
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent



Institut des sciences

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Biochimie

Présenté par :

M^{me}. Asli Nor El Houda

M^{me}. Amar Ben Abd Allah Asmaa

Etude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des feuilles de grenadier d'Ain Témouchent « *Punica granatum* » sur la stabilité membranaire du globule rouge

Encadrant : M^{me} BENTABET –LASGAA Nesrine

Maitre de conférence "B" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu le 25 juin 2020

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me}. ZERRIOUH .M « MCB » C.U.B.B.A.T

Examinatrice : M^{me}. BENAHBIB .O « MCB » C.U.B.B.A.T

Encadrant : M^{me}. BENTABET .N « MCB » C.U.B.B.A.T

Année universitaire : 2019-2020



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Au Nom de Dieu, Le Clément, Le Miséricordieux



(وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ
طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَ الزَّيْتُونِ
وَ الرُّمَانَ مُشْتَبِهًا وَ غَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظروا إلى ثمره إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ(99)..... الأنعام



Remerciements

IL me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener ce travail à son terme.

*Mes remerciements vont tout d'abord à **ALLAH** letout puissant de m'avoir guidé durant toutes ces années et m'a permis de réaliser ce mémoire en me donnant la force, la volonté, la patience etla chance d'étudier et de suivre le chemin de la science et de m'avoir donné le courage nécessaire pour mener ce modeste travail à bout.*

*J'offremes plus sincères remerciements à **Madame BENTABET Nesrine**, Maitre de conférence classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent, pour avoir encadré et dirigé ce travail et pour nous avoir soutenue, pour ses conseils durant ce travail, tout au long de saréalisation, du début jusqu'à la fin.*

*Nous remercions l'ensemble des membres du jury, **Dr. Meriem Zerriouh** Maitre de conférence classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent et **MmeBENHABIB Ouassila**, Maitre de conférence classe Bau centre universitaire d'Ain Témouchent pour Avoir accepté de juger notre travail.*

Je ne saurai oublier de remercier les ingénieurs du laboratoire de Biochimie, pour leurs gentillesse et leurs aides dans la réalisation de ce modeste travail.

*J'exprime aussi ma gratitude à **Madame MEFTAHI Choukria** pour sa gentillesse, sa patience et ses conseils scientifiques, merci! , d'avoir partagé tes connaissances avec nous.*

*Mes Remerciements s'adressent également à tous les enseignants de la faculté des sciences de **l'université d'Ain -Témouchent** qui nous ont enseigné durant les cinq ans d'études.*

A mes très chère parents, mes frères et toutes ma famille pour leur amour qu'ils m'apportent et leur soutien durant toutes mes années d'études; un grand merci et je vous aime énormément.

Enfinement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci

NOR EL HOUDA. , ASMAA

Dédicace

Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé ;

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chères ;

*Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donné un sens à
mon existence et qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout
mon parcours :*

*Ma très chère mère « ZOHRA » qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne ,
je lui serai éternellement reconnaissantes ,**merci maman***

*Mon très cher père « DJILALI » qui m'a donné un magnifique
modèle de volonté, **Merci papa** ,avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne
santé .*

A ma belle sœur ,Moukhtaria et sa petite famille

A mes très chers frères, FEHD EDDINE , ABDE NOUR, MOHAMMED

A mes amies et plus spécialement à Ikrame , MOKHTARI Feriha

*A ma binôme et ma sœur Asmaa et à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite
et à sa famille.*

NOR EL HOUDA.

Dédicace

Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir, et avec une immense joie et un grand honneur je dédie ce modeste travail :

A ceux qui m'ont donné la vie, l'amour et le courage, qui ont veillé pour m'ouvrir les voies de bonheur et me voir un jour briller, à mes très chers parents auxquels je dois le reste de ma vie.

Aux plus chers à mon cœur : Ma mère «Fatima» symbole de sacrifices de tendresse et d'amour, qui m'a toujours encouragé.

A mon très cher père «Mohamed» qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et qui n'a jamais cessé de m'apporter tout dont j'ai besoin pour réaliser ce travail et dans tout mon parcours éducatif.

À mes chers frères: Ayoub, Bouabdallah ainsi que leurs petites familles qui m'ont apporté leur aide et leur soutien moral pendant ces années d'études ;

A mon mari Mohamed pour ses encouragements permanents, et son soutien moral durant cette année

A toute ma famille à qui je dédie ce mémoire, les mots ne sont pas assez forts pour vous remercier.

A ma grande mère que dieu lui donne long vie et bonne santé.

A Mes oncles et mes tantes et plus spécialement ma tante Iman Allah yarhamha

A Mes cousines Houda, Mouna

A tous mes amies et plus spécialement Ikram qui m'a soutenue tout au long de ce travail, qui a su trouver les bons mots pour me motiver et qui a toujours été présentes

Mes spéciales dédicaces vont à ma collègue Nor el Houda qui m'a toujours supporté et soutenu le long de toute la période de travail et à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite.

Asmaa

Résumé

Punica granatum L. est une plante médicinale précieuse aux nombreuses propriétés pharmacologiques. L'objectif de la présente étude est d'évaluer *in vitro* l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles de grenadier, sur la stabilisation de la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'induction d'hémolyse, par hypotonie associée à une température élevée. Trois extraits ont été utilisés à savoir : aqueux, hydro-méthanolique et hydro-acétonique. Les rendements d'extraction enregistrés sont plus importants dans l'extrait hydro-méthanolique comparés aux autres extraits.

L'étude phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de différents métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés réducteurs. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes est plus importante dans l'extrait aqueux. Par ailleurs, le traitement des érythrocytes par les extraits hydro-méthanolique et hydro-acétonique des feuilles présente une hémolyse nettement inférieure à celle obtenue avec le Diclofenac, pour la plupart des concentrations testées. Ces différents extraits sont dotés d'une forte activité anti-inflammatoire qui est presque comparable à celle du Diclofenac.

En conclusion, la présente étude révèle une preuve biologique qui soutient l'efficacité d'utilisation des feuilles du *P. granatum* dans la prévention contre l'inflammation.

Mots clés : Activité anti-inflammatoire, *Punica granatum L.*, Extraits, Métabolites secondaires, Globule rouge, Stabilité membranaire.

Abstract

Punica granatum L. is a precious medicinal plant with many pharmacological properties. The objective of this study is to evaluate in vitro the anti-inflammatory activity of pomegranate leaf extracts, on the stabilization of the membrane of red Blood cell with respect to the induction of hemolysis, by hypotonia associated with high temperature. Three solvents were used namely: aqueous, hydro-methanolic and hydro-ace tonic. The extraction yields recorded are greater in the hydro-methanolic extract.

The qualitative analysis made it possible to highlight the presence of various secondary metabolites such as flavonoid, tannins, t erp enoides, alkaloids and reducing compounds. The content of polyphenols and flavonoid is higher in the aqueous extract. The different extracts of the *P.granatum* leaves have a strong anti-inflammatory activity which is almost comparable to that of diclofenac.

In conclusion, this study reveals biological evidence that supports the effectiveness of using the leaves of *P. granatum* in preventing inflammation.

Key words : Anti-inflammatory activity, *Punica granatum L.*, Extracts, Secondary metabolites, Red blood cell, Membrane stability.

ملخص

نباتالرمان هونبات طبي نفيس مع العديد من الخصائص الدوائية.و الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهاب في المختبر من مقتطفات أوراق الرمان على تثبيت غشاء خلايا الدم الحمراء. مقابلانحلال الدم بسبب الوتر المرتبطبارتفاع درجة الحرارة , تم استخدام ثلاثة مذيبات وهي مائية, مائية-ميثانولي ,واليونانية مائية, تكون حصيلة الاستخراج المسجلة اعلي في استخراج الهيدروستاتي الميثانولي.

و قد مكن التحليل النوعي من تحديد وجود مستقلبات ثانوية مختلفة مثل فلافونويد و التانينات و التيربينويدات و الفلويدات و المركبات المختزلة .ان محتوى البوليفينول والفلافونويد أكبر في مستخلصالماء

وقد تم تزويد مختلف المقتطفات من أوراق نبات الرمان بنشاط قوي مضاد للالتهابات يمكن مقارنته تقريبا معديكلوفيناك

في الختام تكشف هذه الدراسة عن دليل بيولوجي يدعم فعالية استخدام أوراق الرمان في الوقاية من الالتهاب

الكلمات المفتاحية ,ثبات ,نشاط مضاد للالتهاب , أوراق الرمان , مستخلصات , نواتج الايض الثانوية,خلايا الدمالحمرء الغشاء

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....2

I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :L'inflammation

I.1.1. Définition5

I.1.2. Principaux type d'inflammation5

I.1.2.1. Inflammation chronique.....5

I.1.2.2. Inflammation aigue6

I.1.3. Médiateurs inflammatoires chimiques.....8

I.1.4. Thérapeutique inflammatoire9

I.1.4.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)9

 I.1.4.2. Les anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)9

 I.1.4.3. Les anti-inflammatoires naturels.....9

Chapitre 2 : Généralité sur le grenadier

I.2.1. Historique11

I.2.2. Systématique botanique.....12

I.2.2.1. Taxonomie.....12

I.2.2.2. Caractéristique13

 I. 2.2.3. Les variétés d'espèces13

I. 2.2.4. Origine géographique14

I.2.3. Production dans le monde et en Algérie.....14

I.2.4. Variété de grenadier en Algérie15

I.2.5. Phytochimie16

I.2.6.Les composées phénoliques.....17

I.2.6.1. Acides phénoliques18

 I. 2.6.2. Flavonoïdes19

 I. 2.6.3. Les tanins20

I.2.7. Utilisation traditionnelle et moderne20

I.2.8. Activités thérapeutiques de <i>P. granatum</i>	20
I.2.8.1. Effet antioxydant	20
I.2.8.2. Effet anti-inflammatoire.....	21
I.2.8.3. Effet anticarcinogénique.....	22
I.2.8.4. Effet antibactérien.....	22
I.2.8.5. Effet Antiviral.....	23
I.2.8.6. Effet antidiabétique	23
I.2.8.7. Autres activités.....	24
I.2.9. Toxicité des composés phénoliques de la grenade.....	24

Chapitre 3 : L'activité Anti –inflammatoire

I.3.1. Méthodes utilisées dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire.....	25
I.3.2. Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits des feuilles de <i>P. granatum</i>	25
I.3.3. Composition et hémolyse de sang	25

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétale	28
II.2. Méthodes.....	28
II.2.1. Préparation des différents extraits de <i>Punica granatum</i>	28
II.2.1.1. Extrait brut aqueux	29
II.2.1.2. Extrait brut eau/méthanol.....	29
II.2.2. Le rendement des extraits secs	29
II.2.3. Tests phytochimiques.....	30
II.2.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	32
II.2.4.1. Préparation des extraits pour les dosages.....	32
II.2.4.2. Dosage des polyphénols.....	32
II.2.4.3. Dosage des flavonoïdes.....	33
II.2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i>	34
II.2.5.1. Echantillons de sang humain.....	34
II.2.5.2. Préparation du phosphate buffered saline (PBS)	34
II.2.5.3. Préparation des extraits végétaux	34
II.2.5.4. Préparation de la suspension des globules rouges humains.....	34
II.2.5.5. Evaluation de la toxicité des extraits de feuilles de <i>Punica granatum</i> vis-à-vis des globules rouges.....	35

II.2.5.6.Evaluation de l'effet des extraits de <i>Punica granatum</i> L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.....	35
---	----

III. Résultats et Discussion

III.1.Préparation des extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i>	38
III.2. Rendement d'extraction.....	38
III.3. Analyses qualitatives.....	39
III.4. Analyses quantitatives.....	41
III.4.1. Dosage des polyphenols	41
III.4.2.Dosage des flavonoïdes.....	43
III.5.Evaluation de la toxicité des extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i> L. vis-à-vis Des globules rouges	45
III.6. Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i> L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges	48
IV Conclusion	52
V Références bibliographiques.....	55

Liste des figures

<u>Figure N°01 :</u>	Les étapes de l'inflammation chronique.....	5
<u>Figure N°02:</u>	Les étapes de l'inflammation aigue	6
<u>Figure N°03:</u>	Diapédèse leucocytaire	7
<u>Figure N°04:</u>	Production de grenadier dans le monde	14
<u>Figure N°05:</u>	Fleurs et fruits du grenadier (<i>Punica granatum</i>).....	16
<u>Figure N°06:</u>	La grenade et ses différentes parties	17
<u>Figure N°07:</u>	Les principaux constituants des différentes parties du grenadier ou de leurs extraits.....	18
<u>Figure N°08:</u>	Squelette de base de l'acide ellagique et l'acide gallique	19
<u>Figure N°09:</u>	Squelette de base des flavonoïdes	20
<u>Figure N°10 :</u>	Les feuilles de <i>Punica granatum</i>	28
<u>Figure N°11 :</u>	Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de <i>Punica granatum</i>	29
<u>Figure N°12:</u>	Schéma de l'extraction eau/méthanol ou eau/acétone des feuilles de <i>Punica granatum</i>	30
<u>Figure N°13 :</u>	Le rendement d'extraction des feuilles de <i>Punica granatum L</i>	39
<u>Figure N°14:</u>	La courbe d'étalonnage d'acide gallique.	42
<u>Figure N°15 :</u>	Teneur en polyphenols totaux des extraits en mg EQ /g d'extrait.....	42
<u>Figure N°16 :</u>	Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	44
<u>Figure N° 17:</u>	Teneur en flavonoïdes des extraits en mg EQ /g d'extrait.....	44

<u>Figure N°18 :</u>	Effet des différentes concentrations de diclofenac sur l'hémolyse des globules rouges comparé au contrôle positif l'eau distillée	45
<u>Figure N°19 :</u>	Effet des différents extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i> sur l'hémolyse des globules rouges, en fonction des concentrations comparé à celui de diclofenac.....	46
<u>Figure N°20 :</u>	Effet des différentes concentrations de diclofenac sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur et comparé au contrôle négatif (l'eau physiologique) et au contrôle positif	48
<u>Figure N°21 :</u>	Effet du diclofenac et des extraits de feuilles de <i>Punica granatum</i> sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, à différentes concentrations comparé au contrôle négatif (l'eau physiologique) et au contrôle positif	49

Liste des tableaux

<u>Tableau N°01 :</u>	Les types d'inflammation chronique.....	6
<u>Tableau N°02 :</u>	Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires....	8
<u>Tableau N°03 :</u>	Production de grenade en Algérie	15
<u>Tableau N°04 :</u>	Les variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie	15
<u>Tableau N°05 :</u>	Les études réalisées sur l'effet antidiabétiques de <i>P. granatum</i>	23
<u>Tableau N°06 :</u>	Les résultats de screening phytochimique des extraits testés	40

Liste des abréviations

AINS	: Anti –inflammatoire no stéroïdien
APG	: Angiosperme (plante à graine)
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm GLUT	: Acide ribonucléique messenger, Transporteur de Glucose
CMI	: Concentration minimale d'inhibition
COX	: Cyclooxygénase
EAG	: Equivalant d'acide gallique
FeCl₃	: Chlorure de fer
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄	: Acide sulfurique
Ha	: Hektar
HCl	: Acide chlorhydrique
HDL	: High- density lipoprotein
IL1	: Interleukine 1
IL8	: Interleukine 8
LDL	: Low density lipoprotein
Mg	: Ammoniaque
NaOH	: Chlorure de fer
NF-κB	: Facteur nucléaire –Kappa B
NH₄OH	: Magnésium
OMS	: Organisation mondiale de santé
<i>P.granatum</i>	: <i>Punica granatum</i>
PPAR- γ	: Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
TNF-α.	: Tumor necrosis factors
UV-B	: Ultra violet -B

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Des nombreuses études montrent que 70 à 80% des habitants du monde utilisent des plantes médicinales à des fins thérapeutiques (Sobiecki, 2014). Ils se basent sur l'utilisation des plantes comme remèdes pour le traitement des pathologies, comme l'inflammation.

La réponse inflammatoire est un processus habituellement bénéfique. Son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes) et non stéroïdiens (Diclofenac). Ces molécules, bien qu'étant efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation à long terme, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires (Medzhitov, 2010 ; Jick, 1994 ; Henzen, 2003 ; Risser et al, 2009 ; Barnes, 1998).

Le grenadier (*Punica granatum L*) est un arbuste qui est utilisé depuis longtemps et très convoité en médecine traditionnelle. Toutes ses parties à savoir le fruit, la racine, l'écorce, le pépin et la feuille sont utilisés pour leurs propriétés pharmaceutiques. L'étude des propriétés biologiques des constituants de cette plante et l'identification de ces substances qui y sont responsables constituent des axes de recherche à investir afin de valoriser cette matrice végétale dans différents domaines d'application notamment dans le domaine pharmaceutique (Ahmed et al., 2005 ; Heshmati et Namazi, 2015).

Dans cet axe de recherche globale sur les plantes douées de propriétés thérapeutiques s'insère l'objectif de notre thème de mémoire de master dont le but est d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts aqueux, eau /méthanol et eau /acétone des feuilles de *Punica granatum* via le test de stabilisation de la membrane des érythrocytes. Pour ce faire, un test de cytotoxicité a été réalisé dans un premier temps, afin de cibler les concentrations à utiliser. L'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles de *Punica granatum L*. a été évaluée, dans un deuxième temps.

