

---

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<sup>elle</sup> YOUNES Ikhlas

M<sup>me</sup> MEFTAHI Choukria

---

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

---

**Encadrant** : M<sup>me</sup> BENTABET N

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

Soutenu le 28 juin 2020

**Devant le jury composé de :**

---

Présidente : M<sup>me</sup> BRIXI GORMAT. N      «MCB» C.U.B.B.A.T

Examineur : M<sup>e</sup> BENNABI. F      «MCB» C.U.B.B.A.T

Encadrant : M<sup>me</sup> BENTABET N      «MCB» C.U.B.B.A.T

---

**Année universitaire : 2019-2020**

## *Remerciement :*

*« Un mot de remerciement peut souvent accomplir ce qui autrement était impossible ».*

*B.C. Forbes*

Nous rendons grâce à notre bon dieu le tout puissant quand remercie chaque matin de nous avoir donné un jour de plus dans notre vie et que nous tenons à remercier pour nous avoir accordé la force, la patience, le courage et la volenté nous permettant de réaliser à bout notre travail.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux :

Tous d'abord à **Mme Bentabet-Lasgaa Nesrine**, maitre de conférence classe B, au centre universitaire d'Ain Témouchent, non seulement pour nous avoir encadrer et prodiguer le long de cette période de réalisation du travail mais aussi pour sa générosité , sa gentillesse , sa confiance, sa patience et sa compréhension lors de nos erreurs ainsi que son écoute et sa présence. Nos profonds remerciements madame.

A notre présidente de jury **Mme Brixi Gormat N**, maitre de conférence classe B, au centre universitaire Belhadj Bouchaib, d'avoir accepté de lire et de juger notre modeste travail , ainsi que pour le chaleureux aide qu'elle nous a accordé .

A **Mr BennabiF**, maitre de conférence classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib, d'avoir accepté d'examiner précieusement et de discuter notre travail ainsi que pour son précieux aide qu'il nous a apporté au niveau du laboratoire.

Aux personnels du laboratoire de biochimie du Centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent, en particulier **Mr RahmaniKhaled**, **Mr Mhamedi Walid** et **Mr Nouredinne** pour leur aide, leurs conseils et pour leur temps précieux dont ils ont accepté de nous contribué durant notre pratique.

Nous tenons aussi à remercier avec gratitude tous nos enseignants, que nous avons eu la chance d'avoir pendant ces 5 ans et qui ont contribué à notre formation, pour chaque mots appris, pour chaque conseil apporté, pour leur patiente et immense soutien.

A tous nos familles, ami(e)s et proches, en particulier à une très chère amie Soussi Chahinez pour son précieux aide.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Enfin à vous, oui vous chers lecteur, nous vous remercions d'avoir contribué de votre temps précieux à la lecture de notre modeste travail.

*Cordialement*

## Dédicace

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. » Marcel Proust

*J'aimerais dédier ce travail aux charmants jardiniers de mon âme, aux personnes qui créent mon bonheur que je nomme:*

*En tout premier à mes chers parents dont je vis en espérant rendre fiers, Je vous remercie de votre amour, tendresse, présence, votre confiance, bienveillance ..... J'aimerais vous offrir tous les mots de remerciement du monde, mais je sais qu'ils ne sauraient rendre justice à votre juste valeur. Mon bien-aimé je vous souhaite une longue vie saine à vos côtés.*

*A mes deux frères **Abdelbari et Ilies** d'avoir toujours été présent à mes côtés, pour votre soutien votre motivation et d'avoir cru en moi et d'être des personnes formidables. Je vous remercie et que Dieu vous garde pour moi.*

*A toute ma famille : mes **grands-parents**, mes **oncles** en particulier mon oncle **Abdellah et tantes, cousins et cousines** pour leur soutien et leur amour. Que Dieu vous garde tous. A ma tendre **grand-mère** que je dédie une pensée particulière (que ton âme repose en paix).*

*A mes enseignants que j'ai eu la chance d'avoir en primaire, moyen, lycée et à l'université qui m'ont tant appris, motivé et soutenu. Je vous remercie d'avoir cru en mes compétences plus que je ne pourrais en croire. Je vous remercie et j'espère que j'ai pu vous rendre fiers.*

