister, Etude de certaines activités biologiques des composés phénoliques extraits de cinq plantes médicinales de la région de Bejaïa, Université de Bejaïa, 2008, p 39
- [11]- M. Zohra, Thèse de Doctorat, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Université de Tlemcen, 2013, p 24-25

[12]- L.Bellebcir, Mémoire de Magister, Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales, Université de Constantine, 2008, p 25-26-27

[13]- O. Ben-Aissa, Thèse de Doctorat, Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique, Université de Constantine, 2011, p 64,68

[14]- N. Soualeh, R. Soulimani, Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts, Phytothérapie, 14 : 44 – 57, 2016

# *Partie pratique*

# *Chapitre III*

### III.1.Introduction

La phytochimie c'est la science qui étudie surtout les métabolites secondaires des végétaux, ainsi que les méthodes d'analyses, d'extraction des substances issues des plantes et l'évaluation de leurs activités.

Dans ce travail, Nous avons appliqués les méthodes de la phytochimie sur l'écorce de grenade, en utilisant les techniques de l'extraction et l'évaluation de l'activité anti-oxydante.

### III.2.Matériels et méthodes

#### III.2.1.Matériel végétal (l'écorce de la grenade)

Nous avons utilisé les écorces de grenade séchée sous forme de poudre. On a obtenue 1,5 kg de l'écorce de grenade à partir de 6 kg de fruit frais. Après le séchage à température ambiante et à l'abri des rayons de soleil pendant 25 jours, le nettoyage et le broyage de l'écorce on a obtenue 900 g de poudre fine.



**a** : Les écorces de grenade séchée



**b** : Les écorces de grenade en poudre

**Figure 15** : le matériel végétal

#### III.2.2.Méthodes

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire de chimie de l'université de Larbi Tébessi-Tébessa, et en collaboration avec le laboratoire des molécules bioactives et applications.

### III.2.2.1. Les tests de présences

L'objectif de ces tests est la détection de molécules actives dans l'écorce de grenade. Ils sont basés sur des réactions de coloration, précipitation, solubilité aussi la révélation sur UV.

Les tests sont réalisés par deux extraits, l'un est obtenue par le mélange de 10 g de l'écorce de grenade séchée avec 60 ml de l'eau distillée bouillie à reflux pendant 1 heure, et l'autre par le mélange de 10 g de l'écorce de grenade séchée et 60 ml de l'éthanol aussi bouillie à reflux pendant 1 heure.



Figure 16 : montage à reflux

#### III.2.2.1.A. Les tests réalisés sur l'extrait de l'eau chaude

##### A.1. Détection de l'amidon

Dans un tube à essai on mélange 5 ml de l'extrait avec 10 ml de la solution de chlorure de sodium saturée, le tube placé dans un bain marie jusqu'à l'ébullition, puis on ajoute le réactif de lugol. L'apparition de la couleur bleu violacée indique la présence de l'amidon [1].

##### A.2. Détection des saponosides

On mélange 2 ml de l'extrait avec 1 ml d'eau puis on agite fortement. La hauteur de la mousse après 20 min évalue la présence des saponosides [2].

- Si la hauteur de la mousse est moins de 1 cm les saponosides sont légèrement présents dans l'extrait
- Si la hauteur de la mousse est de 1 cm ou plus on dit que le test des saponosides est positif.

### **A.3.Détection d'alcaloïde**

On met le mélange de 1ml de l'extrait avec 1ml d'acide chlorhydrique HCl à 1%, dans un bain marie pendant quelque minutes. Après la filtration on ajoute le réactif de Dragendorff à 1 ml de filtrat. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes [3].

### **A.4.Détection des coumarines**

On met 1 ml de l'extrait dans un tube à essai couvert d'un papier filtre imbibé d'une solution d'hydroxyde de sodium NaOH, le tout est chauffé pendant quelques minutes dans un bain marie, ensuite on ajoute 0.5 ml de l'ammoniaque NH<sub>4</sub>OH à (10 %). On met deux taches de la solution sur un papier filtre, et on l'examine sous la lampe UV. la présence des coumarines est indiquée par la fluorescence des taches [4].

## **III.2.2.1.B.Les tests réalisés sur l'extrait éthanoïque**

### **B.1.Détection des flavonoïdes**

C'est une réaction de coloration effectuée en mélangeant 5 ml de l'extrait avec 1 ml de HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge-rose indique la présence des flavonoïdes [2].

### **B.2.Détection des tanins galliques**

La détection des tanins galliques est réalisée en ajoutant 1 à 2 gouttes de la solution de chlorure de fer (III) FeCl<sub>3</sub> (1%) à 1 ml de l'extrait et 2 ml de l'eau. L'apparition de la couleur bleu-noir confirme la présence des tanins gallique [2].

### **B.3.Détection des composés réducteurs**

La détection est effectuée en mélangeant 1 ml de l'extrait avec l'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling. la formation d'un précipité rouge-brique confirme la présence des composés réducteurs [1].

### **B.4.Détection des stérols et triterpènes**

#### **L'essai 1 :**

Pour les stérols, leur détection est effectuée par l'évaporation de 10 ml de l'extrait à sec, le reste de l'extrait est solubilisé par 10 ml de chloroforme anhydre. On prend 5 ml de la solution chloroformique et le mélanger avec 5 ml de l'anhydre acétique, et on ajoute quelques

gouttes de l'acide sulfurique concentré. L'apparition de la coloration violacé fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21 °C) après quelques minutes dans le mélange confirme que le test est positif [1].

#### L'essai 2 :

Pour les hétérosides stéroïdiques et les triterpéniques, leur détection est effectuée par l'évaporation de 10 ml de l'extrait à sec, le reste de l'extrait est solubilisé dans un mélange anhydre acétique/chloroforme (5/5 : V/V). Le mélange est filtré, et traité par quelques gouttes d'acide sulfurique. L'apparition de la coloration verte-violette indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques [3].