Notre travail est divisé en trois parties :

- La première partie comporte une synthèse bibliographique où sont exposés les généralités sur la réaction inflammatoire ainsi qu'une présentation de la plante *Punica granatum* et quelques notions sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire;

- La deuxième partie comporte la partie pratique, qui est scindée en deux sections dont la première décrit le matériel et les méthodes utilisés lors de nos manipulations et le second est réservée pour l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion.
- Et nous terminerons avec une conclusion générale accompagnée de quelques perspectives d'avenir.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.1. Définition

L'inflammation est un phénomène omniprésent qui opère lors de perturbations sévères de l'homéostasie comme l'infection, l'exposition aux contaminants et qui est déclenchée par les systèmes immunitaires innés et adaptatifs pour combattre les agents pathogènes qui entraînent en général une destruction tissulaire ou cellulaire formant le signal d'appel de la réaction du système immunitaire et la sécrétion des protéines déclenchant le gonflement des tissus et une production de chaleur qui immobilisent et affaiblissent les microbes (Ashley *et al.*, 2012 ; Lakhani *et al.*, 2009 ; Wajahat, 2018).

I.1.2. Principaux types d'inflammation

L'inflammation se répartit en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire (Ashley *et al.*, 2012).

I.1.2.1. Inflammation chronique

L'inflammation chronique se caractérise principalement par une dérégulation du système immunitaire de l'individu. Elle se différencie de l'inflammation aiguë par la persistance de la lésion tissulaire, la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique et l'existence d'une fibrose (Figure N°01) (Guedj *et al.*, 2018).

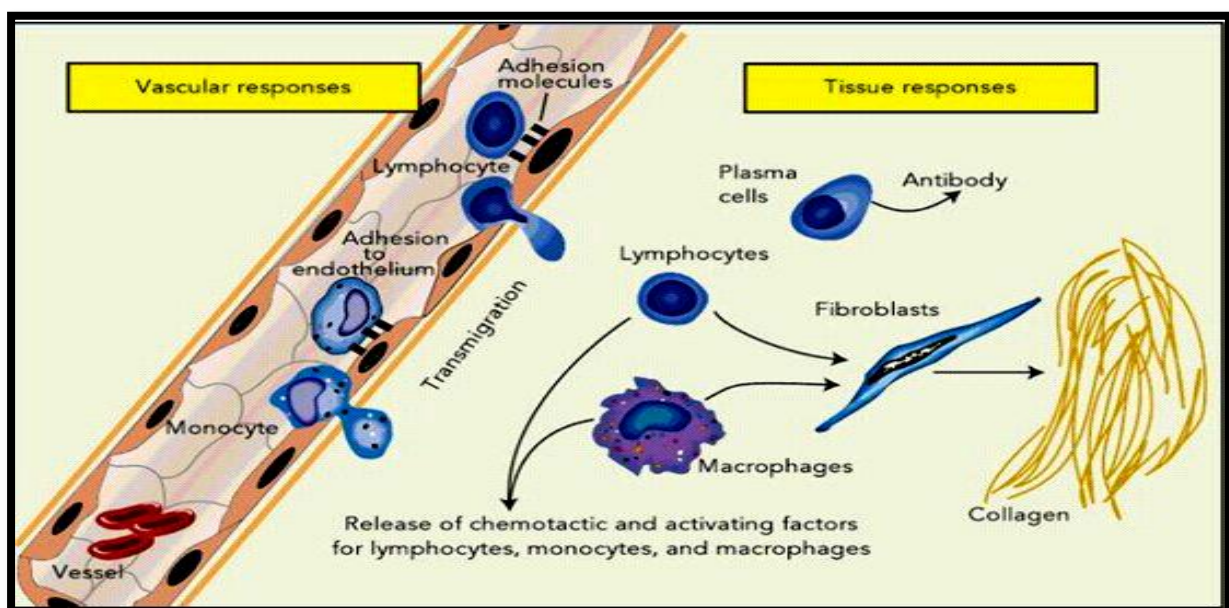


Figure N°01 : Les étapes de l'inflammation chronique

(Serhan *et al.*, 2010)

Il existe deux types d'inflammation chronique qui sont regroupés dans le **tableau N°01**.

Tableau N°01 : Les types de l'inflammation chronique (Guedj et al. 2018).

<p>Inflammation chronique non spécifique</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Elle succède à un épisode d'inflammation aiguë. - Elle représente un équilibre dynamique entre la destruction et la réparation.
<p>Inflammation chronique spécifique</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Quand il est possible de mettre en évidence dans les tissus l'agent causal. - Elle peut être de morphologie granulomateuse ou non granulomateuse. - Elle repose en partie sur l'activation des macrophages.

I. 1.2.2. Inflammation aiguë

IL s'agit d'une réponse immédiate et précoces de l'organisme à un agent toxigène et est rapidement résolue et se caractérise par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses qui se manifeste par quatre signes cardinaux à savoir : l'œdème, la douleur, la chaleur et l'érythème et se déroule en trois phases successives et interdépendantes qui sont la phase vasculaire, la phase cellulaire et la phase de résolution (Ashley et al, 2012 ; Mallem et gognyé, 2014), (Figure N°02).

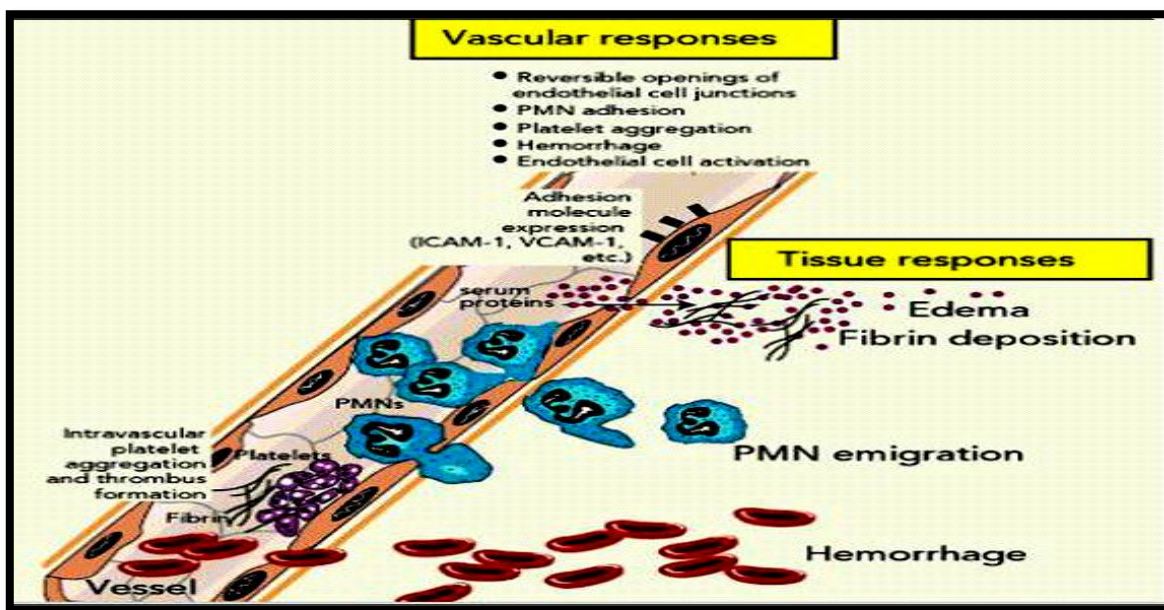


Figure N°02 : Les étapes de l'inflammation aiguë

(Serhan et al, 2010)

a. Phase vasculaire

La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation durable médié par plusieurs facteurs libérés par les plaquettes activées et les mastocytes et par l'activation du complément. La dilatation des vaisseaux sanguins est accompagnée d'une augmentation du débit locale et d'une modification de la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques et des cellules vers les tissus (Clos, 2012 ; Kumar et Jain, 2014).

b. Phase cellulaire

Il s'agit du recrutement des leucocytes sanguins dans les tissus. Cette étape est assurée par les cellules endothéliales activées par les médiateurs de l'inflammation. En se rapprochant du site de l'inflammation, les leucocytes en roulement lient des chimiokines par leurs récepteurs spécifiques ce qui assure leur l'adhésion. Cette étape est suivie par la diapédèse qui amène les leucocytes dans les tissus (Figure N°03). Ces cellules sont dirigées vers le lieu de l'infection par des gradients de facteurs chimiotactiques d'IL8 (Aymeric et Lefranc, 2009).

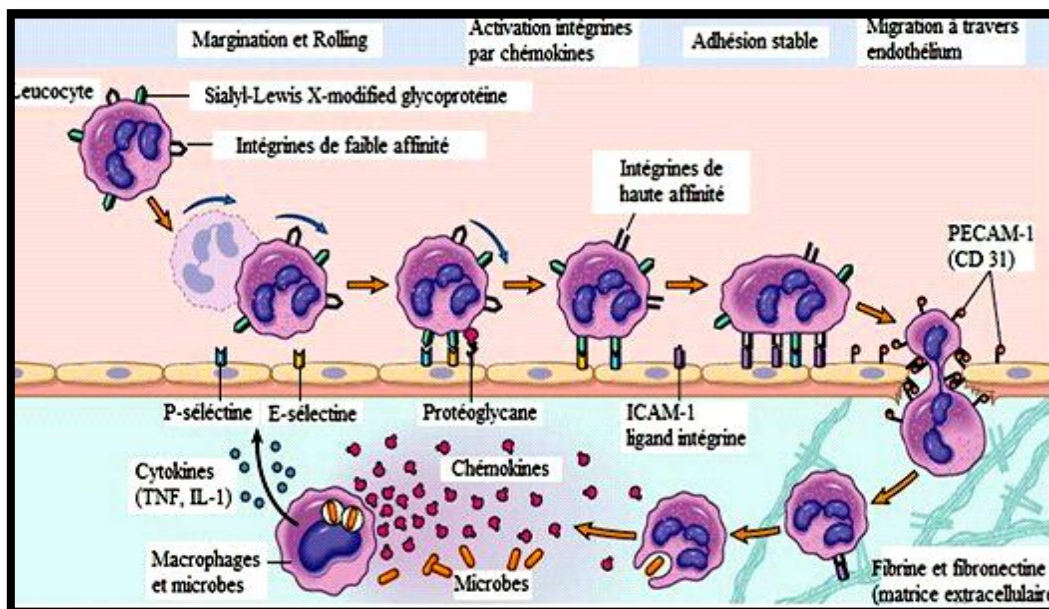


Figure N°03 :Diapédèse leucocytaire
(Kumar et Jain ,2014)

Une fois présents dans le foyer inflammatoire, les polynucléaires phagocytent les substances étrangères ou non et fusionnent avec les lysosomes qui assurent l'hydrolyse enzymatique du contenu et l'activation du métabolisme cellulaire oxydatif avec production des radicaux libres oxygénés et azotés toxiques (Defranco et al.,2009).

c. Phase de résolution

Il s'agit de l'arrêt du processus inflammatoire lorsque les microorganismes pathogènes et les produits de dégradation, ainsi que les débris cellulaires sont éliminés par les éléments sécrétés par les macrophages. Cette étape permet la cicatrisation et la régénération tissulaire (Medzhitov, 2010).

I.1.3. Médiateurs inflammatoires chimiques

Tableau N°02 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires (Defranco et al., 2009 ; Winyard et al., 2013).

	Médiateurs	Origine	Actions
Médiateurs cellulaire	Amines vasoactives		
	Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	-Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire et induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
	Sérotonine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	-Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
	Médiateurs lipidiques		
	Leucotriènes	Macrophage et mastocytes	-Augmente la contraction des muscles lisses et la perméabilité vasculaire.
	Prostaglandine E2(PGE2)	Macrophage et mastocytes	-Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes.
	Cytokines pro inflammatoires		
	IL1	Macrophage, fibroblaste et cellule endothéliale	-Augmente l'adhérence des cellules endothéliales et stimule les lymphocytes.
	IL8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes	- Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. - Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production de radicaux libres et intervient dans la réparation tissulaire
	Facteur de nécrose tumorale (TNF α)	Macrophage, mastocytes et cellule endothéliale	-Augmente la perméabilité vasculaire, l'adhérence des cellules endothéliales et l'activation des phagocytes

I.1.4. Thérapeutique inflammatoire

Un certain nombre de médicaments ont été développés pour soigner les maladies d'origine inflammatoire. Ces médicaments peuvent être divisés en deux groupes:

I.1.4.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont un large groupe d'inhibiteurs non sélective de la biosynthèse des prostaglandines par la cycloxygénase (COX), soit en modifiant de manière covalente l'enzyme, soit en faisant concurrence au substrat pour le site. Le COX-1 produit du thromboxane qui favorise l'adhésion plaquettaire, la vasoconstriction et la protection gastro-intestinale. Tandis que le COX-2 est une forme inductible dont l'expression est renforcée par des cytokines. Ainsi, l'inhibition de ces actions est responsable de la majorité des effets indésirables des AINS, tels que l'irritation de l'estomac et la toxicité rénale active (**Ambriz-Pérez et al., 2016 ; Carbone et al., 2013 ; Seibert .K et al., 1997 ; Johnet et al., 2012**).

I.1.4.2. Les anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Ils sont appelés aussi les glucocorticoïdes. Ces AIS sont des dérivés de synthèse de la cortisone. Ils constituent un groupe très homogène sur le plan structural avec une activité anti-inflammatoire puissante en plus des propriétés immunomodulatrices et antiallergiques. Les AIS empêchent l'activation de la phospholipase A2, bloquant à la fois la voie des prostaglandines et celles des leucotriènes (**Mallem et Gagny, 2014**).

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdes produites par les glandes surrénales et régulées par l'axe hypothalamo - hypophyso-surrénalien. Ces molécules inhibent plusieurs événements initiaux d'une réponse inflammatoire. Leur mode d'action est essentiellement génomique ; ils répriment la transcription de nombreux gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines, les molécules d'adhésion cellulaire et les enzymes clés impliquées dans l'initiation et / ou le maintien de la réponse inflammatoire hôte (**Ayroldi et al., 2012 ; Faure, 2009 ; Coutinho et Chapman, 2011**).

I.1.4.3. Les anti-inflammatoires naturels

De nombreuses maladies ont été décrites comme étant associées à des processus inflammatoires. La thérapie anti-inflammatoire actuellement disponible provoque des effets secondaires intolérables. Les plantes ont été la première source de remèdes dans l'histoire de l'humanité (**Fürst et Zündorf, 2014**).

Selon l'OMS(2012), environ 65 à 80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle à base de plantes pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire .Ces plantes médicinales sont considérées comme toutes plantes contenant une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des drogues utiles. L'Algérie est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés thérapeutiques. Un ensemble substantiel de preuves obtenues à la fois d'études *in vivo* et *in vitro* soutient le concept selon lequel les composés phénoliques des plantes agissent de la même manière que les AINS(Bendiabdellah,2014 ; Sofowora, 2010 ; Hussain et al.,2016).

Parmi la multitude de plantes médicinales contenant des principes actifs présumés responsables d'activité anti-inflammatoire existantes dans le monde(Sassi, 2008), nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de la plante *Punica granatum*.

I.2.1. Historique

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est l'une des espèces fruitières les plus anciennement cultivées. Durant ces dernières décennies, il prend de plus en plus d'importance et sa culture est passée du caractère traditionnel pour se développer en vergers commerciaux. Il est sans doute celui qui se prête aux usages les plus variés même décoratifs. Il n'est pas seulement utile par ses fruits aux teintes magnifiques mais par les produits qui en sont extraits (Haddioui A et al., 2012 ; Evreïnoff, 1957).

Son nom est dérivé du latin du *Malum granatum* (pomme à grains) et *Malum punicum* (pomme de Phénicie). Cet arbre est cultivé depuis l'antiquité dans de nombreuses régions géographiques différentes, y compris le bassin méditerranéen (Holland et al., 2009).

Les romains connaissaient la grenade grâce aux phéniciens qui l'apportaient de la Phénicie à Rome (MontassarB, 2018).

Le nom *Punica* est le nom romain féminisé de la ville de Carthage ; la ville antique dans le nord de la Tunisie d'où les meilleures grenades sont venues en Italie. Ce fruit était initialement connu comme *Malum punicum* : la pomme de Carthage, mais Linné a sélectionné le nom actuel avec l'épithète spécifique *granatum* signifiant granuleuse (Stover et Mercure, 2007)

Dans les écrits sacrés de l'islam la grenade a été également saluée. Les anciens commerçants arabes l'appelaient « le fruit de paradis » et en arabe folklore. Elle était le symbole du fluide de la vie. Le prophète Mohamed pensait que la grenade chassait l'envie et la haine. Le grenadier fut introduit en Europe dans le courant du VIII^{ème} siècle par les Arabes via l'Espagne où il fut abandonné cultivé en Andalous dans la province qui portera son nom (Ahton, 2006 ; Montassar, 2018).

En Égypte, la grenade était considérée comme le fruit des dieux. Le symbole de la fertilité et de la richesse, en raison de l'abondance de ses graines et de sa forme ronde (Ruis, 2015).

I.2. 2. Systématique botanique

I.2.2.1. Taxonomie

Quezel et Santa (1963), ont donné la systématique suivante du grenadier *Punica granatum* selon Linné (1753) :

Règne : Végétale
Embranchement : Phanérophytes

Sous Embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotyledones
Sous classe	: Gamapétales
Ordre	: Myrtiflorales
Famille	: <i>Punicacées</i>
Genre	: <i>Punica</i>
Espèce	: <i>Punica granatum</i>
Appellation :	Français : Grenadier
(Hmid, 2013)	Anglais : Pomegranate
	Arabe : Rommane

Selon la *Classification APG III (2009)*, qui est la troisième version de la classification moléculaire et cladistique des Angiospermes (plantes à graines) version revisitée de la classification APG de 1998 et APG II de 2003, le grenadier appartient au :

Clade	: Angiospermes
Clade	: Dicotylédones vraies
Clade	: Rosidées
Ordre	: Myrtales
Famille	: Lythraceae
Genre	: <i>Punica</i>
Espèce	: <i>Punica granatum</i>

I.2.2.2. Caractéristique

Le grenadier est un bel arbuste fruitier et ornemental, de hauteur variable entre 2 et 6 m. La floraison très décorative s'étale de mai à août. Les fleurs au calice tubulaire et coriace et d'où les pétales surgissent froissées sont solitaires ou regroupées en bouquets simples ou doubles. Elles choisissent une exposition ensoleillée et abritée. Amateur de soleil et de la chaleur, le grenadier s'est naturalisé très rapidement dans le sud de l'Europe. Il peut tolérer les sols

calcaires ou salins, et peut supporter occasionnellement le froid puisqu'il est rustique et peut vivre à -12°C durant l'hiver.