*A mon cher **binôme Choukria**, je te remercie toi et ta famille.*

*A mes amis pour leur présence et mots de motivation : **Younes hibaa ,Gourari ihcene , benkaddour sarra , amamra nesrine , talbi safaa, rouba achouak ,boudour nouara, merzoug asmaa,zeddou souhila, zerouali chaima, zahri sarra,** et à toute personne avoir rendu la réalisation de ce travail possible : **Mme bentabet , mlle Attou , Mlle zeriouh, mes amis avec qui j'ai travaillé en laboratoire (hasni imane, fentous sarra,asli nour el houada, amar benabdellah asmaa, zemmour nour el islam, sayah abdelkader et dehib oussama .***

*A tous les étudiants de Master Biochimie de la promotion 2019/2020. Que malgré nos différences nous avons su survivre ensemble et nous espérons qu'en fin de cette année lors de la remise de nos diplômes nous garderons de beaux souvenirs.*

**Ikhlas**

## Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents, qui nous ont quitté, qu'ils reposent en paix au paradis (je vous aime Mes parent) ;*

*Je dédie aussi ce travail à mon mari. Je le remercie pour son aide précieuse, son soutien et son amour.*

*A mon fils unique Toufik, Que Dieu vous garde et vous montre le bon chemin ;*

*Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à mes sœurs et frères.*

*A mon binôme Ikhlas, à tous ceux qui me sont chères à tous ceux qui m'aiment, à tous ceux que j'aime. Je dédie ce travail*

*Choukria*

## Résumé

Le grenadier (*Punica granatum*) est un arbuste dont la hauteur varie de 2 à 5 mètres, très rameux et légèrement épineux, appartenant à la famille des Lythracées. Il est appelé localement Roman. Depuis l'Antiquité, le grenadier y compris ses différentes parties sont utilisés en médecine traditionnelle pour traitement des troubles digestifs et intestinaux sévères ainsi que les affections parasitaires.

Notre présente étude c'est intéressé à l'évaluation du pouvoir anti-inflammatoire des différents extraits bruts (aqueux, hydro-méthanolique, hydro-acétonique) obtenus après une macération des poudres d'écorces de fruits de *Punica granatum*. Dans ce but bien précis une analyse phytochimique qualitative et quantitative ainsi qu'une étude de cytotoxicité se sont révélées nécessaire.

Les résultats obtenus ont montré un rendement d'extraction important estimé à 40% pour l'extrait eau /acétone. Une teneur considérable des trois extraits en métabolites secondaires est révélée et à permis de mettre en évidence une quantité abondante en tanins, quinones libres, flavonoïdes et composés réducteurs. Le dosage des polyphenols et des flavonoïdes totaux, a révélé des valeurs de l'ordre de 29,91 mg EAG /g et 1,515 mg EC /g respectivement dans l'extrait eau/ méthanol et dans la teneur est supérieure aux autres extraits testés.

L'analyse de la toxicité effectuée selon la méthode spectrophotométrique *in vitro*, a permis de s'assurer que nos trois extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum L* possèdent un très faible taux de toxicité qui est considéré comme inoffensif comparé au Diclofenac. Ces résultats ont permis d'entamer en toute sécurité l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de nos trois extraits préparés. Les résultats obtenus montrent que nos trois extraits possèdent des capacités anti-inflammatoires importantes allant de 90 à 100 % et comparables à l'effet protecteur de la molécule de référence à savoir le diclofenac.

Cette investigation a permis de conclure que nos différents extraits d'écorces de fruits de *Punica granatum* ont une importante capacité de lutte contre l'inflammation en empêchant la lyse de la membrane lysosomiale. Cette capacité varie en fonction du solvant d'extraction et de la concentration d'extrait utilisé.

**Mots clés :** *Punica granatum*, Métabolites secondaires, Effet hémolytique, Activité anti-inflammatoire

## Abstract

The pomegranate tree (*Punica granatum*) is a shrub whose height varies from 2 to 5 meters, very branching and slightly thorny, belonging to the Lythraceae family. It is locally called Roman. Since ancient times, the pomegranate tree, including its various parts, has been used in traditional medicine for the treatment of severe digestive and intestinal disorders as well as parasitic diseases.