#### III.2.2.2.Extraction (solide-liquide)

Les tests de présences qui nous avons fait indique que l'écorce de grenade est riche en plusieurs familles de composés qui ont des polarités différentes, c'est pour cela nous avons utilisé un solvant très polaire « l'eau distillé » pour une macération garantit la meilleure récupération des composés chimiques. 900 g de l'écorce de grenade en poudre a été macéré dans 5 l de l'eau distillée pendant 24 H. Cette opération a été répétée 3 fois, avec un volume de macération de 3 L pour la deuxième macération, et la troisième macération, suivi d'une filtration sur coton de chaque macérât. L'extrait brut qui résulte de la macération est évaporé à sec. Après avoir pesé l'extrait, on a calculé le rendement de l'extraction.



1- macération



2-filtration



3-évaporation

Figure 17 : les étapes de l'extraction solide-liquide

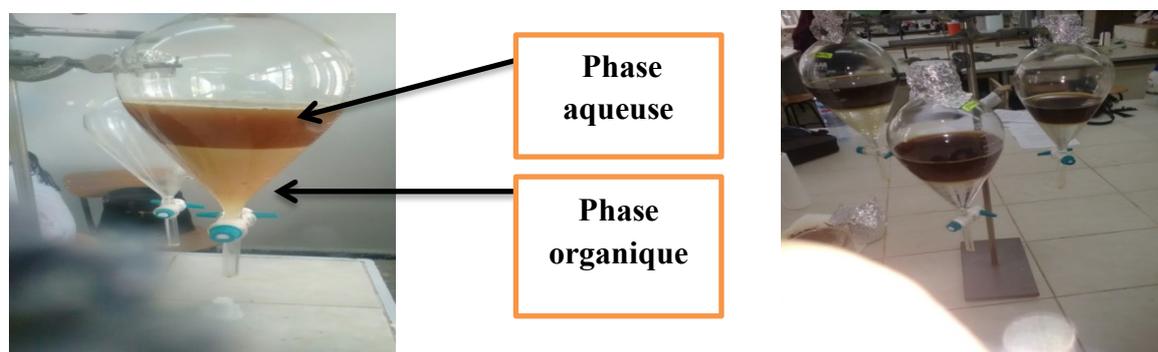
#### IV.2.2.3.Fractionnement (extraction liquide-liquide)

- On a dissous l'extrait sec dans 3 L d'eau distillé.
- La première extraction est réalisée par l'éther de pétrole. Nous avons remarqué que la quantité des produits extraits est pratiquement nulle.



**Figure 18 :** extraction liquide-liquide par l'ether de pétrole

- Ensuite on a procédé à une deuxième extraction liquide-liquide par le dichlorométhane DCM 3 fois ( $V(\text{extrait de l'eau}) = 400/V(\text{solvant}) = 150$ )

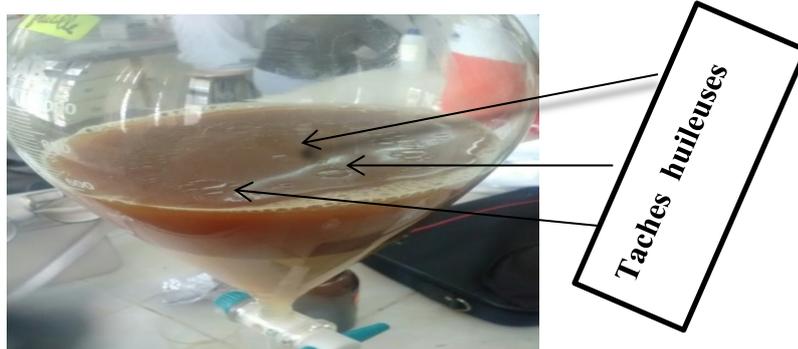


**a-1<sup>er</sup> extraction**

**b-2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> extraction**

**Figure 19 :** extraction liquide-liquide par le DCM

**Remarque :** La surface de la phase aqueuse contient des taches huileuses, cela peut signifier que l'extrait brut de l'écorce de grenade peut contenir certains types des huiles.



**Figure 20 :** la surface de la phase aqueuse

- La dernière extraction par l'acétate d'éthyle 3 fois ( $V_{\text{extrait de l'eau}} = 400/V_{\text{solvant}} = 150$ )

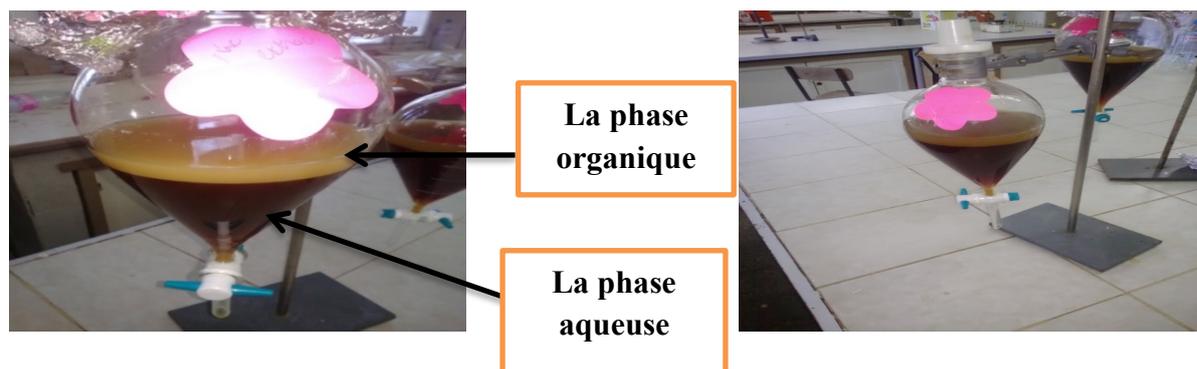
a-1<sup>er</sup> extractionb-2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> extraction

Figure 21 : l'extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle

- Tous les extraits obtenus sont évaporés sous vide à sec.