Les moyens de multiplication du grenadier ne manquent pas. Les plus simples et les plus utilisées étant le bouturage de fin d'été et le prélèvement des rejets du pied. Les grenades se récoltent à partir du mois d'octobre, lorsqu'elles sont presque mures. La maturation se finit après la cueillette, stockée dans un endroit frais et sec. Elles se conservent plusieurs mois (5 à 6 mois)(**Isabelle, 2018**).

La culture de grenadier doit se faire en formes libres, en plein vent. Elle peut être plantée dans un verger homogène ou plantation isolé, ou le long des murs et des haies (**Karim, 2010**).

I.2.2.3. Les variétés d'espèces

Il existe plusieurs variétés d'espèces du grenadier qui peuvent être classées selon :

- **La culture : (Karim, 2010)**

-*Punica granatum* « Grenadier de Provence » : qui est très résistant au froid (-15 °C).

-*Punica granatum* « Mollar de Elche » : qui résiste à -12°C et qui est un fruit sans graines.

-*Punica granatum* « Gabès » : qui résiste à -12°C.

- **Variété pour l'ornement : (Karim, 2010)**

-*Punica granatum* « Nana »: avec des fleurs doubles rouges orangés et résistent jusqu'à -15°C.

-*Punica granatum* « Nana Gracillissima »: avec des fleurs simples de couleurs rouges orangés.

- **La composition. (Irit et al, 2019)**

La teneur en sucre du fruit et son acidité varient selon les conditions de cultures et l'âge de l'arbre. Il existe :

- des variétés douces ou sucrées : qui contiennent moins de 0.9% d'acide citrique.
- des variétés aigres-douces : qui contiennent 0.9 à 1.8 % d'acide citrique.
- des variétés acides : qui contiennent plus de 1.8 % d'acide citrique.

I.2.2.4. Origine géographique

Punica granatum est originaire d'Asie centrale. Il a d'abord été découvert comme une plante sauvage. Plus tard seulement les gens qui vécurent dans les collines et les vallées de la région ont appris à consommer le fruit. Le grenadier est supposé avoir été domestiqué initialement dans la région transcaucasio-caspienne et la Turquie du nord puis il a été introduit dans toute

la région méditerranéenne et au reste de l'Asie et l'Afrique du nord. Les grecs ont distribué la grenade dans toute l'Europe. Les marins espagnols ont apporté des grenades aux Mexique et en Californie puis elle a continué d'être dispersée dans le monde entier atteignant la chine et Israël (Ashton, 2006 ; Holland, 2009; Stover et Mercure, 2007).

I.2.3. Production annuelle dans le monde et en Algérie

La grenade est de plus en plus consommée dans le monde pour ses vertus antioxydants. Iran est le plus grand producteur de grenade devant la chine, les Etats-Unis et l'Espagne (Figure N°04). L'Espagne exporte plus de 18 000 tonnes de grenade (70 % de la production). Elle a maintenant de nombreux concurrents sérieux sur le marché européen et mondial comme l'Iran, l'Inde ou la Turquie (Jacson, 2016 ; Melgarejo et Valero, 2012).

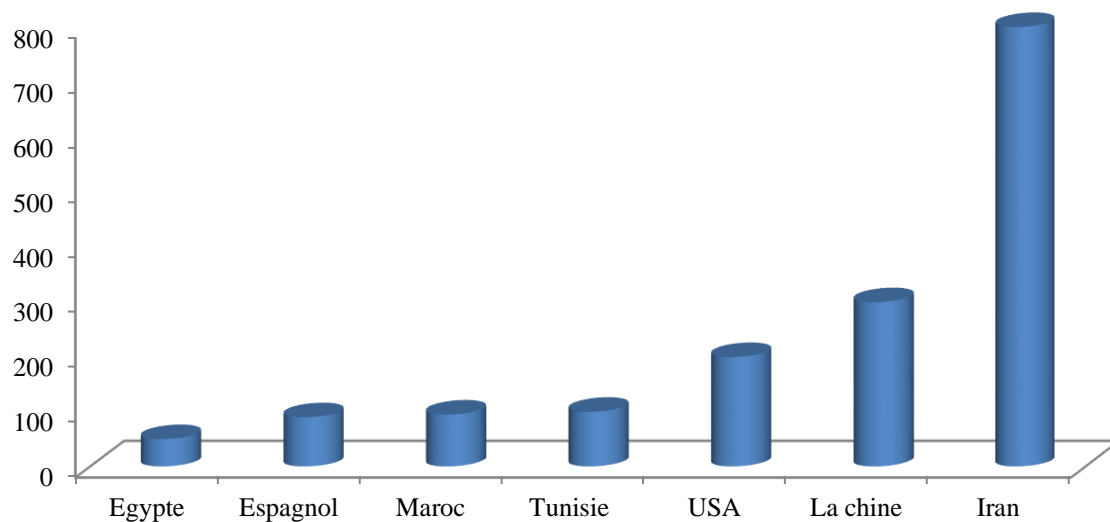


Figure N°04 : Production du grenadier dans le monde
(Melgarejo et Valero, 2012)

Selon la direction de l'agriculture (DSA) en 2018, seulement quelques wilaya d'Algérie participent à la production de grenade. Le tableau N°03 indique que Mostaganem est la wilaya la plus productrice de grenade en Algérie avec 186 261 Q, suivie par Djelfa 110 760 Q, M'sila 31 960 Q. La wilaya de Tlemcen est classée la dernière en terme de production (seulement 1590 Q).

Tableau N°03 : Production de Grenade en Algérie (DSA, 2018 ; Amara, 2019).

	Superficie plantée (Ha)	Superficie en rapport (Ha)	Production (Q)
Mostaganem	1140	1145	186 261
Djelfa	1240	1186	110 760
Relizane	723	705	90 565
M'sila	486	474	31 960
Tlemcen	444	205	1590

I.2.4. Variété de grenadier en Algérie

Il existe de nombreuses variétés de grenades de qualités très différentes. Les plus cultivées en Oranie seraient Tendral (Mollâ), Blanca et Si Hueso Colorado. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie. On ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze ...). Treize variétés sont actuellement autorisées pour la production et la commercialisation par l'état et elles sont regroupées dans le **tableau N°04** suivant **INRAA(2006)**.

Tableau N°04: Les variétés de grenadier autorisées à commercialiser en Algérie (INRAA, 2006).

Variétés de grenadier commercialisées en Algérie		
Messaad	Corde travita	Doux de Kolea
Gajin	Sefri	Zemdautomne
Spanish duoy	Chelfi	Moller huesso
Mélisse	Sulfani	
Espagne rouge	Papers shell	

I.2.5. Phytochimie

I.2.5.1. Aspect général

Le grenadier est une espèce monoïque qui appartient à la famille des *Punicaceae*. C'est un petit arbre qui peut atteindre 6m de haut. Sur le même arbre, il y'a des fleurs hermaphrodites

fertiles en formes de "vase", et des fleurs males stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés en forme de cloche. Le fruit est une grosse baie complexe presque ronde de la taille d'une pomme ou d'une orange. On le trouve le plus souvent sous forme de cépée, avec une tige unique. Les rameaux sont grêles parfois épineux. Les feuilles sont caduques opposées elliptiques (Hmid, 2013 ; Ben Abdennebi, 2012 ; Evreinoff, 1957) (Figure N°05).

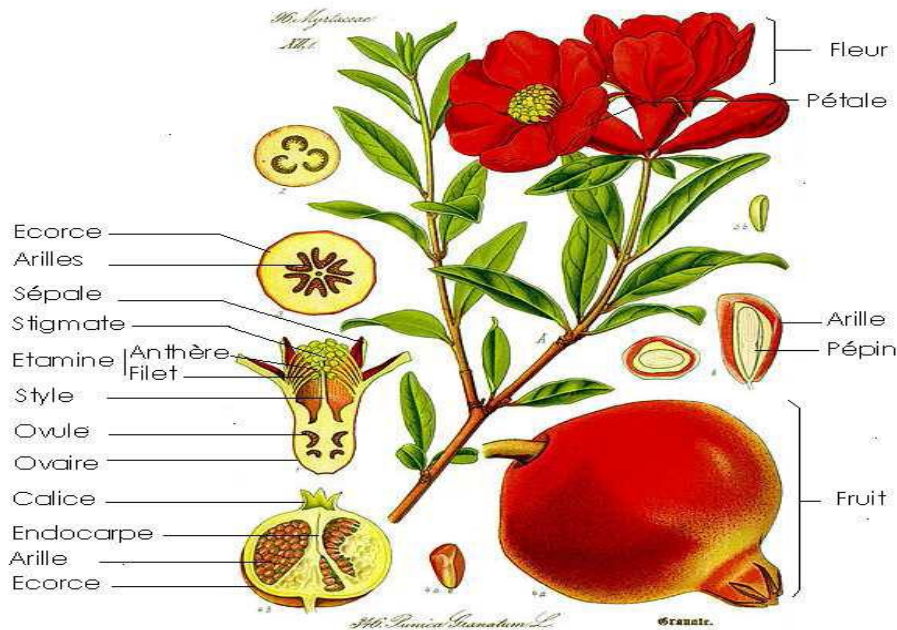


Figure N°05 : Fleurs et fruits du grenadier (*Punica granatum*)

(Von Deutschland et Schweiz, 1885).

a. Les feuilles

Les feuilles sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alternée ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est d'un vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée et la face inférieure est d'un vert clair et montre une nervure médiane très saillante. Ces feuilles entières, lancéolées assez coriaces et brillantes, présentent un limbe elliptique allongé de 3 à 8 cm de long. Leur sommet peut être obtus ou allongé. Elles sont munies d'un court pétiole de 1 à 5 mm de long, qui est généralement rougeâtre. Elles ne possèdent pas de stipule (Wald, 2009).

b. Les fleurs

Elles sont d'un rouge écarlate, sessile et régulier. Elles comprennent entre 5 et 7 pétales. Le calice est persistant et comprend entre 5 et 7 sépales. La fleur possède un ovaire infère et d'innombrables étamines (Cauchard, 2013).

c. Les fruits

Le fruit est relié à l'arbre avec une tige courte. Après l'établissement du fruit, la couleur de la peau des sépales en développement change continuellement, du rouge-orange au vert.

Le fruit presque rond est couronné par le calice. Le sommet de cette couronne est presque fermé à largement ouvert selon la variété et le stade de maturation (Holland, 2009c).

La couleur externe du fruit varie du jaune, vert, rose au rouge profond ou violet profond. La structure interne du fruit contient des chambres multi-ovules séparées par des parois membraneuses (IRITet al., 2019) (Figure N°06).



Figure N°06: La grenade et ses différentes parties
(Câlin Sanchez et al., 2005).

I.2.6. Les composés phénoliques

Ces composés sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent au métabolisme secondaire. Ils interviennent dans la défense des plantes contre les agressions environnementales. Ils correspondent à une grande variété de substances des plus hétérogènes, des plus nombreuses et des plus distribuées dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Gee et Johnson, 2001 ; Bruneton, 2009).

Dans cette classe de métabolites secondaires se trouvent de nombreux composés, qui peuvent être classés selon leurs structures et distribuer dans différentes parties du Grenadier (Figure N°07).

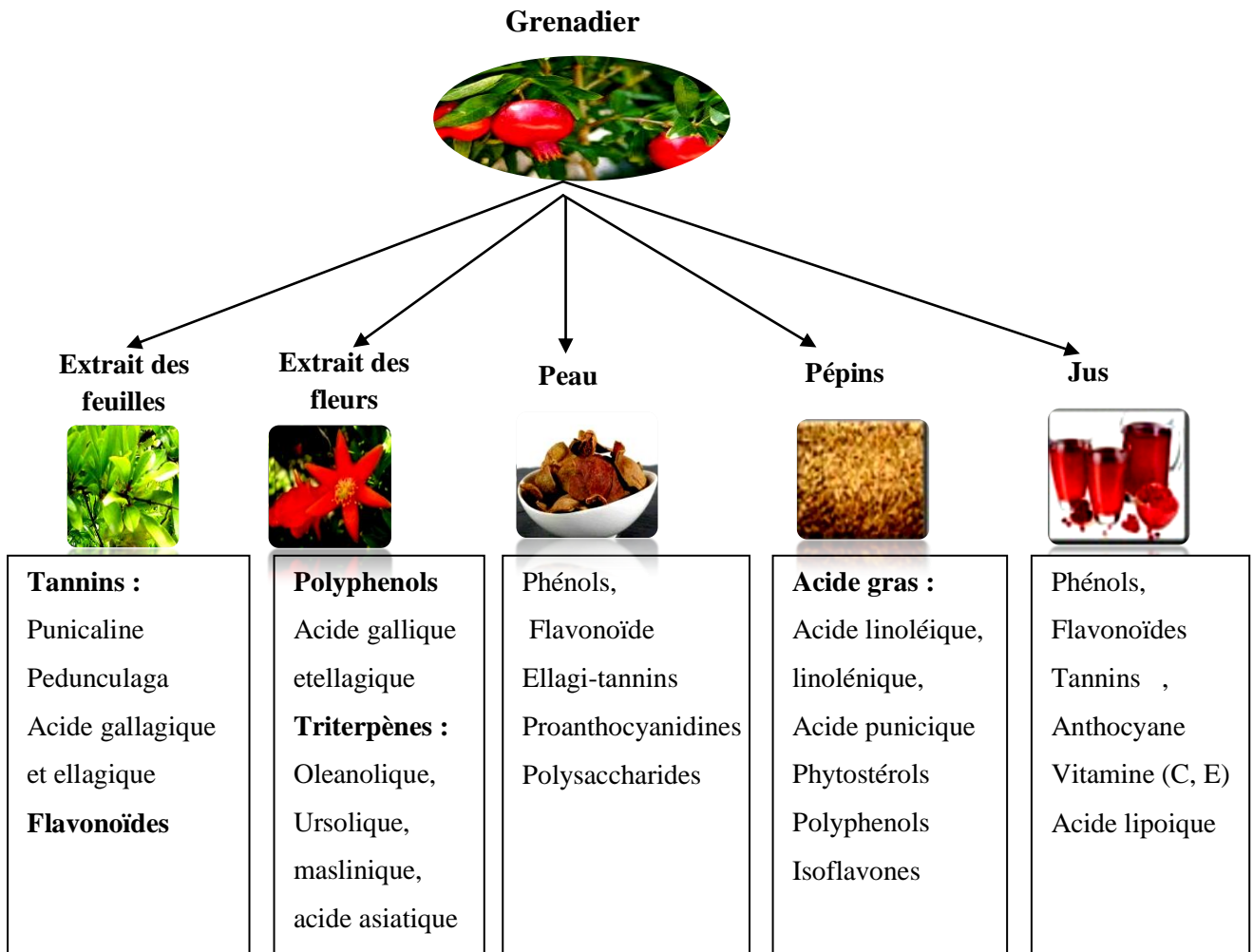


Figure N°07: Les principaux constituants des différentes parties du grenadier ou de leurs extraits (Al –Muammar et khan ,2012).

I.2.7.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. Ils sont principalement présents dans la grenade par la présence de l'acide gallique et l'acide ellagique (Daas, 2009 ; Amakura et al.,2000).(Figure N°08).

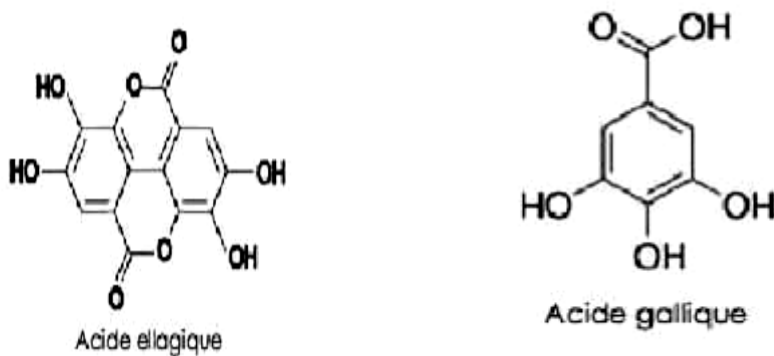


Figure N°08 : Squelette de base de l'acide ellagique et l'acide gallique (Moringuschi et *al.*,2003).

I.2.7.2. Flavonoïdes

Un flavonoïde est un métabolite secondaire. Sa structure de base est constituée d'un squelette carboné en C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane qui se divise en plusieurs sous-familles dont les principales sont : les flavonols, les flavones, les flavanonols, les flavanones, les flavanols et les anthocyanidines(**Figure N°09**). La classification de ces familles s'organise autour du degré d'oxydation du cycle pyranique C et de la substitution des carbones C3 et C4 de cet hétérocycle.

Leurs rôles s'étendent de la pigmentation servant à attirer les insectes pollinisateurs, à la protection de la plante contre les ultraviolets, ou aux défenses contre les attaques de pathogènes et des insectes ravageurs(**Liming, 2015**).

Le grenadier est l'un des végétaux les plus riches en cette substance qui donne la coloration aux fleurs et dans certains cas aux feuilles. Ces substances peuvent être jaunes, rouges, bleus ou violettes (**Gruffat, 2019**).