Our present study is interested in the evaluation of the anti-inflammatory power of the different crude extracts (aqueous, hydro-methanolic, hydro-acetonic) obtained after a maceration of the powders of fruit peels of *Punica granatum*. For this very specific purpose, a qualitative and quantitative phytochemical analysis as well as a cytotoxicity study have proved necessary.

The results obtained showed a significant extraction yield estimated at 40% for the water / acetone extract. A considerable content of the three extracts in secondary metabolites is revealed and has made it possible to demonstrate an abundant amount of tannins, free quinones, flavonoids and reducing compounds. The dosage of polyphenols and total flavonoids revealed values of the order of 29.91 mg EAG / g and 1.515 mg EC / g respectively in the water / methanol extract and in the content is higher than the other extracts tested.

The toxicity analysis carried out using the in vitro spectrophotometric method made it possible to ensure that our three bark extracts of *Punica granatum* have a very low toxicity level which is considered harmless compared to Diclofenac. These results made it possible to safely begin the evaluation of the anti-inflammatory activity of our three prepared extracts. The results obtained show that our three extracts have significant anti-inflammatory capacities ranging from 90 to 100% and comparable to the protective effect of the reference molecule, namely diclofenac.

This investigation made it possible to conclude that our different extracts of *Punica granatum* fruit peel have an important capacity to fight against inflammation by preventing lysis of the lysosomal membrane. This capacity varies depending on the extraction solvent and the concentration of extract used.

**Keywords:** *Punica granatum*, Secondary metabolites, Hemolytic effect, Anti-inflammatory activity

## المخلص

الرمان (*Punica granatum*) هو شجيرة يتراوح ارتفاعها من 2 إلى 5 أمتار ، متفرعة جدًا وشائكة قليلاً ، تنتمي إلى عائلة Lythraceae. يسمى محليا بالرومانية. منذ العصور القديمة . تم استخدام شجرة الرمان ، بما في ذلك أجزائها المختلفة ، في الطب التقليدي لعلاج اضطرابات الجهاز الهضمي المعوي الحادة وكذلك الأمراض الطفيلية.

تهتم دراستنا الحالية بتقييم الطاقة المضادة للالتهابات من المستخلصات الخام المختلفة (المائية ، المائية ، الميثانول ، الأسيتونك) التي تم الحصول عليها بعد نقع مسحوق لحاء الفاكهة من بونيكاجراناتوم. لهذا الغرض المحدد للغاية ، ثبت أن التحليل الكيميائي والكيمي النوعي وكذلك دراسة السمية الخلوية ضروريان.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها مردود استخلاص مهمة تقدر بـ 40٪ لمستخلص الماء / الأسيتون. تم الكشف عن محتوى كبير من المستخلصات الثلاثة في الأيضات الثانوية ويجعل من الممكن إظهار كمية وفيرة من التانينات ، الكينونات الحرة ، الفلافونويد والمركبات المختزلة. كشفت جرعة البوليفينول وإجمالي مركبات الفلافونويد عن قيم 29.91 مجم EAG / جم و 1.515 مجم EC / جم على التوالي في خلاصة الماء / الميثانول وفي المحتوى أعلى من المستخلصات الأخرى اختبارها.

إن تحليل السمية الذي أجري باستخدام طريقة القياس الطيفي في المختبر جعل من الممكن التأكد من أن مستخلصات اللحاء الثلاثة من *Punica granatum* لديها معدل سمية منخفض جدًا والذي يعتبر غير ضار مقارنةً بالديكلوفيناك. جعلت هذه النتائج من الممكن البدء بأمان في تقييم النشاط المضاد للالتهابات من خلاصتنا الثلاثة المعدة. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلصاتنا الثلاثة لها قدرات كبيرة مضادة للالتهابات تتراوح من 90 إلى 100 ٪ وقابلة للمقارنة مع التأثير الوقائي للجزيء المرجعي ، وهي ديكلوفيناك.