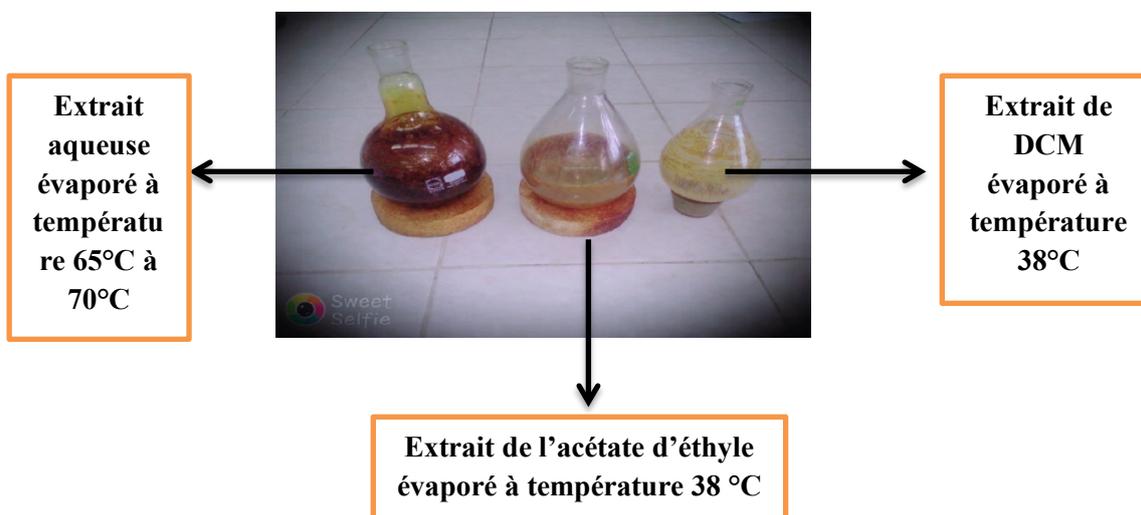


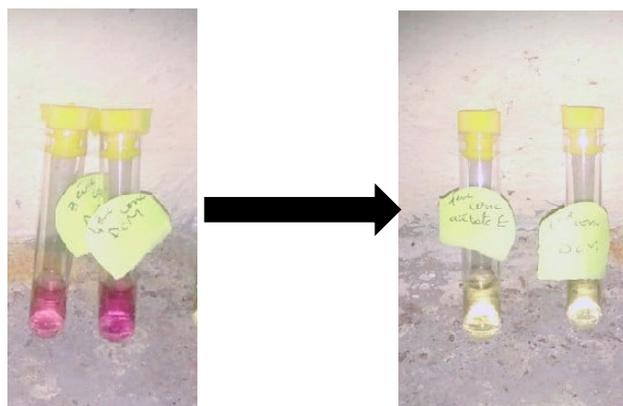
Figure 22 : les extraits secs obtenus depuis la fractionnement

### III.3.Evaluation de l'activité antioxydante

#### III.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

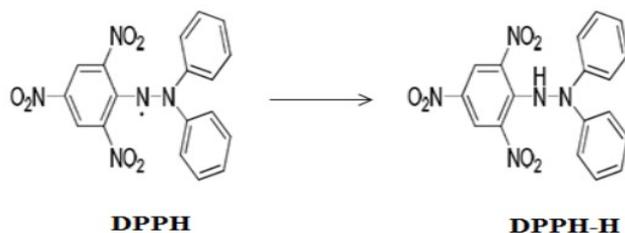
##### III.3.1.1.Mode opératoire

La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur (couleur violet) qui est inversement proportionnelle au potentiel antioxydant des échantillons étudiés [5].



**Figure 23 :** Réduction de radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été étudiée selon la méthode basée sur la réduction de radical DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) par les antioxydants selon le protocole de Sanchez [6]. On mélange un volume de 0.5ml de chaque solution des extrait (à différentes concentration 0.004 ,0.04 ,0.4 mg/ml) avec 1 ml de la solution de DPPH (0.001 mg/25 ml de méthanol) dans un tube à essai. Après l'incubation des solutions pendant 30 min, à l'abri de la lumière l'absorbance est mesuré à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.



**Figure 24 :** Forme libre et réduite du DPPH [7]



**Figure 25 :** spectrophotomètre UV-Vis

### III.3.1.2. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité Antioxydante} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Avec :

$A_C$  : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

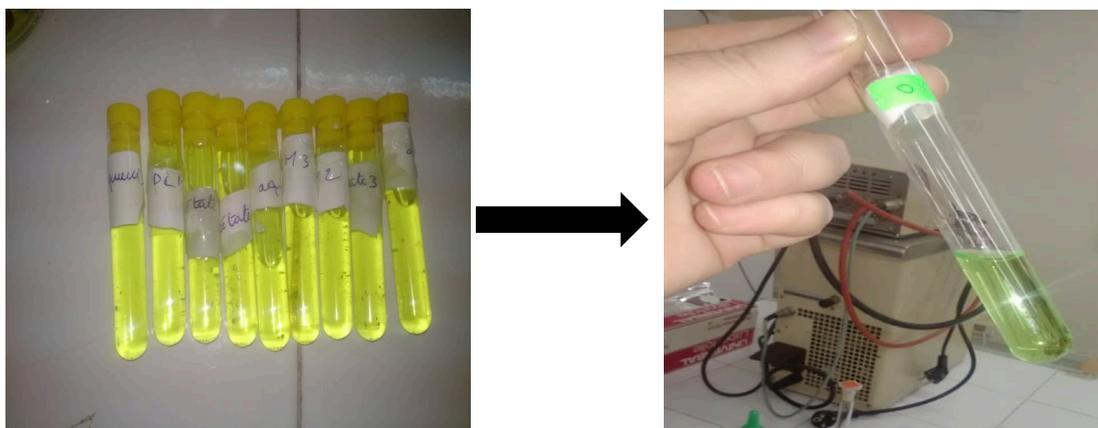
$A_E$  : absorbance en présence d'extrait

### III.3.1.3. Détermination $IC_{50}$

La valeur  $IC_{50}$  (la concentration inhibitrice médiane) est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée à partir la courbe du pourcentage de d'inhibition en fonction de la concentration [7].