Ils peuvent neutraliser les espèces réactives et aident à protéger l'ADN contre diverses dégradations à l'origine de nombreuses pathologies comme :les maladies cardiovasculaires et les cancers (**société française des antioxydants, 2018**).

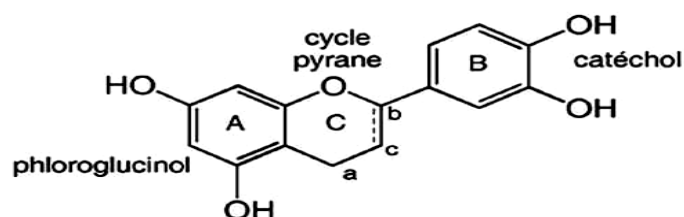


Figure N°09 : Squelette de base de flavonoïde (Moringuschi et *al.*,2003).

I.2.7.3. Les tanins

Ils sont définis comme des composés phénoliques hydrosolubles capables de lier et de précipiter des protéines et d'autres macromolécules dans des solutions aqueuses. En outre, ils sont connus pour lier les métaux et pour former des complexes bleus à noirs avec du sel de fer. Ces molécules ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 g.mol⁻¹ (**Pekka et Salminen, 2011**).

On les trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et les fruits... etc. On distingue deux types : (**Macheix et al., 2005 ; Nkhili, 2009**).

- **Les tanins hydrolysables** : appelés aussi ellagitannins (ETS) qui sont présents dans les grenades. Par hydrolyse enzymatique ou acide, ils donnent des sucres de l'acide gallique et ces différents dérivés comme l'acide ellagique (**Djahra, 2015**).
- **Les tanins condensés** : ou Proanthocyanidines qui sont très présents dans le thé et le raisin. Se sont des polymères formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (**Ben Abbes, 2011**).

I.2.7. Utilisation traditionnelle et moderne

Diverses parties de la grenade ont été traditionnellement utilisées comme traitements contre diverses maladies tels que les maux d'estomac et les infections bactériennes. Les usages traditionnels ont été renforcés par des études scientifiques modernes axées sur les métabolites bénins pour la santé et recommandés pour leurs effets thérapeutiques sur la santé humaine et animale. Les études des derniers années montre que la plupart des effets thérapeutiques de la grenade ont été attribués à ses métabolites secondaires et primaires comme : les polyphénols y' compris les flavonoïdes, anthocyanes et tanins hydrolysables, les acides gras et les lipides (**IRITet al., 2019**).

I.2.8. Activités thérapeutiques de *Punica granatum*

Le grenadier a été utilisé depuis des siècles pour ses vertus thérapeutiques comme :

I.2.8.1. Effet antioxydant

Plusieurs études récentes sur la grenade soulignent principalement son rôle de vasculoprotecteur attribué à la présence de tannins hydrolysables, des ellagi-tannins et de

l'acide ellagique qui réduisent le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique (**Dongdong et al.,2018**).

Selon une étude réalisée par **Kartik en 2015**, sur des rats mâles, montre qu'une dose élevée de 200 mg/Kg d'extrait de fruit de *P. granatum* réduit de manière significative les taux de cholestérol total et de triglycérides et augmente le taux de HDL. Cette dose est efficace pour réduire les substances réactives à l'oxygène ERO et augmente les taux d'enzymes antioxydants.

I.2.8.2. Effet anti-inflammatoire

Les résultats obtenus par **Jianjun en 2017**, montrent que l'extrait éthanolique de fleur du grenadier produit un effet anti-inflammatoire potentiel en modulant la synthèse de plusieurs médiateurs et cytokines impliqués dans le processus inflammatoire tel que le TNF- α . 18.

a. Rôle sur l'activation des NF- κ B.

Dans les phénomènes inflammatoires, l'activation de NF- κ B est généralement intéressante puisqu'elle permet à l'organisme de stimuler ses processus de défense.

Une étude a été réalisée sur des kératinocytes d'un épiderme humain normal, afin d'évaluer les effets d'une exposition excessive aux UV-B. Pour cet essai, les kératinocytes sont prétraités par des extraits de grenade. Ensuite, les cellules sont exposées aux UV-B. Six heures après, les cellules sont lysées. Les extraits de grenade permettent de diminuer l'activation de NF- κ B dans les kératinocytes exposés aux UV-B. Ainsi, les extraits de grenade semblent, de manière dose-dépendante, réduire le processus inflammatoire induit par l'exposition aux UV-B (**Afaq et al.,2005**).

b. Activité sur les cyclo-oxygénases (COX)

Afin de déterminer le pouvoir d'extraits de grenade sur les cyclo-oxygénases, une expérience a été réalisée en New Zealand sur six lapins mâles blancs, âgés d'un an et qui ont reçu par voie orale 10mL d'extraits de grenade. Les extraits utilisés sont obtenus par l'action extractive du méthanol sur de la poudre de grenades entières séchées. Le plasma de ces lapins est prélevé avant et deux heures après l'ingestion de l'extrait de grenade. Des analyses spectrométriques, par chromatographie liquide haute performance, permettent d'identifier de l'acide ellagique dans le plasma prélevé chez les lapins traités par l'extrait de grenade. Ces plasmas sont ajoutés à des kits d'analyse de l'inhibition des COX (Cayman Chemicals). On mesure alors

l'activité des COX 1 et 2 au contact de ces plasmas dilués au dixième. Les résultats obtenus avec le plasma des lapins avant l'ingestion de l'extrait de grenade sont utilisés comme contrôle. En présence du plasma prélevé après la complémentation en extrait de grenade, on observe, une forte diminution de l'activité des COX-2 et un maintien de l'activité des COX-1. Ainsi, il semble que l'extrait de grenade, et plus précisément l'acide ellagique, possède des pouvoirs anti-inflammatoires. De plus, l'acide ellagique permet de lutter contre l'inflammation tout en conservant les fonctions physiologiques des organes tels que le rein et l'estomac. De ce fait, il n'y a aucun risque de provoquer ou d'aggraver un ulcère de l'estomac en utilisant des extraits de grenade comme des anti-inflammatoires (**Prasan, 2009**).

I.2.8.3. Effet anticarcinogénique

Les extraits de grenade de jus fermenté induisent la mort cellulaire dans les lignées cellulaires du cancer de prostate et inhibent de manière significative la croissance tumorale (**Channing et al, 2017**). Il a été démontré que le jus de grenade stimule l'expression et /ou l'activation de molécules qui modifient le cytosquelette et les mécanismes d'adhésion des cellules cancéreuses de la prostate provoquant une meilleure adhésion cellulaire et une migration cellulaire moindre (**Prasan, 2012**).

I.2.8.4. Effet antibactérien

Les résultats des études de **Vahid et ses collaborateurs (2014)**, indiquent que l'extrait de fleur de *P. granatum* empêchait la formation de biofilm bactérien à fil orthodontique. Il a été mentionné que l'extrait a une activité antibactérienne à partir d'une certaine concentration, c'est la CMI.

L'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de fruit de *P. granatum* est testée sur 5 souches bactériennes de référence. Cette activité est évaluée par la méthode de l'aromatogramme. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches microbiennes testées sont inhibées par l'un des extraits aqueux, éthanolique ou méthanolique (**Athmen et al., 2017**). Les zones d'inhibitions des extraits de *Punica granatum* sont supérieures à celles des antibiotiques de références comme l'ampicilline, l'amoxicilline et la tétracycline (**Reguieg et Hammadi, 2017**).

Les extraits de zeste de grenade ont été les plus efficaces pour inhiber la croissance d'un certain nombre de bactéries comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Karthikeyan et Vidya, 2019).

I.2.8.5. Effet antiviral

Une étude a également montré que l'acidité du jus de grenade et des solutions concentrées d'extraits de grenade contribuait à une activité antigrippale rapide, et permet le blocage compétitif de la réplication de l'ARN viral (Haidari et al., 2009 ; Amy et al., 2013).

2.8.6. Effet antidiabétique

Différentes études ont montré l'effet antidiabétique de *P.granatum* et les différents mécanismes d'action proposés et qui sont résumés dans le **tableau N°05**.

Tableau N°05 : Les études réalisées sur l'effet antidiabétiques de *P. granatum*.

Effet	Partie de la plante	Modèle biologique	Références
Diminution de la glycémie	Fleurs	Rats diabétiques (alloxane)	Jafri et al., (2000)
	Écorce de fruits	Rats diabétique (alloxane)	Parmar et al., (2007)
	Graines	Rats streptozotocine	Ashish et al., (2001)
c. Inhibition α -glucosidase d. Augmentation de la sensibilité à l'insuline par activation du PPAR- γ e. Restauration des ARNm GLUT-4 cardiaques f. Modulation des enzymes du métabolisme glucidique g. Rats streptozotocine	Fleurs	Rats Zucker diabétique fatty	Manoharan (2009)

I.2.8.7. Autres activités

- La consommation de jus a montré une augmentation de la concentration des spermatozoïdes dans l'épididyme, de la mobilité des spermatozoïdes et de la densité des cellules spermatogène (**Türk et al.,2008**).
- L'activité neuroprotectrice des polyphénols du grenade a été évaluée chez des souris transgénique d'Alzheimer. Il a été constaté qu'il y avait une réduction de l'accumulation de protéine beta –amyloïde (**Padmaja et al.,2015**)
- *Trichomonas vaginalis* est un problème de santé mondiale important et très grave. Des études *in vitro* montre que l'extrait de grenade a un effet anti –trichomonas vaginale prometteur (**Padmaja et al.,2015**)
- Des études mettent en évidence la capacité de la grenade, de son jus et de sa peau, à préserver le capital osseux dans un modèle préclinique d'ostéoporose post ménopausique. Cet effet bénéfique est en partie expliqué par un effet direct sur les cellules osseuses tel qu'une augmentation de la différenciation ostéoblastique et une favorisation de la synthèse de matrice osseuse. A cela s'ajoute la capacité de l'huile de pépins et de l'extrait de peau à protéger le microenvironnement osseux du développement d'un stress oxydatif et d'une inflammation (**Spilmont et al.,2013**).
- Les graines de grenade possèdent une activité ostrogénique en raison de l'amélioration de l'état dépressif cliniquement important du syndrome ménopausique des femmes (**Padmaja et al.,2015**).
- La consommation de grenade permet une réduction de l'incidence des pathologies cardiaques telles que l'athérosclérose, l'hypertension et cette protection serait due à sa capacité à inhiber l'oxydation des LDL (**Basu et Penugonda 2009; Edeas 2010**).
- La grenade est dotée aussi de vertus intéressantes pour la réparation tissulaire après exposition aux radiations UV (**Hayouni et al.,2011**).

I.2.9.Toxicité des composés phénoliques de la grenade

Une étude élaborée par **Vidal et ses collaborateurs (2003)** a montré que les extraits phénoliques des fruits entiers causent une congestion des organes internes et une élévation de la créatinine *in vivo*. L'huile de pépins de grenade n'était pas toxique pour les larves de crevettes de saumure (**Fatope et al.,2002**), mais des réactions allergiques graves et un cancer d'œsophage ont été mentionnés suite à une consommation très élevée de grain de grenades (**Ghadirian et al.,1992 ; Hegde et al.,2002**).

I.3.1. Méthodes utilisées dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire peut être réalisée selon deux approches (*in vivo* et *in vitro*). La méthode *in vivo* est généralement exercée sur des animaux de laboratoire, où une inflammation aiguë peut être produite en utilisant divers agents chimique ou mécanique.

Les études, *in vitro*, peuvent éclairer le mode d'action des agents anti-inflammatoires au niveau moléculaire. Ces études sont souvent réalisées dans un système d'organes isolé, ou des préparations cellulaires ou subcellulaires (Naik et Sheth, 1976).

Plusieurs méthodes soit *in vivo*, ou *in vitro* ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes médicinales.

I.3.2. Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des feuilles de *P. granatum*

Les globules rouges sont choisis comme modèle pour le test de stabilisation membranaire grâce à leur membrane qui est analogue à la membrane lysosomale. La stabilisation de la membrane érythrocytaire implique la stabilisation de la membrane lysosomale qui est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la sortie des enzymes lysosomales (Vadivu et Lakshmi, 2008).

Certains des AINS sont connus pour posséder des propriétés qui conduisent à la stabilisation membranaire. Ces propriétés peuvent contribuer à la puissance de leur action anti-inflammatoire (Vadivu et Lakshmi, 2008b). De plus, les érythrocytes ne contiennent pas des organites et possèdent seulement une membrane plasmique, ce qui facilite l'étude des interactions entre médicament et biomembrane (Reddy et al., 2007).

I.3.3. Composition et hémolyse du sang

Le sang est un fluide corporel dont la fonction principale est de transporter les l'oxygène vers les tissus biologiques. Les cellules du sang sont les érythrocytes ou GR (99%, demie de vie = 120 jour), les leucocytes ou GB (0,2%) et les thrombocytes ou plaquettes (entre 0,6 et 1 %). La membrane érythrocytaire est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous membranaire. Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du GR des déterminants des groupes sanguins. Une perturbation de cette membrane après une durée de vie de 120 jours provoque une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine conduisant à un phénomène physiologique irréversible, qui est l'hémolyse

(hemo : sang, lyse : destruction. Cette dernière peut être pathologique. C'est la destruction précoce et exagérée des globules rouges circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (Hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire) tels une réponse anormale du système immunitaire, la formation de caillots dans les petits vaisseaux sanguins, certaines infections et les effets secondaires de certains médicaments (**Beaumont, 2005 ; Hoffman, 2008 ; Mintzer et Billet, 2009 ; Thomas, 2013 ; M-catin et al., 2016**).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les feuilles de *Punica granatum* (**Figure N°010**), récolté dans la Wilaya d'Ain Témouchent, située dans l'ouest d'Algérie. Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante en utilisant un broyeur automatique puis soumises à l'extraction.



Figure N°10 : Photo du matériel végétal

II.2.Méthodes

II.2.1. Préparation des différents extraits de *Punica granatum*

Pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *Punica granatum*, des extraits bruts sont préparés à partir des feuilles de la plante.

II.2.1.1. Extrait brut aqueux

40 g de la matière végétale sont mises en contact avec 200mL d'eau distillée froide. L'ensemble est laissé macérer durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 45°C. Le produit est récupéré sous forme de solide de couleur marron (**Figure N°11**).

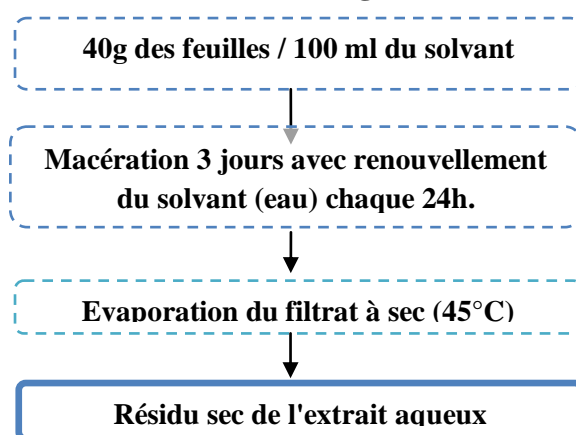


Figure N°11:Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de *Punica granatum*

II.2.1.2. Extrait brut eau/Méthanol et eau/acétone

Selon la méthode de **Upson et coll. (2000)**, 5 g de la matière végétale séchée, sont placées dans un récipient en verre couvert de 100 ml de méthanol aqueux 70% ou d'acétone aqueux 70% ; le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal et empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique). L'échantillon est laissé macérer durant 24h, et l'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration des fractions sur du papier filtre, elles sont réunies et évaporées à sec en utilisant un rota vapeur a 45-50°C (**Figure N°12**).

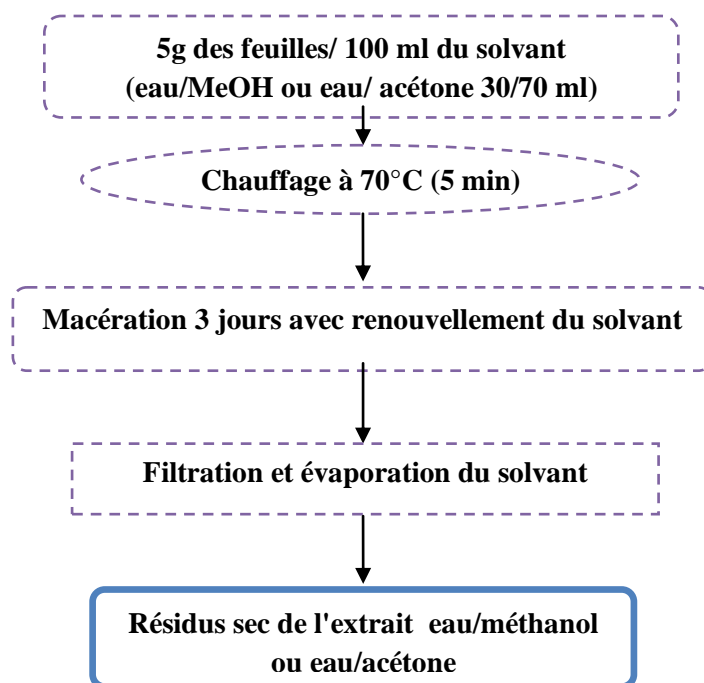


Figure N°12 : Schéma de l'extraction eau/méthanol ou eau/ acétone des feuilles de *Punica granatum*

II.2.2. Le rendement des extraits secs

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation ;

P2 : poids du ballon vide avant évaporation ;

P3: poids de la matière végétale initial.

II.2.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les trois extraits des feuilles de *Punica granatum*.