جعل هذا التحقيق من الممكن الاستنتاج أن مستخلصاتنا المختلفة من لحاء فاكهة *Punica granatum* لديها قدرة مهمة على مكافحة الالتهاب عن طريق منع تحلل الغشاء الليوزومي. تختلف هذه القدرة اعتمادًا على مذيب الاستخلاص وتركيز المستخلص المستخدم.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum L* ، مركبات النبات الثانوية ، تأثير انحلاي ، نشاط مضاد للالتهابات

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale .....1

## Première partie : Synthèse bibliographique

**Chapitre 1 : Les plantes médicinales .....5**

1.1 Historique .....5

1.2. Les plantes médicinales..... 5

1.3. Les métabolites secondaires.....5

1.3.1. Les composés phénoliques.....6

1.3.2. Les saponines.....9

1.3.3. Les terpénoïdes.....9

1.3.4. Les alcaloïdes.....10

**Chapitre 2 : Présentation de *Punica granatum*.....11**

2.1. Description botanique.....11

2.2. Taxonomie.....12

2.3. Origine .....12

2.4. Utilisation traditionnelle.....13

2.5. Composition biochimique de *Punica granatum*.....13

2.6. Les activités biologiques et thérapeutiques de *Punica granatum*.....14

2.6.1. Activité anticancérogène .....15

2.6.2. Activité antioxydante.....15

2.6.3. Activité antidiabétique.....16

2.6.4. Activité antimicrobienne, antibactérienne et antivirale.....16

2.6.5. Activité toxique.....17

2.6.6. Activité anti-inflammatoire.....17

**Chapitre 3 :L'inflammation et activité anti-inflammatoire.....19**

3.1. Inflammation.....19

3.2. Types d'inflammation.....19

3.2.1. Inflammation aiguë.....19

3. 2.2. Inflammation chronique.....22

3.3. Médiateurs de la réaction inflammatoire.....	23
3.4. Anti-inflammatoires synthétiques.....	25
3.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	25
3.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes.....	25
3.4.3. Effets indésirables communs des anti-inflammatoires.....	26
3.5. Anti-inflammatoires naturels.....	27
3.6. Méthodes utilisées dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire.....	27
3.6.1. Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits des écorces du fruit de grenadier d'Ain Témouchent « <i>Punica granatum</i> ».....	28
3.6.2. Composition et hémolyse du sang .....	29

### **Deuxième partie : Matériel et méthodes**

1. Matériel végétale .....	31
2. Méthodes.....	31
2. 1.Préparations des différents extraits des écorces de fruit de <i>Punica granatum</i> .....	31
2.1.1. Extrait brut aqueux .....	31
2.1.2. Extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone.....	32
2.2.2. Le rendement des extraits secs .....	33
2.2. Tests phytochimiques .....	33
2.3. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes totaux.....	35
2.3.1. Préparation de l'extrait pour les dosages .....	35
2.3.2. Dosage des polyphenols totaux.....	35
2.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux .....	36
2.4.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits des écorces de fruit de <i>Punica granatum</i> .....	37
2.4.1. Echantillons de sang humain.....	37
2.4.2. Préparation du phosphate buffered saline (PBS).....	37
2.4.3. Préparation de la suspension des globules rouges humains.....	37
2.4.4. Préparation des extraits végétaux.....	37
2.4.5.Evaluation de la toxicité des extraits de l'écorce des fruits de <i>Punica granatum</i> vis-à-vis des globules rouges.....	38
2.4.6.Evaluation de l'effet des extraits de <i>Punica granatum</i> L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.....	38

### **Troisième partie : Résultats et discussion**

1. Etude phytochimique.....	41
1.1. Les tests phytochimiques.....	41
1.2. Les rendements en extraits secs .....	42
2. Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	44
2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	44
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	46
3. Evaluation de la toxicité des extraits d'écorces de fruit de <i>Punica granatum L.</i> vis-à-vis des globules rouges .....	48
4. Evaluation de l'effet des extraits de <i>Punica granatum L.</i> sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.....	51