### III.3.2. La méthode de FRAP

Le pouvoir réducteur du fer ( $Fe^{3+}$ ) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu [7] . La présence des réducteurs dans les extraits provoque la réduction de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) à la forme ferreux ( $Fe^{2+}$ ). La réaction est révélée par le changement de la couleur jaune dans le milieu réactionnel en couleur bleu verte. En mesurant l'augmentation de l'intensité de cette coloration dans le milieu réactionnel à 700nm.



**Figure 26:** Réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$

On mélange 0,125 ml de chaque extrait à différentes concentrations (0,044, 0,022, 0,011mg/ml) avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate (0,2M ; pH=6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. Le mélange est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à température ambiante, ensuite on ajoute 2.5ml d'acide

trichloroacétique à 10%. Les tubes sont centrifugés à 3000 t/min pendant 10 min, 2,5ml de la phase supérieure de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1%. Le blanc est préparé en adoptant la même procédure sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol.

*Références*

- [1]- H. Beddiar, Mémoire de Master, Etude de « *Juniperus Phoenicea L* » de la région de Tébessa : Compositions chimique, activités antioxydants et activités microbiologiques, Université de Tébessa, 2016, p44-45-46
- [2]- M. Kadri, A. Yahia, Contribution à l'étude de l'effet des facteurs environnementaux sur l'accumulation des glycosides chez *Nerium oleander L*, *Journal of Bioresources Valorization*, 1: 23-27, 2015
- [3]-M. Tadhani, R. Subhash, Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* Leaves : Proximal composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening, *J. Med. Sci*, 6(3):321-326, 2006
- [4]- N. Dohou, K. Yamni, S. Tahrouch, L-M. Idrissi Hassani, A. Badoc, N. Gmira, Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *ThyMelaea Lythroides*, *socpharm bordeaux 142* : 61-78,2003
- [5]- T. Iskounen, S. Tadount, Mémoire de Mastère, L'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'écorce et du jus de la grenade *Punica granatum* de Kabylie, variété Lahlou, Université de Tizi-Ouzou, 2018, p
- [6]- M, Sanchez, Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems *International Journal of Foods Science and Technology*, 8: 121-137, 2002, p
- [7]- A. Djaziri, Mémoire de Mastère, Contribution à l'étude phytochimique et L'évaluation de l'activité antioxydant dans le jus de grenade (*punica granatum .l*), Université de Tlemcen, 2017, p

# *Chapitre IV*

## IV.1.les tests de la présence des molécules actives

Tableau 6 : Résultats de tests de présences des principes actifs

Molécule	Remarque	Résultat de test
L'amidon		+
saponosides		+
Alcaloïdes		++
coumarines		++

Flavonoïdes		+++
Composés réducteurs		+
Tannins galliques		+++
Stérols		++
triterpènes		++

Les résultats cités dans le tableau, montrent que l'écorce de la grenade est riche en flavonoïdes et tanins galliques en quantités importantes grâce à la couleur intense de chaque solution de test .il est également riche en coumarines, alcaloïdes, Stéroïls et triterpènes. L'amidon, les saponosides, et les composés réducteurs sont présents en quantités faibles.

## IV.2. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt (\%) = M_{\text{extrait}} / M_{\text{échantillon}} * 100$$

Avec :

- $M_{\text{extrait}}$  = masse de l'extrait en gramme.
- $M_{\text{échantillon}}$  = masse de l'échantillon en gramme

### IV.2.1. Le rendement de l'extrait brute

$$Rdt (\%) = 257,42 / 900 * 100 = 28.60 \%$$

Nous avons obtenu un rendement d'extraction de 28.60 %. On peut considérer ce rendement comme étant un bon rendement, ainsi que de fortes teneurs en molécules actives. Cela est dû au choix du solvant (la grande polarité de l'eau qui lui permet d'extraire le plus nombre possible des molécules actives).

### IV.2.2. Le rendement de chaque fraction

**Tableau 7** : Rendement de chaque extrait.

	Masse de l'extrait (g)	Rdt %
DCM	20,11	7,81
Acétate d'éthyle	27,15	11,44
Aqueux	135,18	64,32

- Calcul de rendement de l'extrait DCM par rapport à la masse de l'extrait brut :

$$Rdt_{\text{DCM}} \% = (20,11 / 257,42) \times 100 = 7,81\%$$

- Calcul de rendement de l'extrait de l'acétate d'éthyle par rapport à la masse de la phase aqueuse après l'extraction par DCM :

$$Rdt_{\text{Acétate}} \% = (27,15 / 237,31) \times 100 = 11,44\%$$

- Calcul de rendement de l'extrait aqueux par rapport à la masse de la phase aqueuse après l'extraction par l'acétate d'éthyle :

$$Rdt_{\text{Aqueux}} \% = (135,18 / 210,6) \times 100 = 64,32\%$$

Les résultats suivants indiquent que les faibles rendements sont obtenus après l'utilisation des solvants de basses polarités (DCM et acétate d'éthyle), ce qui peut expliquer

pourquoi la teneur en molécules moins polaires est inférieure à celle de molécules plus polaires (les molécules restantes dans la phase aqueuse)