- **Les tanins (Karumi et al.,2004)**

On ajoute 3 gouttes de FeCl₃ 1% à 1 mL d'extraits. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

- **Les flavonoïdes (Karumi et al.,2004)**

2 mL de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d' HCL 37%, et avec 0.5 g de tournure de magnésium (Mg). Le test positif est marqué par l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes.

- **Les terpénoïdes**

On ajoute 1 mL de chloroforme et 1.5 mL de H₂SO₄ concentrée à 2.5 mL de nos extraits. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

- **Les stéroïls: réaction de Libermann-Burchard**

On traite 1 mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d'H₂SO₄ concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

- **Les coumarines**

A 1 mL de chaque extrait, on ajoute 1 mL d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5 mL de NH₄OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines (**Bruneton, 1999**).

- **Les alcaloïdes**

2.5 mL d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 0.1 mL d'extrait, et incubés au bain- marie pendant 10 min. La solution obtenue est divisée en deux parties. On ajoute à l'une le réactif de Mayer et à l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Réactif de Mayer: Dissoudre 1.358g d' HgCl_2 dans 60 mL d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100mL.

Réactif de Wagner: Dans 75mL d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec l'eau distillée.

- **Les quinones libres**

A un volume de 1mL de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyede, 2005).

- **Les saponosides**

On ajoute 1 mL d'eau distillée à 2 mL de chaque extrait, puis la solution est agitée pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes. Le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1cm.

- **Les composés réducteurs**

On ajoute à 1 mL de nos extraits 0.5 mL de Liqueur de Fehling A et B puis on chauffe les tubes au bain marie à 100°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (Trease et Evans, 1987).

II.2.4. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes

II.2.4.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

Les trois extraits bruts : aqueux, hydro-méthanolique et hydro-acétonique de la plante *Punica granatum* sont solubilisés dans le méthanol à une concentration de 1,25 mg/mL pour le dosage des flavonoïdes et des polyphenols.

II.2.4.2. Dosage des polyphenols totaux

a- *Principe*

La méthode est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus

Matériel et méthodes

de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphenols présentes dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

a- Mode opératoire

Le dosage des polyphenols est réalisé selon la méthode décrite par **Wang et al., (2006)**:

- ➔ 0,1 ml de l'échantillon est mélangé avec 2.5 ml d'une solution de Folin ciocalteu (10 fois dilué).
- ➔ Agitation au vortex
- ➔ Laisser reposer 5 minutes
- ➔ Addition de 2,5 ml d'une solution de Carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2%
- ➔ Laisser reposer pendant 30 minutes à la température ambiante
- ➔ La lecture est faite à 725 nm contre un blanc

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0,018-0,037-0,075-0,15-0,31-0,625-1,25 mg/ml).

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait et calculés selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de polyphenols} = a .f/b$$

a : Concentration en polyphenols en mg/ml déterminée à partir de la courbe d'étalon

f : Facteur de dilution (x50)

b : Concentration initiale de l'extrait (1,25 mg/ml)

II.2.4.3. Dosage des flavonoïdes

a- Principe

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

b- Mode opératoire

- 500 μL de l'échantillon sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée
- Addition de 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 %
- Laisser reposer pendant 6 minutes
- Addition de 150 μL de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à 10%
- Laisser reposer pendant 6 autres minutes
- Addition de 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%
- Le volume total est complété à 5 mL d'eau distillée
- Agiter et laisser reposer pendant 15 minutes

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,0045- 0,018- 0,037 – 0,075 – 0,15 – 0,31 – 0,625- 1,25 mg/mL).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait. Selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de flavonoïdes} = \mathbf{a \cdot f / b}$$

a : Concentration des flavonoïdes en mg/mL déterminée à partir de la courbe étalon

f : Facteur de dilution (x10)

b : Concentration initiale de l'extrait (1,25 mg/mL).

II.2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des feuilles de *Punica granatum*

II.2.5.1. Echantillons de sang humain

Des échantillons de sang frais (environ 6 mL) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, à l'université Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires (18-40 ans) n'ayant pas pris de médicaments anti-inflammatoires, durant les deux dernières semaines avant le prélèvement.

II.2.5.2. Préparation du phosphate buffered saline (PBS)

Pour préparer la solution tampon de PBS à pH=7,4, nous avons utilisé les composés suivants avec les concentrations qui leurs correspondent : Na₂HPO₄ (8Mm) ; KH₂PO₄ (2Mm) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137mM) (Mohan, 2006).

II.2.5.3. Préparation de la suspension des globules rouges humains

Les échantillons de sang récupérés ont été centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min. Le surnageant est, par la suite, éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec du PBS, jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, en centrifugeant à chaque fois à la vitesse 3000 rpm, pendant 5 min. La suspension érythrocytaire ainsi obtenue été diluée 20 fois par PBS (1mL de culot est dilué dans 19mL de solution tampon).

II.2.5.4. Préparation des extraits végétaux

Différentes concentrations d'extraits de la plante (0,058mg/mL, 1,117mg/mL, 0,234mg/mL, 0,468mg/mL, 0,937mg/mL, 1,875mg/mL, 3,75 mg/mL, 7,5 mg/mL, 15 mg/mL et 30 mg/mL) sont solubilisées dans le PBS.

II.2.5.5. Evaluation de la toxicité des extraits des feuilles de *Punica granatum* vis-à-vis des globules rouges

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits de feuilles de *Punica granatum*, un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser. En effet, 1,6 mL de différentes concentrations des trois extraits à tester, ainsi que diclofenac, pris comme molécule anti-inflammatoire de référence, ont été mélangées avec 0,4 mL de la suspension de globules rouges à 10 %. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 min, puis

centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été effectuée à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, un contrôle incluant 0.4 ml de la suspension de globules rouges et 1,6 mL d'eau physiologique ou de l'eau distillée, à la place de l'extrait, a été préparé pour vérifier l'état des globules rouges ou le 100 % d'hémolyse, respectivement.

Le pourcentage d'hémolyse est calculé comme suit : **Shobana et Vidhya,(2016)**.

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At / Ac) * 100$$

At : absorbance de l'échantillon (test)

Ac : absorbance de control (100 % d'hémolyse)

II.2.5.6. Evaluation de l'effet des extraits de *Punica granatum* L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Le test se base sur l'effet des extraits de la plante étudiée sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée, selon le protocole de (**Ganesh Gadamsetty et al., 2013**).

Dans des tubes à hémolyse, 0,5 mL d'extraits de feuilles de *Punica granatum*, 1,5 mL du tampon phosphate (0,15 M, pH 7,4) et 2 mL de la solution hyposaline (NaCl à 0,36 %) ont été mélangés et incubés, à 37 °C pendant 20 min. Par la suite, un volume de 0,5 mL de la suspension des érythrocytes (10 %) a été rajouté pour chaque tube, enchainé d'une incubation, à 56 °C pendant 30 min. Les tubes ont été mis dans de l'eau froide pendant 20 min, afin d'arrêter la réaction ensuite centrifugé, à 3000 rpm pendant 5 min. La lecture d'absorbance du surnageant est faite à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre, Le contrôle consiste en un mélange de 2 mL de la solution hyposaline, 2 mL du tampon PBS, 0,5 mL de la suspension de globules rouges et 0,5 mL d'eau physiologique.

Le diclofenac est utilisé comme molécule de traitement anti-inflammatoire, avec les mêmes concentrations que l'extrait.

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(Ac - At) / Ac] * 100$$

Ac : absorbance de control.

At : absorbance de l'échantillon (test).

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Préparation des extraits des feuilles de *Punica granatum*

L'extraction brute des feuilles de *Punica granatum* permet d'obtenir tous les métabolites secondaires. Les différents extraits bruts des feuilles de grenadier sont préparés dans la présente étude par macération de la poudre des feuilles dans les mélanges méthanol/eau, acétone/eau et dans l'eau. L'utilisation de ces mélanges a pour but d'extraire les composés polaires ainsi que les composés moyennement et faiblement polaires. L'aptitude du méthanol à augmenter la perméabilité des parois cellulaires, facilite l'extraction d'un plus grand nombre de composés et permet également de prévenir la croissance microbienne au cours de la macération (Seidel, 2005). De même le déroulement de cette extraction à température ambiante, ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite, permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extractions.

Toutefois l'eau n'est pas le solvant idéal pour plusieurs constituants bioactifs des plantes. Elle permet d'extraire préférentiellement les composés polaires. A température élevée, l'eau peut aussi extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kinghon, 2006).

III.2. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait séché, exprimé en pourcentage par rapport à 100g de poudre de feuilles.

D'après les résultats obtenus dans **la figure N°13**, nous pouvons déduire que les macérations dans la solution hydro-méthanoïque (Eau/Méthanol) et hydro-acétonique (Eau/Acétone) permettent d'obtenir les rendements les plus élevés de l'ordre de 38% et 37% respectivement par rapport à la macération dans l'eau estimée à 21%.

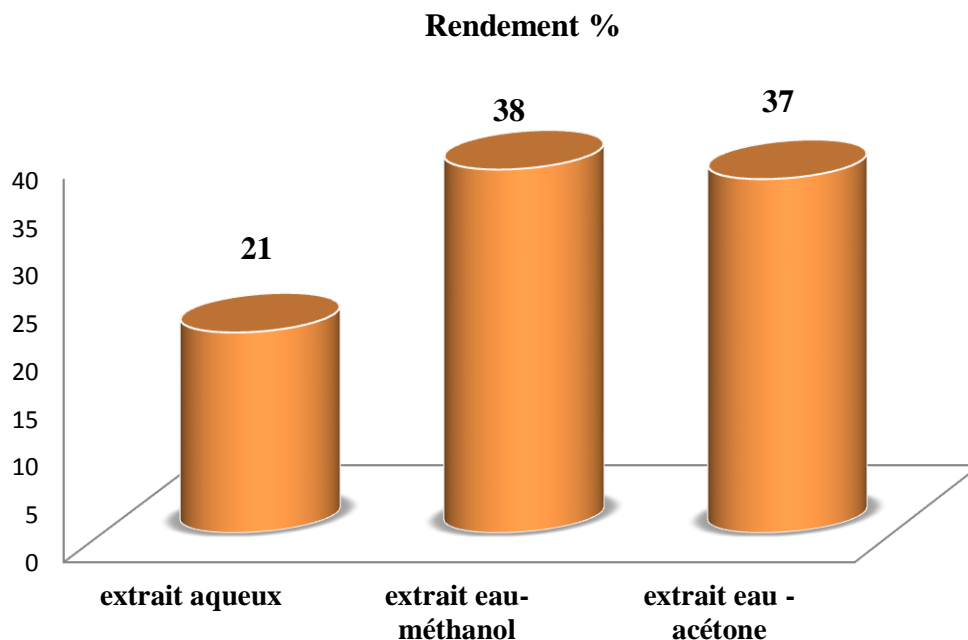


Figure N°13 : Le rendement d'extraction des feuilles de *Punica granatum L.*

Nos résultats obtenus dans la **figure N°13** sont supérieurs aux rendements obtenus par **Achouche et son équipe en 2019**, qui ont trouvés des rendements de l'ordre de 22,43% et 10,98 % pour l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait aqueux respectivement.

Le rendement peut être différent d'une méthode à une autre et il est lié à plusieurs facteurs : génétiques, physiques et climatiques mais aussi aux techniques de séchage et de conservation qui ont été choisies. (**Quy-Diem et al., 2014**).

Le rendement d'extraction dépend aussi de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition d'échantillon. L'utilisation combinée d'eau et du solvant organique peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et/ou dans le solvant organique (**Quy-Diem et al., 2014**).

III.3. Analyses qualitatives

Les phyto-investigations de base des extraits pour déterminer leurs principaux constituants (phyto-composés) sont vitales car les principes actifs de nombreux médicaments sont des métabolites secondaires trouvés dans les plantes.

Le screening phytochimique a permis de détecter la présence des composés chimiques dans les trois extraits de *Punica granatum*. La présence de ces composés est confirmée soit par la

Résultats et discussion

formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit par la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (EL-Haouda et al.,2018).

D'après les résultats représentés dans le **tableau N°06**, nous pouvons constater que les tanins et les composés réducteurs sont fortement présents dans les trois extraits étudiés. Concernant les flavonoïdes et les terpénoïdes, ils sont fortement présents dans l'extrait aqueux et moyennement présents dans l'extrait hydro-méthanolique. Une faible coloration de ces deux métabolites est détectée dans l'extrait hydro-acétonique.

Les stérols sont présents dans les trois extraits avec une faible teneur. Les quinones libres et les alcaloïdes sont absents dans l'extrait aqueux et faiblement présents dans l'extrait hydro-acétonique par rapport à l'extrait hydro-méthanolique.

Cependant, nous avons remarqué une absence totale en saponines et en coumarines au niveau des trois extraits testés.

Tableau N°06: Les résultats du screening phytochimique des extraits testés

Les résultats sont classés comme suit ; Elevé (+++), Modéré (++) , bas (+) et nul (-) sur la base de l'intensité du produit de réaction coloré.

Extractions Composants	Réactifs	Extrait aqueux	Extrait méthanol /eau	Extrait acétone /eau	
Tanins	FeCl ₃	+++	+++	+++	
Flavonoïdes	HCl Mg	+++	++	+	
Terpénoïdes	H ₂ SO ₄	+++	++	+	
Stérols	Anhydride acétique	+	+	+	
Coumarine	NH ₄ OH	-	-	-	
Alcaloïdes	HCl	Mayer	-	+	++
		Wagner	-	+++	+
Quinones libres	NaOH	-	++	+	
Saponosides	Indice de mousse	--	-	-	
Composés réducteurs	Fehling	+++	+++	+++	

Les niveaux de présence des différentes familles de métabolites secondaires dans la grenade diffèrent selon le type de solvant utilisé pour extraire ces composés (**Kaci-Meziane et al.,2017**). Le méthanol est un extracteur efficace pour une large gamme de polyphénols, et fréquemment utilisé à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. Sachant qu'il est facilement accessible et bon marché (**Wang et al.,2004**).

Concernant le screening chimique, nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Moualkia et Gourmati en 2015**, qui confirment l'absence des saponosides et la forte présence des tanins et des composés réducteurs dans les feuilles de grenadier.

Les résultats des analyses qualitatives trouvés sont partiellement en accord avec les résultats trouvés par **Sreedevi et al.,(2017)**,qui ont détecté la présence des saponines dans l'extrait hydro-alcoolique et aqueux.

Nos résultats obtenus sont contradictoire avec les analyses qualitatives des composés phytochimiques qui ont été réalisé par l'équipe du chercheur **Eddebbagh en 2016** sur les feuilles de *P.granatum* marocaineet qui montrent une absence des stérols, des alcaloïdes et des quinones ainsi qu'une présence sous forme de traces des flavonoïdes.

Ces différences peuvent non seulement être dues à une variation génétique qui conduit à la variation de la biosynthèse phénolique du métabolite secondaire dans les feuilles de *P.granatum*, mais aussi à des critères différents pour la sélection du temps optimal de récolte (**Hernández et al.,2014**).

La présence des composés phénoliques dans notre plante diffère selon plusieurs facteurs endogènes et exogènes comme : les facteurs climatiques, génétiques, le stade de développement, le degré de maturation, la période de récolte et la méthode d'extraction utilisée (**Aganga, 2001**). La présence de ces différents phyto-constituants peut être responsable des propriétés thérapeutiquesde la grenade.

III.4.Analyses quantitatives

III.4.1.Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthodeutilisant le réactif de FolinCiocalteu. La teneur en polyphénols totaux a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage, et exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EQ/ g d'extrait). La teneur en polyphénols dans nos trois extraits testés (aqueux, eau/méthanol, eau/acétone) a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec

Résultats et discussion

différentes concentrations (0,018-0,037-0,075-0,15-0,31-0,625-1,25mg/mL) d'une solution standard d'acide gallique.

Notre courbe d'étalonnage comprend une équation de la régression linéaire ($y = 0,6566x$) et un coefficient de corrélation de ($R^2 = 0,996$) et qui sont représentés sur **la figure N°14**.

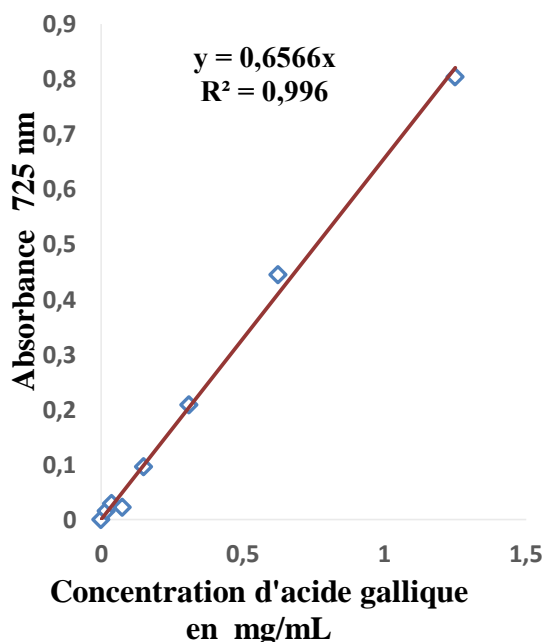


Figure N°14: La courbe d'étalonnage d'acide gallique

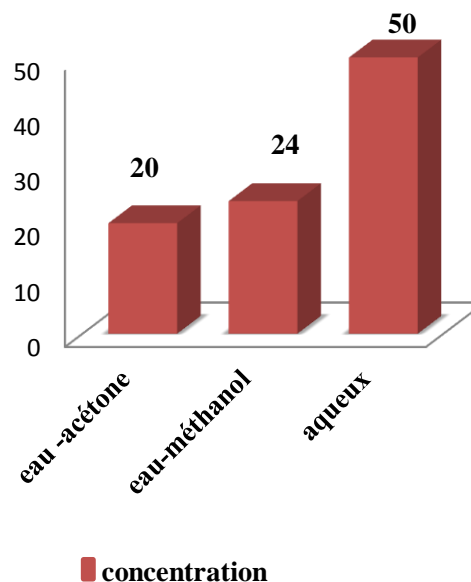


Figure N°15 : La teneur en polyphénols totaux des extraits en mg EQ /g d'extrait

Le résultat obtenu dans **la figure N°15** indique que l'extrait aqueux est plus riche en polyphénols totaux par rapport à l'extrait hydro-méthanolique et hydro-acétonique, avec des teneurs estimées à 50 mg EQ /g, 24 mg EQ/g et 20 mg EQ/g d'extrait sec respectivement.

on a constaté qu'il n'y a pas une grande différence entre les deux extraits hydro-alcooliques.

A partir des résultats obtenus, nous avons observé des teneurs variées en polyphénols dans les différents extraits des feuilles de *P. granatum*.

L'extraction des composés poly phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs. Elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques. La grande majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges du solvant organique approprié avec de l'eau (**Mahmoudi et al.,2013**).

En générale, les composés phénoliques dans les plantes sont des composés polaires, qui sont souvent extrait avec des solvants polaires tels que l'hydro-acétone et le méthanol. Les profils phénoliques différaient également quand différents solvants sont utilisés et régit par plusieurs facteurs qui influent directement sur les teneurs de ces molécules. Parmi ces facteurs nous retrouvons : l'augmentation de la température de l'extraction et le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction (**Karmakaret *al.*,2011 ; Kylli, 2011**).

L'étude de **Sreedevi et *al.*,(2017)** sur les feuilles de *P.granatum* indienne, a montré une grande teneur en polyphénols supérieurs aux notre et ceci dans les extraits de grenadier et plus précisément dans l'extrait aqueux ($274,1 \pm 0,65$ mg EAG/g) et l'extrait méthanolique ($117,6 \pm 0,76$ mg EAG/g).

Dans la littérature, il est mentionné que, la teneur en composés phénoliques diffère d'une étude à l'autre, et cela en fonction de procédé suivi pendant l'extraction et le dosage des composés phénoliques. De plus, d'autres paramètres pourraient influencer la composition en composés phénoliques, comme le degré de maturité de l'échantillon lors de sa collecte et son analyse. En fait, la teneur en poly-phénoliques totaux augmente au début de la croissance de la peau, mais diminue ensuite généralement au cours de la maturation (**Mirdehghan et Rahemi, 2007 ; Çam et Hışıl, 2010; Elfalleh et *al.*,2012; Saad et *al.*,2012; Malviya et *al.*,2014**).

III. 4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium et la soude. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EQ/ g d'extrait).

La teneur en flavonoïdes dans nos trois extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec différentes concentrations (0,0045- 0,018- 0,037- 0,075- 0,15 – 0,31 – 0,625 – 1,25 mg/mL) d'une solution standard de catéchine.

Notre courbe d'étalonnage comprend une équation de la régression linéaire ($y= 1,2037x$) et un coefficient de corrélation $R^2= 0,7775$ qui sont reportés sur **la figure N°16**.

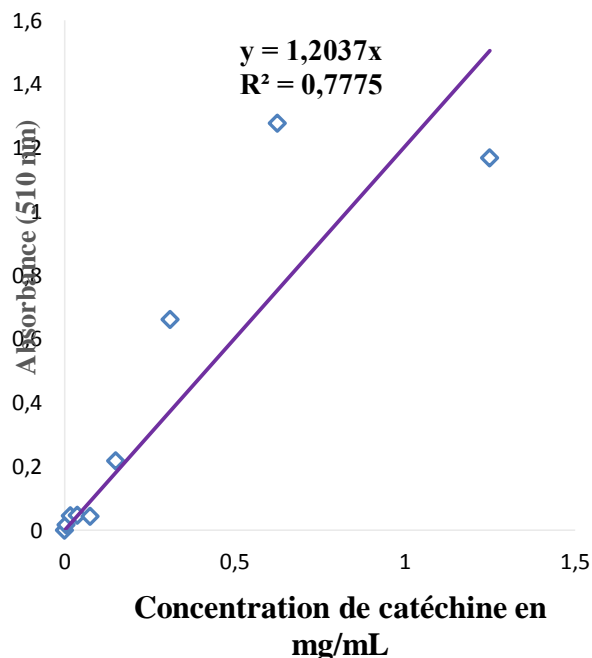


Figure N°16: La courbe d'étalonnage de la catéchine

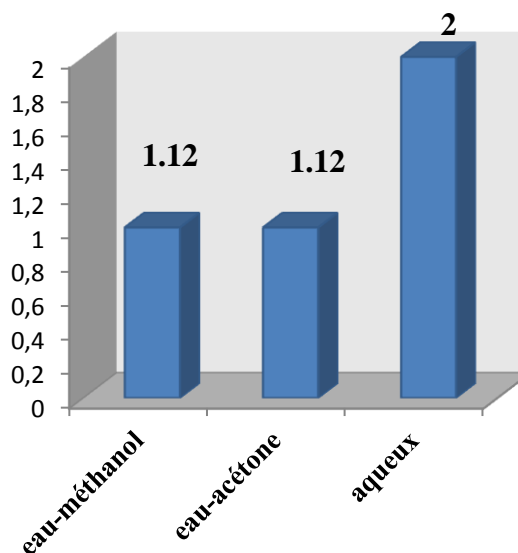


Figure N°17 : La teneur en flavonoïdes des extraits en mg EQ/g d'extrait

Les résultats représentés dans la **figure N°17** révèlent une richesse en flavonoïdes dans l'extrait aqueux par rapport à l'extrait hydro-méthanolique et hydro-acétonique. Les concentrations sont de l'ordre de 2 mg EQ/g et 1,12 mg EQ/g respectivement. D'après les analyses statistiques, il n'existe aucune différence significative entre l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait hydro-acétonique.

Les résultats de l'analyse quantitative par spectrophotomètre UV-visible montre que l'extrait brut aqueux des feuilles de *Punica granatum* étudiée, sont riches en flavonoïdes et ces résultats sont en accord avec les analyses qualitatives trouvées.

Nos résultats enregistrés ne concordent pas avec ceux obtenus par **Achouche & Azouzi (2019)**, dont le taux de flavonoïdes est plus important dans l'extrait hydro-alcoolique par rapport à l'extrait aqueux et qui sont estimés à $12,10 \pm 3,18$ mg EQ/g et $11,23 \pm 1,26$ mg EQ/g respectivement.

Cette différence de la composition en composés phénoliques entre différents cultivars peut être expliquée par l'âge du grenadier, la quantité annuelle moyenne de la précipitation et les conditions agro-climatiques. L'exposition à la lumière et au soleil des fruits sélectionnés, semble être aussi un autre facteur influençant la synthèse des polyphénols et des flavonoïdes (**Cardon, 2005 ; Koukoura, 1988 ; Dudt et Shure, 1994; Cardon, 2005 ; Borochoy-Neori et al., 2009**).

En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des composés phénoliques totaux dans tous les extraits testés, nous remarquons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques tels que les acides phénoliques et les tanins.

L'intérêt porté aux feuilles et aux écorces trouve une explication dans le fait qu'elles sont le siège par excellence de la biosynthèse et même du stockage des métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante (Bitsindou, 1997). Pour Nacoulma (1996). Ces organes constituent les lieux de stockage de métabolites secondaires ou des matériaux de base, protecteurs de l'organisme.

III.5. Evaluation de la toxicité des différents extraits des feuilles de *Punica granatum* L. vis-à-vis des globules rouges

Les résultats du test de cytotoxicité présentant l'évolution des pourcentages d'hémolyse des globules rouges, en fonction des concentrations de diclofenac et des différents extraits des feuilles de *Punica granatum*, sont illustrés dans les figures N°18 et 19 respectivement.

La figure N°19 présente les taux d'hémolyse par pourcentage (%) dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée durant 30 minutes à 37°C en présence des différentes concentrations, des trois extraits de *Punica granatum*.

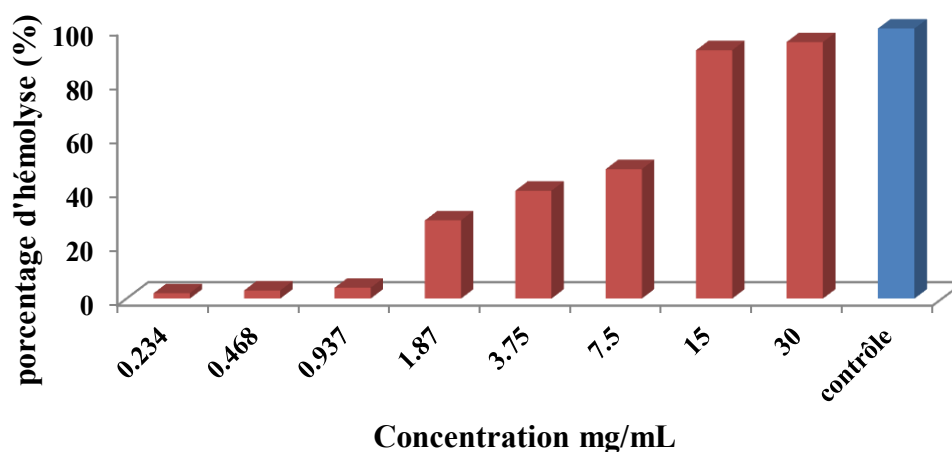


Figure N°18: Effet des différentes concentrations de diclofenac sur l'hémolyse des globules rouges comparé au contrôle positif l'eau distillée (Hémolyse 100%).

Résultats et discussion

Les résultats présentés sur **la figure N°18** révèlent que le traitement des globules rouges par le diclofenac provoque une augmentation significative du taux d'hémolyse, en fonction des concentrations testées. Cette molécule de référence présente un effet hémolytique significatif à partir de 1.87mg/mL avec un pourcentage d'hémolyse de 28,53 %. L'effet hémolytique maximum est estimé à 94.66%, qui reste inférieur comparativement à l'hémolyse totale, induite par l'eau distillée.

La figure N°19 présente les taux d'hémolyse des globules rouges par pourcentage (%) dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations en extraits aqueux, eau /méthanol et eau/acétone des feuilles de *Punicagranatum* ainsi que l'anti-inflammatoire synthétique: le diclofenac, par rapport au tube d'hémolyse total contenant la suspension érythrocytaire dans un milieu hypotonique provoqué par l'eau distillée.

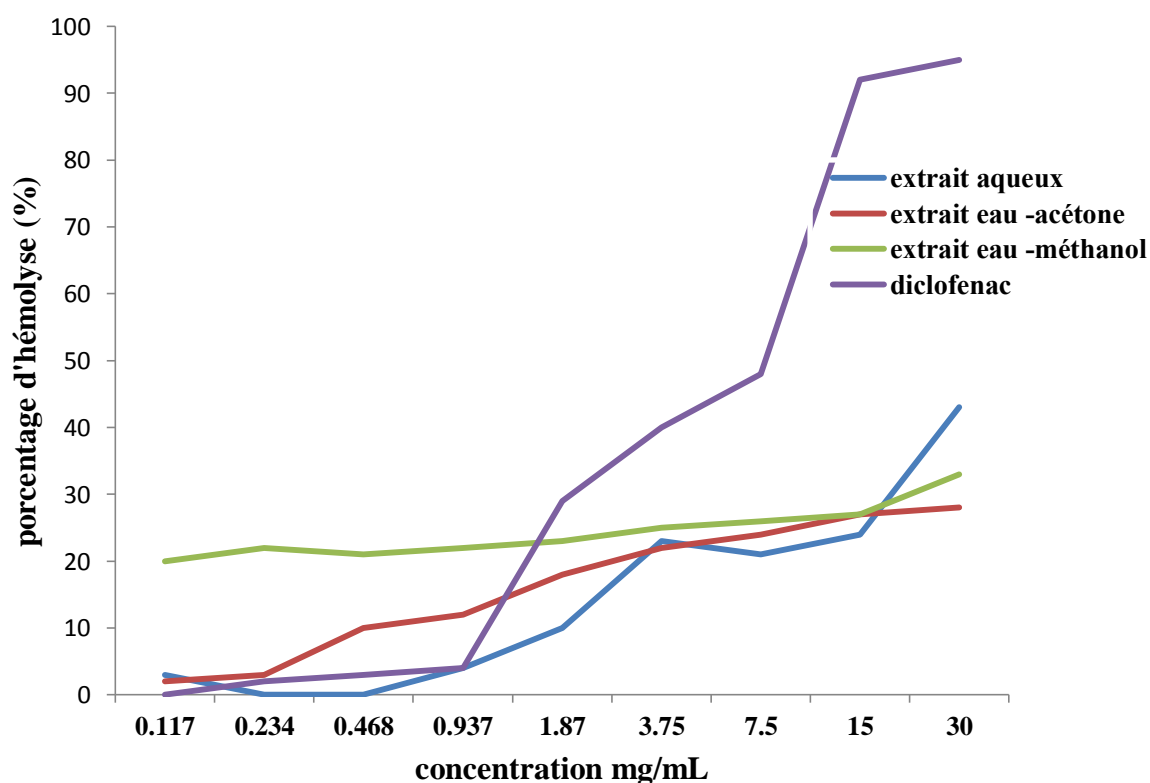


Figure N°19: Effet des différents extraits des feuilles de *Punica granatum* sur l'hémolyse des globules rouges, en fonction des concentrations comparé à celui de diclofenac.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'effet hémolytique est directement proportionnel à l'augmentation des concentrations en extraits. En effet, l'extrait brut eau-méthanol des feuilles exhibe un taux d'hémolyse considérable (22%) à partir d'une concentration égale à 0,234 mg/mL. Tandis que le pourcentage d'hémolyse de l'extrait aqueux et eau/acétone augmente significativement à partir de 3,75 mg/mL avec un taux estimé à 22,63% et 21,66% respectivement jusqu'à atteindre une hémolyse maximale égale à 42,83 et 27,93 % respectivement à une concentration de 30 mg/mL pour les deux extraits testés.

On constate clairement que l'extrait aqueux des feuilles ainsi que le diclofenac présentent des effets hémolytiques semblables aux concentrations de 0,117 mg/mL à 0,937 mg/mL. Par ailleurs, le traitement des érythrocytes par les extraits hydro-méthanolique et hydro-acétonique des feuilles présente une hémolyse nettement inférieure à celle obtenue avec le diclofenac, pour la plupart des concentrations testées.

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable des substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées (**Hirasa et Takemasa, 1998**). Les extraits bruts, naturels isolés à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle, peuvent être des ressources de nouveaux médicaments (**Karmakar et al., 2011**).

Punica granatum, comme toutes les plantes utilisées à des fins thérapeutiques, peuvent à fortes doses présenter une menace pour la santé de l'homme. L'activité cytotoxique de ces extraits pourrait être le résultat d'une action synergique de tous ou de quelques composants présents dans ces extraits. La toxicité des feuilles de *Punica granatum* observée, pourrait être expliquée par la présence de l'acide gallique, qui est l'un des constituants de cette plante, que ça soit sous sa forme libre ou liée (sous forme liée au glucose ou à l'acide quinique). En effet, des études ont indiqué que l'acide gallique est un pro-oxydatif plus fort, qui induit l'augmentation de l'intensité radicalaire et le changement du potentiel redox à un état plus oxydatif. L'acide gallique produit alors une grande quantité d'espèces réactives oxygénées (ERO), qui peuvent endommager la membrane plasmique des globules rouges et détériorer sa fonction (**Mohanty et al., 2014 ; Hsieh et al., 2015**).

III.6. Evaluation de l'effet des extraits des feuilles de *Punica granatum* sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des différents extraits bruts préparés à partir des feuilles de *Punica granatum*, un test de stabilisation membranaire des globules rouges humains a été réalisé. Ce test consiste à incuber une suspension de globules rouges humains, traitée avec une solution hypotonique associée à une température élevée, avec les extraits ou la molécule de références (le diclofenac comme anti-inflammatoire synthétique). Les concentrations en extraits testées pour cette activité présentent moins de 40% de cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes.

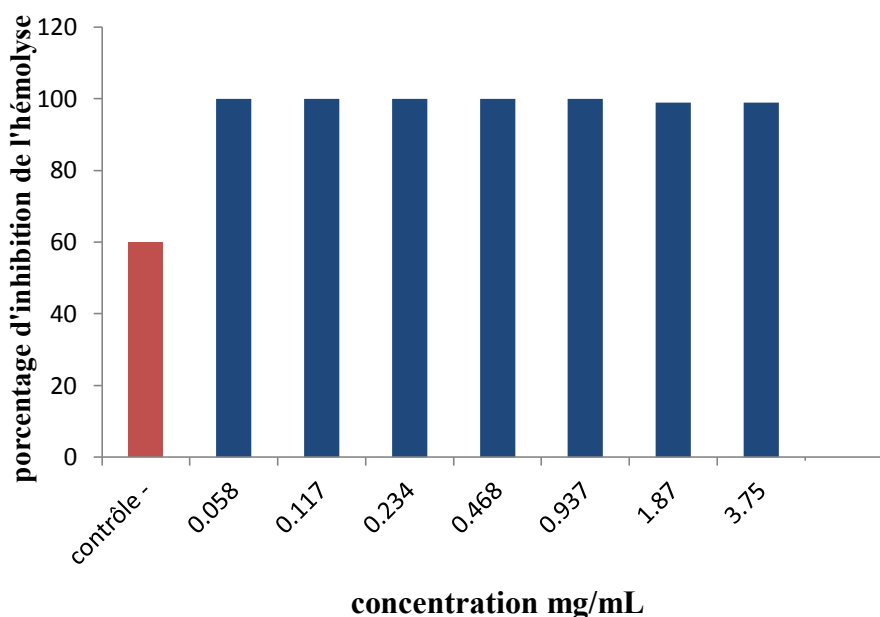


Figure N°20 : Effet des différentes concentrations de diclofenac sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur et comparé au contrôle (l'eau physiologique).