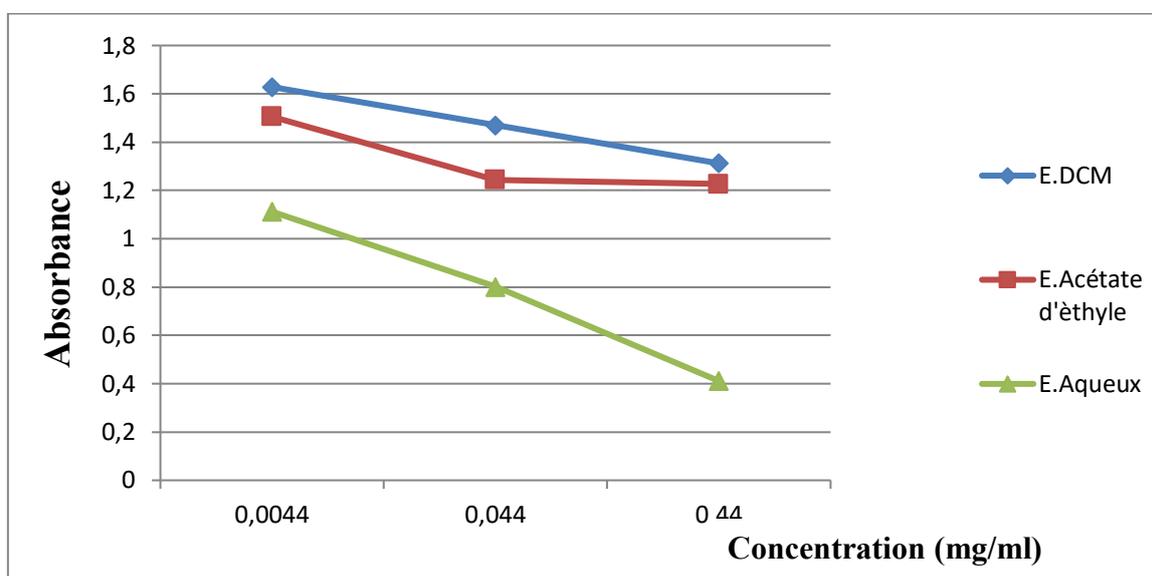
### IV.3.évaluation de l'activité antioxydante

#### IV.3.1.Test de DPPH

Les résultats de changement d'absorbance à différents concentration sont reportés dans les Figures ci-dessous pour l'extrait de DCM, d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux et le blanc.

**Tableau 8** : les absorbances mesurées à 570 nm de chaque extrait avec le DPPH

Concentration (mg/ml)	E.DCM	E.de l'acétate	Extrait aqueux
<b>0,0044</b>	1,628	1,505	0,456
<b>0,044</b>	1,47	1,244	0,448
<b>0,44</b>	1,312	1,227	0,411



**Figure 27** : les absorbances mesurées à 570 nm de chaque extrait avec le DPPH

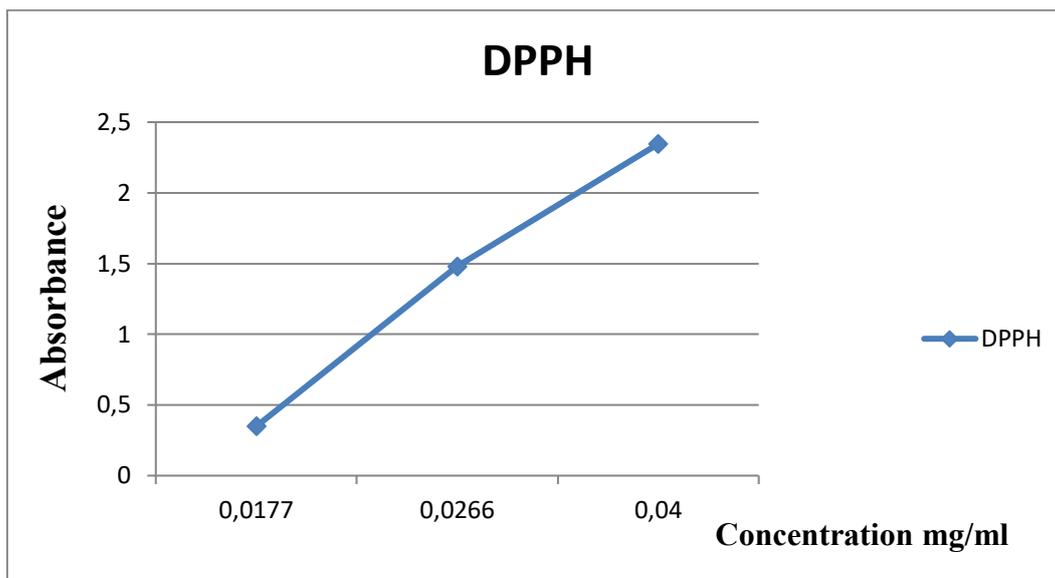


Figure 28 : la variation de l'absorbance de solution méthanolique de DPPH en fonction de la concentration

#### IV.3.1.1. Les pourcentages d'inhibition

Tous les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous :

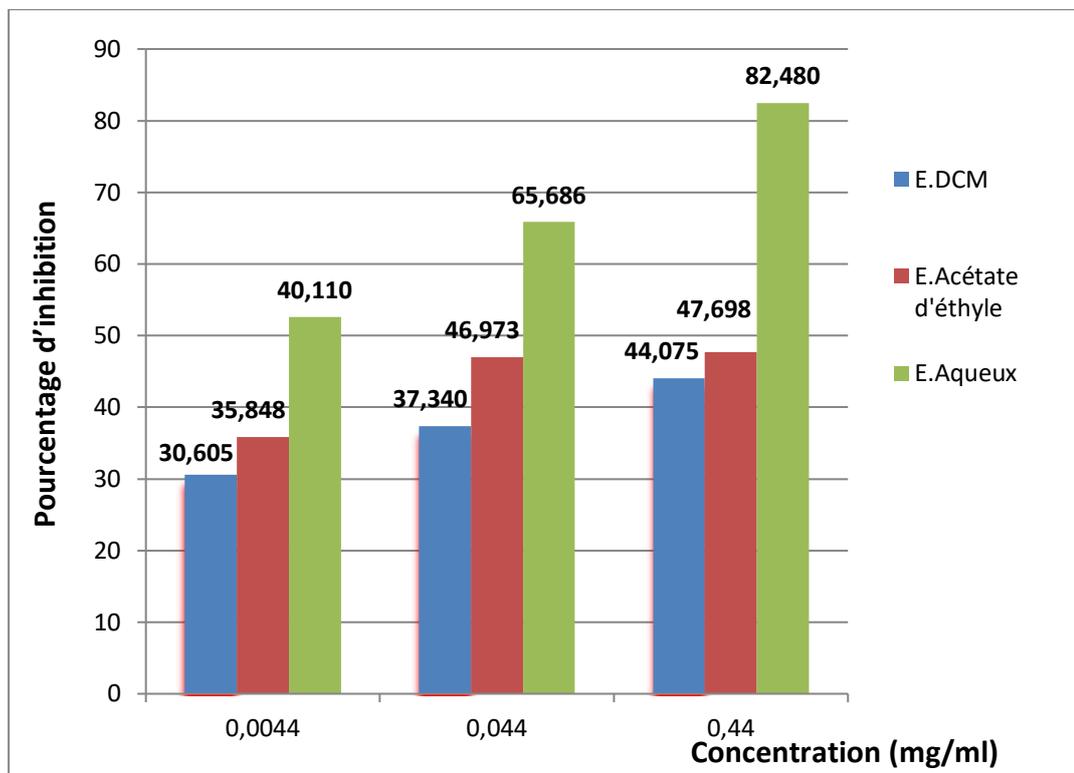


Figure 29 : les pourcentages d'inhibition de chaque extrait à différentes concentration

Tous les extraits examinés ont présentés des hauts pourcentages d’inhibition. Les concentrations d’extrait aqueux présentent les meilleures inhibitions, suivies de l’extrait d’acétate d’éthyle, puis l’extrait de DCM. A une concentration élevé 0.44mg/ml, les pourcentages obtenus sont 82.48%; 47.698%; 44.075% pour l’extrait aqueux, d’acétate, de dichlorométhane respectivement.

IV.3.1.2 Détermination IC<sub>50</sub>

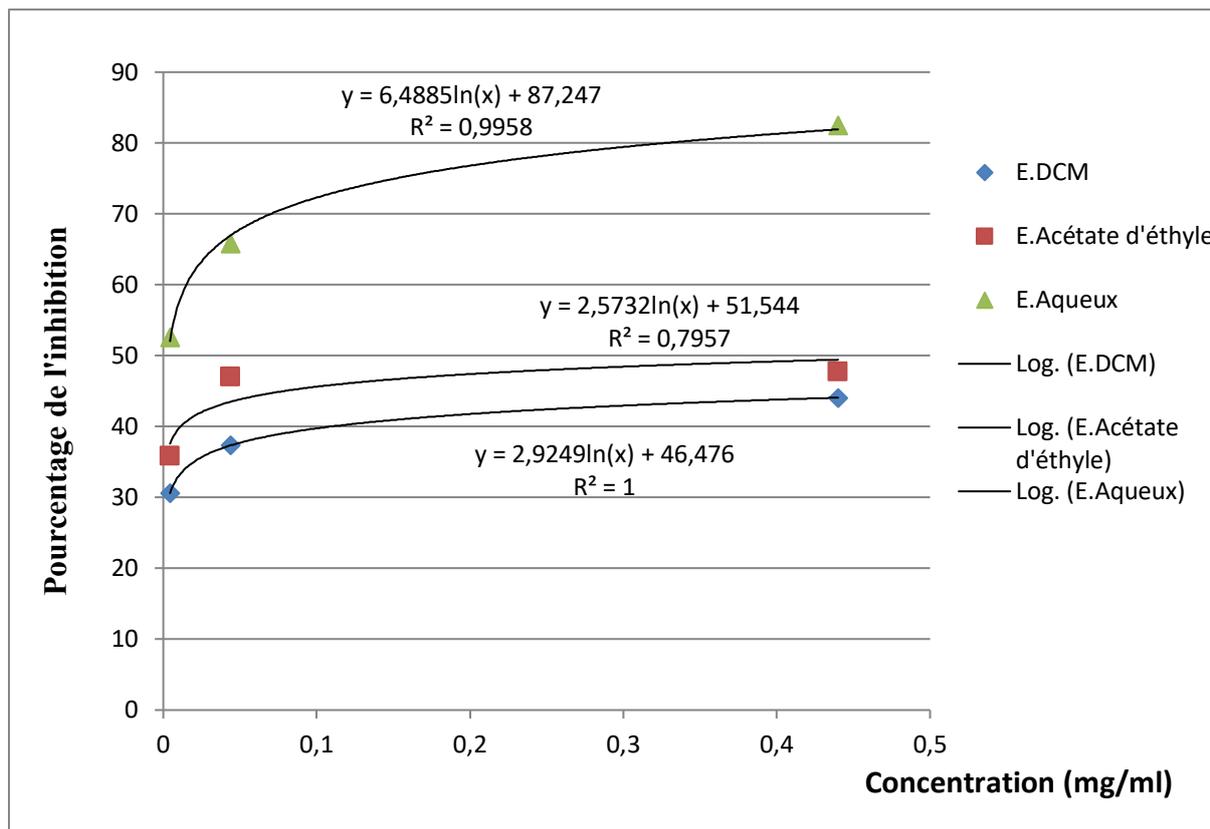


Figure 30: les courbes de tendances pour les pourcentages d’inhibition

D’après la courbe, on peut déterminer la valeur d’IC<sub>50</sub> de chacun des extraits on a utilisé les formules obtenus après l’extrapolation. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : valeur d’IC<sub>50</sub> pour chaque extrait