La figure N°20 représente les érythrocytes traités avec des concentrations allant de 0,058 à 3,75 mg/mL de diclofenac. Ces résultats ont montré un effet anti-hémolytique significatif compris entre 96,4% et 96,7%.

D'une autre part, une étude comparative de l'effet des extraits des feuilles de grenade et celui exhibé par la molécule de référence testée, notamment le diclofenac sont illustrés dans la figure N°21.

Par ailleurs, l'effet protecteur des différents extraits des feuilles de *Punica granatum*, contre l'hémolyse des globules rouges, provoqué par hypotonie et chaleur est significative dès la faible concentration de 0,058 mg/mL (98,2%). Au delà de cette concentration, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux commence à légèrement diminuer significativement à partir de la concentration 0,234 mg /mL. Concernant les extraits eau –méthanol et eau –acétone, ils ont atteint un pourcentage maximum d'inhibition d'hémolyse estimé à 99,98 % et qui reste stable jusqu'à la concentration de 1,87 mg/mL.

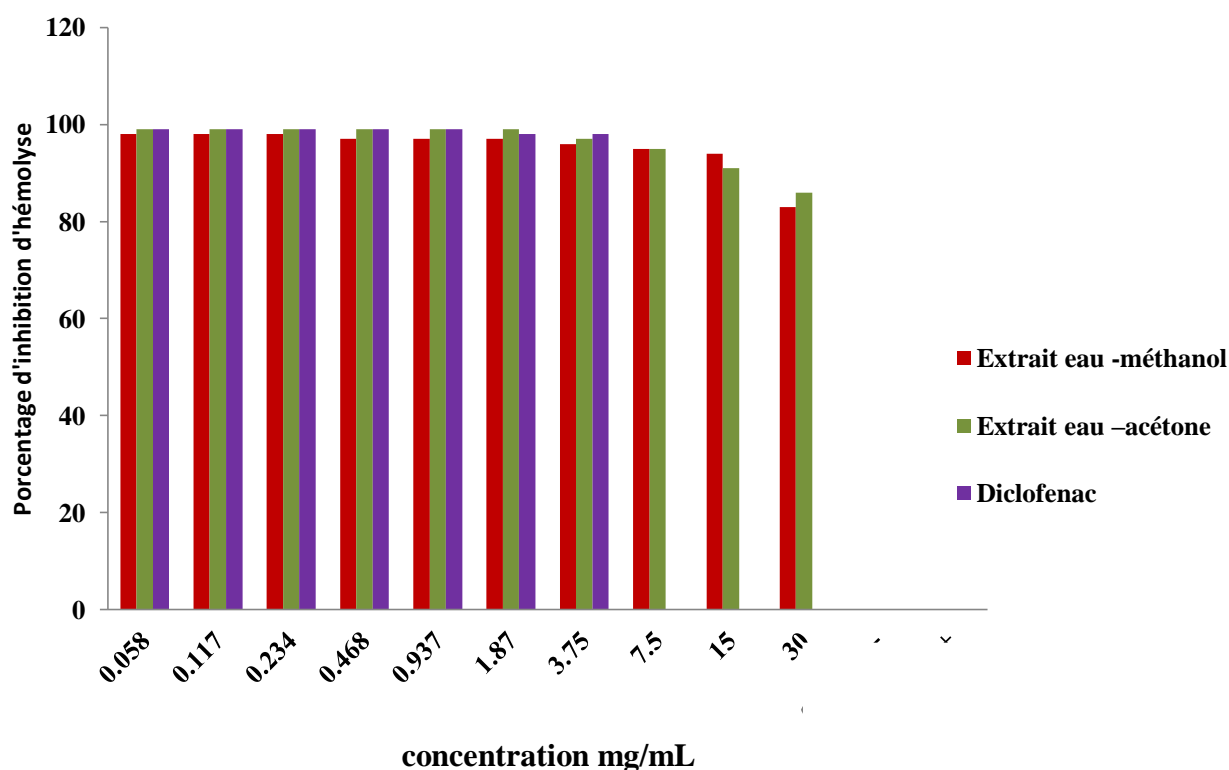


Figure N°21 : Effet du diclofenac et des extraits de feuilles de *Punica granatum* sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, à différentes concentrations.

L'évaluation du pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges montre que les trois extraits de feuilles possèdent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations.

D'après les résultats représentés dans l'histogramme de pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges (**figure N°21**), on observe que l'extrait hydro-acétonique des feuilles de grenadier présente une inhibition semblable au diclofenac.

L'hémolyse induite par le H₂O₂, espèce réactive d'oxygène qui possède une grande capacité à traverser les membranes biologiques (**Reshma et al.,2014**), résulte de la destruction de la membrane suite à la peroxydation lipidique des acides gras insaturés, tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique, présents dans ces membranes (**Sumathy et al.,2013**). Il ne donne pas une hémolyse totale d'érythrocyte par rapport à l'eau distillée.

L'étude de l'activité anti-hémolytique des extraits des feuilles de grenadier par le test d'inhibition de l'hémolyse induite par une solution hypotonique a montré que presque tous les extraits de *P.granatum* testés présentent un effet protecteur de la membrane érythrocytaire avec des taux d'inhibition élevés. L'efficacité anti-hémolytique de l'extrait hydro –acétonique de *P .granatum* est le meilleur.

L'effet anti-hémolytique peut être attribué à la capacité des métabolites présents dans ces extraits de grenadier à piéger la solution hypotonique et à protéger ainsi la membrane des globules rouges (**Neelam et Singh, 2012**).

Les membranes plasmiques demeurent des structures fluides et le maintien de la fluidité est un pré-requis, pour la fonction, la viabilité, la croissance et la reproduction des cellules. De ce fait, divers études ont évalué la stabilisation de la membrane de globule rouge, via l'exposition des érythrocytes à une solution hypotonique, ainsi qu'à une température élevée, afin de mieux établir le mécanisme d'action anti-inflammatoire des extraits de plantes, en raison de la ressemblance de la membrane de lysosome avec celle du globule rouge. La stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomaux des neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation (**Portier et al.,2007 ; Reshma et al.,2014 ; Kalavani et al.,2016**).

En effet, la stabilisation de la membrane des globules rouges, par les extraits des feuilles de *P.granatum*, pourrait être liée à leur composition chimique qui est riche en polyphénols tels que l'acide gallique et les flavonoïdes, possédant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.

Les résultats obtenus par **Ahmad et son équipe (2013)** ont montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), notamment le diclofenac, à des doses importantes, modifient la réponse inflammatoire en inhibant l'activation des neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires, bloquant ainsi la production d'enzyme telle que collagénase et élastase.

Par ailleurs, le diclofenac, étant chargé négativement et son emplacement dans la région polaire des phosphatidylcholines modifie les interactions électrostatiques entre le phosphate des lipides et le groupement amine terminal. A des concentrations élevées, le diclofenac perturbe la structure de la bicouche membranaire en déplaçant les phosphatidylcholines et les sphingomyélines vers la monocouche intérieure, tandis que les phosphatidylsérines et les phosphatidylethanolamines vers l'extérieure. Ainsi, l'interaction du diclofenac, essentiellement avec le phosphatidylcholines dans la monocouche intérieure de la membrane des globules rouges, mène au changement de leur forme biconcave, ce qui augmente leur résistance à l'entrée dans les capillaires induisant la diminution du flux sanguin, la perte d'oxygène et des dégâts tissulaires (**Suwalsky et al.,2009**).

De plus l'utilisation chronique de ces médicaments provoque des effets indésirables divers et graves. Pour cela, des agents d'origine naturelle avec très peu d'effets secondaires sont souhaitables pour remplacer les thérapies chimiques.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par **Karunakar et al., (2018)** qui ont évalué l'activité anti-inflammatoire des écorces de grenade (*in vitro*), nous remarquons que l'extrait méthanolique des feuille de *P.granatum* donne un bon effet d'inhibition d'hémolyse induit par l'hypotonie de la membrane érythrocytaire (98,6 % à concentration 2 mg/mL) par rapport à l'extrait méthanolique d'écorce (94% à concentration 2 mg/mL).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source de substances et de composés bioactifs possédant des propriétés pharmaceutiques très importantes et d'autre part au besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce avec moins d'effets secondaires. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue des capacités anti-inflammatoires. Les feuilles de *Punica granatum* possèdent un pouvoir pharmacologique, dont les indications thérapeutiques sont nombreuses et qui justifieraient leur utilisation comme plantes médicinales.

Le présent travail a pour objectif d'étudier l'activité anti-inflammatoire totale des extraits des feuilles du grenadier, ainsi que la quantification de leurs polyphénols totaux et flavonoïdes. L'extraction du matériel végétal nous a permis d'obtenir trois extraits de polarités différentes. La détermination du rendement en extraits bruts a montré que les rendements d'extraction varient considérablement entre les différents extraits. Les meilleurs résultats sont enregistrés dans l'extrait hydro-méthanolique avec un pourcentage estimé à 38.72 %.

Le criblage phytochimique des extraits de *P. granatum* a mis en évidence la présence de plusieurs composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins ainsi que les terpénoïdes et stérols, et les composés réducteurs.

Les analyses quantitatives des différents extraits affirment la richesse des feuilles de grenadier en composés phénoliques et plus particulièrement en flavonoïdes qui ont été détectés par la spectrophotométrie UV-visible.

L'analyse biologique des trois extraits préparés réalisée *in vitro* sur des érythrocytes isolés du sang humain et conservés dans un milieu hypotonique PBS (PH = 7,4) a montré un taux faible d'hémolyse, ne dépassant pas les 40% à une concentration élevée de 30mg/mL par rapport à l'hémolyse totale.

Les résultats obtenus à l'issue de l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* réalisée sur les globules rouges ont montré que l'extrait hydro-acétonique des feuilles de grenadier exerce une inhibition comparable, à celle de l'anti-inflammatoire de référence Diclofenac® et par ce fait il

Conclusion générale

peut être considéré comme un traitement alternatif particulièrement dans la prévention de l'inflammation.

A l'issue de cette étude, il ressort que l'activité anti-hémolytique révélée par les extraits pourrait avoir un effet sur la stabilité de la membrane lysosomale, qui est semblable à celle des globules rouges, et pourrait empêcher ainsi la sortie des constituants lysosomale au cours de l'inflammation.

Cependant, ce travail reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agissent ces plantes sur les érythrocytes isolés du sang humain. Les résultats obtenus dans cette étude sur les effets anti-inflammatoire des extraits de *P.granatum* sont intéressants, mais des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes moléculaires et cellulaires.

En perspective, l'étude de la relation structure-activité permettra de corréler les résultats des tests biologiques avec des structures bien précises responsables de l'activité. Cette étude est très importante si l'on veut améliorer l'effet biologique de ces composés. Ceci permettra dans le futur la synthèse de molécules potentiellement actives.

Ces études doivent être orientées vers la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires des composés actifs des extraits de grenadier et l'évaluation de leurs effets sur le processus inflammatoire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Achouche Mohammed et Azouzi Ahmed. (2019).**Evaluation in vitro du pouvoir hypoglycémiant des extraits des feuilles de *Punica granatum* L. Mémoire du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master. Université Djilali BOUNAAMA de Khemis-Miliana..
- Afaq, F., Malik, A., (2005).**Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*, 81, 38-45.
- Aganga, A.A., and Mosase, K.W. (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Ziziphismucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds, *Animal Feed Science and Technology*.91, p.107-113
- Ahmad. I., Qureshi, T. A., Sadique, U., Khans. A., Ahmed.S., Rehman, Z. U., ... & Mushtaq. M. (2013).**Hematological effects of diclofenac sodium in goat. *The J of Animal and Plant Sci*, 23, 103-107.
- Ahmed, S., Wang, N., Hafez, B., Cheruvu, V. K., et Haqqi, T. M., (2005).** *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J of Nutrition*, 135: 2096–2102
- Al-Muammar ,N.M,ET Khan.(2012).**Obesity :The Preventive Role of the Pomegranate (*Punica granatum*) .community Health Sciences, College of Applied Medical Sciences ,king Saud University ,Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia .Doi:10.1016/j.nut.2011.11.013.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonogai, Y. (2000).**High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits.*Journal of Chromatography*, 896, 87–93. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en cotutelle entre l'Université de Béni Mellal (Maroc) et l'Université d'Angers (France)..
- Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E.P., Heredia J. B. (2016).** Phenolic compounds.Natural alternative in inflammation treatment.A Review *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), p. 131-412.

- Amy, B., Doris, H., D'Souza. (2013).The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health. Evidence-Based Complementary and Alternative Médecine. (2001). Studies on the hypoglycemic activities of Punica granatum seed in streptozotocine induced diabetic rats. Phytotherapy Research, 15 (7), 9-628.
- Ashley.NT., Weil ZM, ET NelsonRJ. (2012).Inflammation: mechanisms; costs and natural .variation Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic, 43,385-406.
- Ashton, R. (2006).The Incredible Pomegranate: Plant and Fruit. ThirdMillennium Publishing, p1-118.
- Aymeric, JL., Lefranc G. (2009).Immunologie humaine.Bruxelles: De Boeck. P: 59-65.
- Ayroldi E., Cannarile L., Migliorati G., Nocentini G., Delfino D.V., Riccardi C. (2012).Mechanism of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: génomic and non génomic interférence with MAPK signaling pathways. The FASEB Journal, vol 26, no 12, p. 4805-4820.

B

- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanism. Clinical science, 94(6), 557-572.
- Basu.A, ET K. Penugonda. (2009).Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice.Nutr Rev, 67(1), 49-56.
- Beaumont F., Hergaux C. (2005) .Erythrophagocytose et recyclage du fer himnique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hepcidine C. Transfusion Clinique et Biologique, p, 123–130.
- Ben Abbes., F. (2011). Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenixdactylifera L. Thèse de magister Université Ferhat Abbas- Setif, p : 22 – 26.
- Ben Abdennebi, A.M. (2012). Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Diplôme – Maitrise en Pharmacologie, Université de Montréal-Benslama.

- Bendiabdellah A.(2014).** Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus* (*D.crinitus*, *D. muricatus* et *D. carotassphispanicus*) de la région de Tlemcen. Thèse de Doctorat Universités Abu-Bakr Belkaïd-Tlemcen.p,07.
- Bitsindou M. (1997).** Enquêtes sur la Phytotherapy traditional à Kindamba ET Odzala (Congo) ET analyses des convergences d'usage des plants medicinal en Afrique Central. *Journal of Applied Biosciences*, 88:8194– 8210.
- Bruneton ,J.(2009).**Pharmacognosie-Phytochimie ,plants médicinales,4^e éd .,revue et augmenter ,Paris editions medicinal internationals,1288p.(ISBN 978-2-7430-1188-8).
- Borochoy-Neori, H. Judeinstein, S.Tripler, E. Harari, M. Greenberg, A. Shomer, I. and Holland, D. (2009).** Seasonal and cultivar variations in antioxydant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit.*J. Food Compos. Anal*, 22, 189–195.



- Cauchard Pierre. (2013).** La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques
- Câlin Sanchez Angel , Carbonali Banaching A.A.(2005).**La grenade cultivées en Espagne Punicalagin anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit . Livre. Natural antioxydant granatum et université Miguel Hernandez (EDS).Murcia Espagne .p 77.
- Çam. M., and Hışıl .Y. (2010).** Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chem*, 1(23),878–885.
- Carbone C., Musumeci T., Pignatello R. (2013).**Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Drug–Biomembrane Interaction Studies*. 281-303. Doi: <https://doi.org/10.1533/9781908818348.281>.
- Cardon .D. (2005).** Colorants et tannins (Pays Bas: PROTA).
- .-Channing J .Paller, Allan Pantuck, Michael A.Carducci. (2017),** Areview of pomegranate in prostate cancer (PMC free article) Prépublication .Repéré dans Pubmed: <https://www.ncbi.gov/pubmed/27748144>.

- Clos J (2012). Immunité chez les animaux et les végétaux. Paris : Lavoisier. p:283-292.
- Coutinho A.E., Chapman K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. Molecular and cellular endocrinology, 335(1), 2-13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005> 95

D

- Daas Amiour S. (2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire Présenté Pour l'obtention de diplôme de Magister en Biologie Option Biochimie appliquée. Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Alger.
- DeFranco AL., Robertson M., Locksley RM. (2009). Immunité: la réponse immunitaire Dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Bruxelles: De Boeck. P: 40-85.
- Djahra A.B. (2015). Cours Phytochimie II 2ème Année Master II, Université Echahid Hamma Lakhdar, El Oued, Alger.
- D.S.A. (2018). Directions des services agricoles.
- Dongdong Wang., Cigdem Özen. Ibrahim, M., Abu-Reidah., Sridevi Chigurupati., Jayanta Kumar Patraet Atanas, G., Atanasov. (2018). Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Frontiers in Pharmacology*. 9, Article 544.
- Douaouri Nor El Houda. (2018). Contribution à une étude phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydant du grenadier (*Punica granatum* L.) – Etude in vivo. Thèse doctorat. Université Abdelhamid ibn Badis de Mostaganem.
- Dudt, J.F., and Shure, D.J. (1994). The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology* 75, 86–98.