Extrait	IC50 (mg/ml)
Aqueux	0,00323
Acétate d’éthyle	0,549*
DCM	3,341

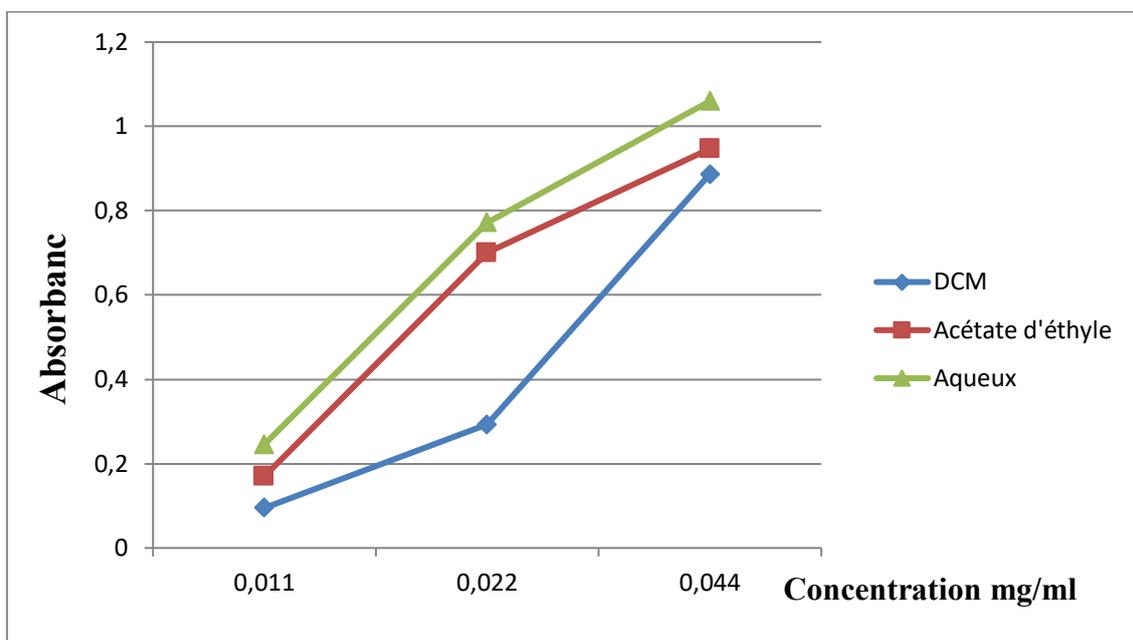
\*la valeur proche de la valeur maximale 0.549 mg/ml (on a pas pu vérifier due au épidémie)

On remarque que la valeur d’IC<sub>50</sub> 0.00323mg/ml pour l’extrait aqueux est la plus petite (pouvoir antioxydant le plus élevé), suivi de l’extrait d’acétate 0.549mg/ml, et en

dernier rang l'extrait de DCM qui avoir la concentration d'inhibition la plus élevée 3,341mg/ml. Ces résultats montrent que les molécules polaires sont les molécules responsables de la majorité de l'activité antiradicalaire de l'extrait de l'écorce, ce qui concorde avec les travaux réalisés par Kang et al [1].

#### IV.3.2. Test de FRAP

L'indicateur significatif de l'activité antioxydante d'un composé est son pouvoir réducteur, c'est-à-dire sa capacité à donner l'électron [2]. Les résultats obtenus du test FRAP sont reportés dans la (Figure 31).



**Figure 31** : Courbes de pouvoir réducteur des extraits de l'écorce de grenade sur le fer ferrique.

- La figure montre que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  varie proportionnellement avec la variation de la concentration en extrait.
- le pouvoir réducteur est proportionnel avec la valeur de l'absorbance, c'est-à-dire une absorbance élevée indique un pouvoir réducteur élevé.
- L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits par réduction de fer montre que l'extrait aqueux ayant une activité antioxydante plus importante que l'extrait de l'acétate d'éthyle, et de son rôle, l'extrait de l'acétate d'éthyle ayant une activité antioxydante plus importante que l'extrait de dichlorométhane.

Ces résultats peut être expliqué par le fait que les molécules ayant d'activité antioxydante plus élevé se trouvent dans l'extrait aqueux, ces derniers sont probablement les molécules les plus polaires de l'écorce de grenade.

## Conclusion

D'après notre étude phytochimique sur la poudre de l'écorce de grenade on trouve qu'il représente une source importante de polyphénols, alcaloïdes et terpénoïdes qui sont des molécules bioactives.

L'extraction de ces molécules se fait par l'eau qui a fourni un rendement 28,60%. La teneur en molécules bioactives varie selon la nature du solvant, cela est justifié par les rendements des fractionnements obtenus en utilisant des solvants de différente polarité.

L'évaluation de l'activité antioxydante de chaque extrait de l'écorce de grenade est effectuée par la méthode de réduction du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur de fer ferrique (test de FRAP), Ces méthodes prouvent que l'activité la plus élevé obtenu par l'extrait aqueux qui a la grande polarité.

A travers de ces résultats, l'écorce de grenade est considérée comme une source importante des molécules antioxydantes, qui trouvent plusieurs utilisations en médecine, pharmacie et cosmétologie etc.

*Références*

[1]- D-G. Kang, C-K, Yun. H-S, Lee. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea Journal of Ethno pharmacology, 87 :231-236,2003

[2]-S. Bendjabeur, Mémoire de Magistère, Evaluation de pouvoir antioxydante et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade *punica granatum* L.) en vue de leur utilisation alimentaire, Ecole nationale supérieure agronomique El-Harach-Alger,2012,p74

# *Annexe*

## Généralité sur l'activité antioxydante

### 1. Stress oxydant

En 1991, Sies a défini le stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ROS [1]. C'est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants) [2], Le stress oxydant peut être de courte durée et grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique [1]. Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies, citons les maladies des articulations (Arthrite, Rhumatisme), Reins (Glomérulonéphrite, l'insuffisance rénale chronique), Cerveau (Alzheimer, Parkinson, Perte de mémoire, Dépression, Accident vasculaire cérébral), et Plusieurs organes (Cancer, Vieillesse, Diabète, Inflammation, Infection...etc.)

### 2. Généralité sur les espèces réactives, sources et cibles

Les espèces réactives (pouvant être de nature radicalaire ou non) se divisent en deux catégories principales : d'une part les ROS et d'autre part les espèces réactives de l'azote (ou RNS pour Reactive Nitrogen Species) [2]. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) incluent les radicaux libres possédant au moins un électron libre sur la couche externe (radical hydroxyl  $\text{OH}^\cdot$ , superoxyde  $\text{O}_2^\cdot$ , le radical peroxy  $\text{ROO}^\cdot$ ) et les dérivés non radicalaires, dont la réactivité est très élevée comme le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'oxygène singulet  $\text{O}_2$  et l'acide hypochloreux  $\text{HOCl}$  [3].

La chaîne respiratoire mitochondriale est responsable de la production endogène de 90% des ROS dans la cellule. Les rayonnements (RX ou  $\gamma$ ), Les polluants de l'air, comme le goudron, la fumée des cigarettes et les contaminants industriels (amiante, silice), Certains métaux (chrome, cuivre, fer et vanadium), Le métabolisme *in vivo* de certains xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides), de nombreux médicaments (antibiotiques, anticancéreux...) peut contribuer à la production des ROS[3].

Les ROS, peuvent provoquer des dégâts au niveau des acides nucléiques. Ils peuvent provoquer des cassures, des mutations ou endommager le processus de réparation de l'ADN [2]. Les ROS peuvent aussi oxyder le glucose, en donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine pour aboutir à la formation de produits finaux de glycosylation [3], oxyder les protéines et les acides aminés, permettant la formation de produits carbonylés ou hydroxylés, entrainer à une altération des protéines [2], et oxyder les graisses.

# Annexe

---

## 3. Antioxydant

Un antioxydant est toute substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, il retarde ou prévient de manières significatives l'oxydation de ce substrat [4].

## 4. Sources d'antioxydants

### 4.1. Endogène

Le système endogène se compose de protéines, d'oligoéléments et d'enzymes qui constituent la première ligne de défense en participant à la neutralisation excédentaire en radicaux libres [5].

### 4.2. Exogène

Ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments (Sélénium, cuivre, zinc), les vitamines E et C, et les polyphénols qui sont largement présents dans les fruits et les légumes.

## 5. Étude d'activité des antioxydants

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Et en pratique, plusieurs essais in vitro procédures sont menés pour évaluer les activités antioxydants avec les échantillons d'intérêt. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple :

### 5.1. Test au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (á,á-diphénylâ picrylhydrazylâ) fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [6]. Un avantage indéniable de ce test est qu'il permet également d'évaluer la cinétique de piégeage [2].

### 5.2. Test FRAP

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu [6]. Ce test est peu coûteux simple, reproductible et rapide. D'autre part, il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine [2].

## 5.3. Test TRAP

Cette méthode (Total radical- trapping antioxidant parameter) est basée sur la protection fournie par les antioxydants sur la décroissance de la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de R-phycoérythrine est désactivée par ABAP (2,2' - azo-bis (2 - amidino- propane) de chlorhydrate en tant que générateur de radicaux. Ce stoppage de la réaction est mesuré en présence d'antioxydants. Le potentiel antioxydant est évalué en mesurant la décroissance de la décoloration [6]. Test TRAP permet de quantifier les antioxydants non enzymatiques (glutathion...) ainsi que de mesurer la capacité antioxydante du plasma et du sérum [2]. L'inconvénient de cette méthode se base sur le fait que chaque antioxydant possède un temps de latence avant son action. Ainsi la corrélation avec d'autres méthodes d'évaluation est particulièrement compliquée [2].

## 5.4. Test TEAC

La méthode (Trolox equivalent antioxidant capacity) est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'-azino-bis (3 - éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS') [6]. Le test TEAC est facile à mettre en place puisque seuls les réactifs et un spectrophotomètre sont nécessaires. Par contre l'instabilité des radicaux ABTS<sup>•+</sup> donc la mesure doit être faite assez rapidement [2].

## 5.5. Test ORAC

Cette méthode (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente après ajout d'un générateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH). L'ajout de composés antioxydants efficaces devrait permettre le piégeage des radicaux libres et protéger la molécule fluorescente. L'avantage principal de cette méthode est la capacité d'évaluer dynamiquement les capacités antioxydantes de composés. Elle permet notamment de déceler une latence d'action. Ce point est particulièrement intéressant pour étudier des extraits végétaux, aliments ou des compléments alimentaires contenant plusieurs antioxydants à action rapide et à action retardée. Des inconvénients résident dans l'incapacité de mesurer l'activité antioxydante que sur des radicaux peroxydes. De plus, il n'y a pas de corrélation évidente entre les résultats obtenus avec cette méthode et la consommation d'aliments réputés contenir des antioxydants.

## Annexe

---

Toutefois il est difficile de corréler les données *in vitro* avec des résultats physiologiques *in vivo* [2].

# Annexe

---

## *Références*

- [1]-B. Bouguerne, Thèse de Doctorat, Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose), Université de Toulouse, 2012, p 13
- [2]- T. Desmier, Thèse de Doctorat, Les antioxydants de nos jours : définition et applications, Université de Limoges, 2016, p 14,15, 20, 22, 50-54
- [3]-S. Kada, Thèse de Doctorat, Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 2018, p15, 17,18, 22,28
- [4]-T. Binta, Thèse de Doctorat, Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL (Meliaceae) Université de Bamako, 2003, p24
- [5]-M. Cheick Traoré, Thèse de Doctorat, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la Dysménorrhée au Mali. Université de Bamako, 2006, p67, p89
- [6]-O. Medjoujda, Mémoire de Licence en ligne, Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, Université de Ouargla, 2014