E

- Edeas, M. (2010). "Polyphenols et jus de grenade." *Phytotherapy* 8: 16-20.
- Eddebbagh Malak., Mouhcine Messaoudi., Abdelmjid Abourriche., Mohamed Berrada., Mohamed Attaleb., Laila Benbacer et Ahmed Bennamara. (2016). Corrélation of the Cytotoxic and Antioxydant Activities of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum*)

with Phenolic and Flavonoid Contents, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4 (2016), 511-519. Doi: 10.17265/2328-2150/2016.09.006.

-Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., et Ferchichi. A. (2012).Total phenolic contents and antioxidant Activities of pomegranate Peel, seed, leaf and flower.*J. Med. Plants Res.* 6, 4724–4730.

-Elodie Wald. (2009).Legrenadier (*punica granatum*):Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. *Sciences pharmaceutiques.* , Hal-01734473.

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

F

-Fatope, M.O., Al Burtomani, S.K., Takeda, Y. (2002).Monoacylglycerol from *Punicagranatum* seed oil. *J. Agric. Food Chem*, 50, 357–360.

-Faure S. (2009). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*, 48(489), p. 53-58. Doi : [https://doi.org/10.1016/S0515-3700\(09\)70493-8](https://doi.org/10.1016/S0515-3700(09)70493-8)

-Fürst R., Zündorf I. (2014). Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. *Mediators of Inflammation*, pp. 9. Doi:10.1155/2014/146832.

G

-Gee ET Johnson. (2001).Polyphenoles Compounds: Interactions with the Gut and Implication for Human Health .Article. *Literature Review in current Medicinal chemistry*, 8(11), 1245 - 55.

-Ghadirian, P., Ekoe, J.M., Thouez, J.P.(1992). Food habitsand esophageal cancer: an overview. *Cancer Detect. Prev*, 16, 163–168.

-Guedj, N ; Beaufrère, A., Maggiori, L., Patroni, A., Bedossa, P., &Panis, Y. (2018).Reply to Wang and Kan. *Colorectal Disease*, 20(4), 341–342. doi:10.1111/codi.14023.



- Haddioui A. in Melgarejo P. (Ed.), Valero D. (Ed.). (2012a).** La culture du grenadier (*Punica granatum L.*) Au Maroc. Repéré à : <http://om.cih.eam.org/article.php?IDPDF=6910>.
- Haddioui A. in Melgarejo P. (Ed.), Valero D. (Ed.). (2012b).** production du grenadier dans le monde (La culture du grenadier (*Punica granatum L.*) Au Maroc. Repéré à : <http://om.cih.eam.org/article.php?IDPDF=6910>).
- Haidari, M., Ali M., Casscells SW., Madjid M. (2009).** Pomegranate (*Punicagranatum*) purified polyphenols extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomed*, 16, 36-1127.
- Hayouni, E. A., K. Miled, et al. (2011).** "Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punicagranatum L.* peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds." *Phytomedicine*, 18(11), 976-984.
- Henzen, C. (2003).** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum* (Vol. 19, pp. 442-6).
- Heshmati, J., Namazi, N. (2015).** Effects of black seed on metabolic parameters in diabetes mellitus: a systematic review, 23:275. (CrossRef). (Google Scholar).
- Hegde, V.L., Mahesh, P.A., Venkatesh, Y.P., (2002).** Anaphylaxis caused by mannitol in pomegranate (*Punica granatum*). *Allergy Clin.Immunol.* 14, 37–39.
- Hirasa. K., Takemasa. M. (1998).** Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- Hsieh, C. L., Lin, C. H., Chen, K. C., Peng, C. C., & Peng, R. Y. (2015).** The teratogenicity and the action mechanism of gallic acid relating with brain and cervical muscles. *PloS one*, 10(6). e0119516.
- Hmid I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum L.*): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Doctoral dissertation, Universités d'Angers, France.
- Hoffman R. M., (2008).** Imaging In Mice with Fluorescent Proteins: From Macro To Subcellular; *Sensors*, 8,1157-1173.Repéré dans [:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927509/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927509/)

-Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Horticultural Reviews, 35, p.127- 191.

-Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B., Rahu N.(2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us Oxidative Medicine and Cellular Longevity, pp. 9. Doi:10.1155/2016/7432797.



-INRAA. (2006). Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.

-Irit, B.Y., Li, T., Rachel, A., Holland, D. (2019a, 2019b, 2019c). Primary metabolites, anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. Review Article. Doi: [10.1021/jf904337t](https://doi.org/10.1021/jf904337t).

-Isabelle C. (2018). Grenadier ; Gerbeaud, conseil de jardinage et jardin facile [.https://www.gerbeaud.com](https://www.gerbeaud.com).



-Jacson, A.C. (2016). La culture de la grenade en plein boum grâce à ses vertus pour la santé. Repéré dans : <http://wikiagri.fr/articles/la-culture-de-la-grenade-en-pleine-boum-grace-a-ses-vertus-pour-la-sante/8237>

-Jafri MA., Aslam M., Javed K., Singh S. (2000). Effect of Punicagranatum Linn.(Flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats' Ethnopharmacol.70(3), 309-14.

-Jianjun Xu., Yongxin Zhao., ET Haji Akber Aisa.(2017). Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. PHARMACEUTICAL BIOLOGY, 55(1), 2095–2101. 51.

-Jick, H. (1994). Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. The Lancet, 343(8900), 769 -772.

- John R .V.,Jack H.B., Regina MB .(2012)** .improved non_steroid anti –inflammatory drugs: COX2 enzyme inhibitors. Springer science and business media.
- Jones, W. P., Kinghorn. D. (2006)**.Extraction of Plant Secondary Métabolites. In: Natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 334-335.
- Juha-Pekka Salminen ET Maarit Karonen. (2011)**. Functional Ecology, 25, 325–338. Doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x).

K

- Kaci-M .Z. , Boutekrabt .L. , Laidoudi .D. , Moussaoui .T ., Melahi .N, Ait Ouarab .D, Meguetaoui.A . (2017)**. Évaluation Phytochimique, ET potentiel-Antioxydant, Antibactériende trois cultivars de fruit de grenadier "*Punica granatum L*" DU NORD EST D'ALGÉRIE, Revue Agrobiologia, 7(2): 589-602.
- Kalavani, R. , Banu, R. S., Jeyanthi, K. A., Sankari, T. U., & Kanna A. V. (2016)**.Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobium dulce* (Benth) extract.Biotechnological Research, 2(4). 148-154.
- Karim, T. (2010)**. Jardins méditerranéens: Le grenadier d'ornement. Repéré dans <http://www.nouara-algerie.com/article-jardins-mediterraneens-le-grenadier-d-ornement-46669496.html> .
- Karmakari, I., Dolai N., Saha. P., Sarkar .N., Bala. A, Kanti.P. (2011)**.Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species.Orient Pharmacology Expérimental médecine, 11.221-228.
- Karthikeyan, G., Vidya, A. K., (2019)**. Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activity of pomegranate peel. Life Science Informatics Publications, 5:218- 231.
- Kartik, J., Salwe.Devender, O., Sachdev.YogeshBahurupi., ManimekalaiKumarappan., (2015)**. Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punicagranatum L*. in male (Wistar albino) rats.Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 6, 56-64.
- Koukoura, Z. (1988)**. Composition of kermes oak browse as affected by shade and stage of maturity. Anim. Feed Sci. Technol. 21, 1–9.

-Kumar T, Jain V (2014a).Antinociceptive and anti-Inflammatory activities of Brideliaretusamethanolic fruit extract in experimental animals. Sci World J. Article ID 890151, 12 p.

-Kumar T., Jain V. (2014b).diapédèse leucocytaire (Antinociceptive and anti-Inflammatory activities of Brideliaretusamethanolic fruit extract in experimental animals. Sci World J. Article ID 890151, 12 p.

-Kylli. P. (2010). Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties.

-K .S. Lakshmi., R .Vadivu. (2008).In vitro and in vivo anti –Inflammatory activity of leaves of sumplocoscochinchinensis (Lour).Bangladesh journal Of Pharmacology .Doi :<https://doi.org/10.3329/bjp.v3i2.956>.



-Lakhani S., Dilly S. A., Finlayson C.A. (2009). Basic pathology: an introduction to the mechanisms of disease. London: Hodder. p:25-40.

-Liming Z. (10 décembre 2015). Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX Français.)<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01443274>.



- Macheix. J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand. C. (2005).Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universités romandes, pp 121216.

-Mahmoudi Souhila, KHALI Mustapha et Mahmoudi Nacéra. (04 Février 2013).Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.).Université Saâd DAHLAB, Faculté des sciences Agro- vétérinaires, Département des sciences agronomiques, route de Soumaâ, BP 270 – 9000, Blida, Algérie. Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09. Pages 35 à 40

- Mallem Y., Gogny M. (2014).** Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. EMC-Vétérinaire.
- Malviya, S., Jha, A., and Hettiarachchy, N. (2014).**Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate Peel extracts. J. Food Sci. Technol. 51, 4132–4137.
- Mannargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., PognasJ.L. , ET Perrin, C., (2016).**Hemolysis by surfactants .Areview .Advanced in colloïde and interface science, 228.p1-16.
- Manoharan S. (2009).** Effects of Punicagranatum Flowers on Carbohydrate Metabolizing Enzymes, Lipid Peroxidation and Antioxidants Status in Streptozotocin Induced Diabetic Rats the Open Nutraceuticals Journal, 2,113-7.
- Medzhitov.Cell.(2010)** .inflammation .department of immunology and Howard Hughes medical Institute .140(6), 6-771.Doi:10.1016/j.cell.2010.03.006.
- Melgarejo, P. (1993).** Seleccion y tipificacion varietal de granado (*Punicagranatum*L.) [Ph.D. thesis]. Valencia. Spain: Univ. Politecnica de Valencia (UPV).
- Melgarejo, P., Valero, D. (2012).** International Symposium on the Pomegranate. Spain: Edition Zaragoza. Ciheam.
- Mélanie Spilmont, et al. (2013).** Pomegranate peel extract improves bone metabolism in a preclinical mice model of postmenopausal osteoporosis and stimulates osteoblastic differentiation in vitro.
- **Mintzer D.M., Billet S. N., Chmielewski L., (2009).**Drug-induced hematologic syndromes. Advances in hematology.P, 495 -863.
- Mirdehghan. S.H., et Rahemi. M. (2007).** Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Sci. Hort. 111 .120–127.
- Mohamed Amine Ben Abdennebi. (2012)** .Le grenadier tunisien (*Punica granatum*)
Stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l’Akt et la voie insulino-indépendante de l’AMPK .Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales.
- Mohanty, J., Nagababu, E., & Rifkind. J. M. (2014).** Red Blood cell oxydative stress impairs oxygen delivery and induces red Blood cell aging. Frontiers in physiology, 5. 84.
- Montassar, Bouaine. (2018)** .La culture de grenadier dans les oasis du sud est : le tresor de gabès. Manuscrit soumis pour publication .Récupéré à <https://proalimentarius.com/article/la-culture-de-grenadier-dans-les-oasis-du-sud-est-le-tresor-de-gabes>.
- Moringuschi, T; kita, M; Hasegawa, S and Omoru, M. (2003).** Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis .Food, Agriculture and Environment, 1, 22-25

-Moualkia Halima, Gourmati meryem. (24/06/2015), Détermination de substances naturelles a potentialités antioxydant et anti- inflammatoire de plantes Punica granatum L et Lawsonia inermes .Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master .Université des frères Mentouri Constantine. Faculté Des Sciences de La Nature et de la Vie.

N

-Nacoulma-Ouédraogo O. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du Plateau central, Journal of Applied Biosciences ,88:8194– 8210 .

-Naik, S.R., UK, Sheth. (1976).Inflammatory process and screening méthode for anti-inflammatoiry agents .journal of postgraduate Médecine ,22(1) ,5.

-Neelam Arun, et. D, P. Singh. (19 April, 2012) .PUNICA GRANATUM.A REVIEW ON PHARMACOLOGICAL AND THERAPEUTIC PROPERTIES.Article in Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3(5).1240-1245.

-NKHILI, E. (2009).Polyphenols de l'alimentation: extraction, interaction avec les ions de ferET du cuivre, oxydationETpouvoirantioxydant. Thèsedoctorat universités CADI AYYAD Semlalia-Marrakech.

O

-Oukablie, A. (2004). Le grenadier. Des variétés performantes pour la culture. Dans Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en Agriculture. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, N° 123.

P

-PadmajaKalshetti., Ramesh Alluri. , Prasad Thakurdesai. (2015) .A review on photochemistry and pharmacological profile of punicagranatum. Journal of Current Pharma Research 5 (4), 1607-1614.

-**Parmar HS., Kar A. (2007).**Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *BioFactors*, 31(1):17-24. *Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage*.

-**Prasan R Bhandari. (2012)** .Pomegranate (*punicagranatum* L). Ancient seeds for modern cure; review of potential therapeutic applications; doi: 10.4103/2231-0738.99469. : 171-184.

-**Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J., & Lekeux, P. (2007).** Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire*, 151(2). 101-106.

Q

-**Quy Diem Do., Y. H, Ju. (2014).**Effects of extraction solvent on total phénolcontent, totalflavonoïde content and antioxidant activity of *Limnophila aromatica* .*Journal of Food and Drug analysis* ,22(3),296-302 .Repéré dans ,[http //doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001](http://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001).

R

-**Reddy, CS.SS.,MVVSubramanian.,R,Vani.,S,Asha Devi.(2007).**In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes :effect of antioxidant supplements .*Toxicology in vitro* , 21(8), 211355-1364.

-**Reguieg, Y.A., Hammadi K. (2017).**Enhancement of the Bark of *Punica granatum* Fruit through the Phytochemical and Antimicrobial Activity Studies. *Med Aromat Plants (Los Angel)* 6: 282. Doi: 10.4172/2167-0412.1000282.

-**Reshma .A., Run .K.P. et Brindsh. P. (2014).** In vitro anti-inflammatoiry, antioxydant and nephroprotective studieson leaves of *Aegle marmelos* and *Ocimum sanctum*. *Assian J Pharm Clin Res*, 7 (4): 121-129.

-**Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009).** NSAID prescribing précautions.*American family physicien*, 80(12), 1371-8.

-**Ruis A. R. (2015).** Pomegranate and the Mediation of Balance in Early Medicine.*Gastronomica: The Journal of Critical Food Studies*, 15(1), p. 22-33. Doi: 10.1525/gfc.2015.15.1.22.

S

- Saad. H., Charrier-El Bouhtoury.,F, Pizzi., A., Rode ,K., Charrier. B., and Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Ind. Crops Prod* ,40 .239–246.
- Sassi, M. (2008). Les plantes médicinales. *Dar el fikr*. Tunis, 78: 34.
- Seidel. V. (2005).Initial and Bulk Extraction. In: *Natural products isolation*. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (2010).*Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press.p:1-4.
- Sobiecki, J.F. (2014). The intersection of culture and science in South African traditional Medicine. *Indo-Pacific Journal of Phenomenology*, 14(1), 1-10.
- Société française des antioxydants. (2018).les polyphénols de grenadier <http://www.sfa-site.com/?q=node/235>.
- Soehnlein O, Lindbom L, (2010).Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 10(6):427-439.
- Sofowora A. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique*. Eds, Karthala, p: 22.
- Sreedevi. K, Vijayalakshmi., R, Venkateswari. (2017). Phytochemical evaluation of *Punica granatum* l. leaf extract, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, ISSN- 0975-7066 , 9(4). Original Article.
- Sumethy. R., Sankaranarayanan, S. Bama, P. Ranachandran, J. Vijayalakshmi. M, et Deecaraman. M. (2013).Antioxydant and anti hémolytique activity of flavonoïde extract from fruit Peel of *Punica granatum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2): 211-214.
- Suwalsky. M, Manrique. M, Villena. F, & Sotomayor .C. P. (2009).Structural effects in vitro of the anti-inflammatory Drug diclofenac on human érythrocytes and molecular models of cell membranes.*Biophysical chemistry*, 141(1).34-40.
- Stover, E., Mercure, E.W. (2007). The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *Hortscience*, 42(5), p.1088-1092.

T

- Thomas L. (2013)**. Hemolysis as influence and interference factor. *EJIFCC* , 13(4).
- Türk, G., Sönmez, M., Aydın, M., Yüce, A., Gür, S.....Aksoy, H., (2008)**. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clinical Nutrition*, 27, 289-296.

V

- VahidDastjerdiElahé., Zahra Abdolazimi., MarziehGhazanfarian., ParisaAmdjadi., Mohammad Kamalinejad., ArashMahboubi., (2014)**.Effect of *Punicagranatum* l. Flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iranian J Publ Health*, 43(12), 1688-1694.
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Vuorela, P.M. (2003)**.Studies on the toxicity of *Punicagranatum* L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *J. Ethnopharm.* 89, 295–300.
- Von Deutschland et Schweiz. (1885)**.Fleurs et Fruit de grenadier (Grenadier commun) .Repéré dans [.http//fr.wikipedia.org/wiki/ Punica granatum](http://fr.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum).

W

- Wajahat, Z.Megal. (2018)**. Les inflammasomes, clé de l'inflammation, Pour la science, 2019, Repéré dans <https://www.pourlascience.fr/sd/medecine/les-inflammasomes-cle-delinflammation-cellulaire-13430.php>.
- Wald E. (2009)**.Le grenadier (*Punicagranatum*L.): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Doctorat de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy, 1.
- Wang Z., Pan Z., Ma H., Atungulu .G.G. (2011)**. Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal*, 5. 17-25. Doi :<http://dx.doi.org/10.2174/1874256401105010017>.

-Winyard, P.G., Blake, D.R., Evans, C.H. (2013).Free Radicals and Inflammation. Berlin: Springer Basel. P: 3-10.

x

-Xavier Gruffat. (2019).10 Aliments riches en flavonoïdes.