### **Quatrième partie : Conclusion générale et perspectives.....**

### **Cinquième partie : Références bibliographiques.....**

57

60

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau N°01</u></b> :	Les principaux constituants des différentes parties du grenadier.....	<b>14</b>
<b><u>Tableau N°02</u></b> :	Le rôle des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire.....	<b>23</b>
<b><u>Tableau N°03</u></b> :	Quelques plantes à activité anti-inflammatoire.....	<b>27</b>
<b><u>Tableau N°04</u></b> :	Quelques méthodes d'étude de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro et in vivo</i> .....	<b>28</b>
<b><u>Tableau N°05</u></b> :	Les résultats de caractérisation des composants chimiques qui sont présents dans les différents extraits d'écorce de <i>Punica granatum. L</i> .....	<b>41</b>
<b><u>Tableau N°06</u></b> :	Les résultats du rendement d'extraction des écorces de fruit de <i>Punica granatum</i> .....	<b>43</b>

## Listes des Figures

<b><u>Figure N°01</u></b> :	Différents types structuraux de flavonoïdes.....	<b>6</b>
<b><u>Figure N°02</u></b> :	Structure d'acides hydroxy-cinnamiques .....	<b>7</b>
<b><u>Figure N° 03</u></b> :	Structure d'acide hydroxy-benzoïque.....	<b>7</b>
<b><u>Figure N° 04</u></b> :	Structure des tanins hydrolysables (Géraniine).....	<b>8</b>
<b><u>Figure N° 05</u></b> :	Exemples de structure de tanin condensé.....	<b>8</b>
<b><u>Figure N°06</u></b> :	Structure d'un monoterpène.....	<b>9</b>
<b><u>Figure N° 07</u></b> :	Structure d'un sesquiterpène.....	<b>9</b>
<b><u>Figure N° 08</u></b> :	Les fleurs et fruits du grenadier ( <i>Punica granatum L.</i> ).....	<b>11</b>
<b><u>Figure N°09</u></b> :	Les molécules de l'adhérence exprimées sur les cellules endothéliales et sur les polynucléaires neutrophiles.....	<b>21</b>
<b><u>Figure N° 10</u></b> :	Photo du matériel végétal.....	<b>31</b>
<b><u>Figure N°11</u></b> :	Schéma de l'extraction aqueuse d'écorce des fruits de <i>Punica granatum</i> .....	<b>32</b>
<b><u>Figure N°12</u></b> :	Schéma de l'extraction eau/méthanol d'écorce des fruits de <i>Punica granatum</i> .....	<b>32</b>
<b><u>Figure N°13</u></b> :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	<b>44</b>
<b><u>Figure N°14</u></b> :	Teneur en polyphénols totaux (TPT) dans les différents extraits d'écorce de <i>Punica granatum</i> .....	<b>44</b>
<b><u>Figure N°15</u></b> :	Courbe d'étalonnage de catéchine.....	<b>46</b>
<b><u>Figure N16:</u></b>	Teneur en flavonoïdes totaux (FVT) dans les différents extraits d'écorce de fruits de <i>Punica granatum L</i> .....	<b>46</b>
<b><u>Figure N°17</u></b> :	Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction des différentes concentrations d'extraits de diclofénac.....	<b>48</b>

<b><u>Figure N° 18:</u></b>	Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction des différentes concentrations d'extraits d'écorce de fruit de <i>Punica granatum L</i> et du diclofenac.....	<b>49</b>
<b><u>Figure N°19:</u></b>	Pourcentage d'inhibition (%) d'hémolyse des globules rouge en fonction des différentes concentrations de diclofenac.....	<b>52</b>
<b><u>Figure N°20 :</u></b>	Pourcentage d'inhibition (%) d'hémolyse des globules rouge en fonction des différentes concentrations d'extraits d'écorce de fruit de <i>Punica granatum L</i> et du diclofenac.....	<b>53</b>

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage.

**[ ]** : Concentration

**°C** : Degré Celsius.

**CCM** : La Chromatographie sur une couche mince

**CCR5**: Le récepteur à C-C chimiokine de type 5

**CD4** : Cluster de différenciation 4

**Cm** : Centimètre

**COX-2** : Cyclooxygenase-2

**CXCR4** : Le récepteur à C-X-C Motif Chimiokine 4

**FAO** : Formes activées de l'oxygène et de l'azote

**FeCl<sub>3</sub>**: Chlorure de fer

**FVT** : Teneur en flavonoïdes totaux

**g** : gramme

**Hcl**: Hydroxyde chlorure

**Hgcl<sub>2</sub>** : Chlorure de mercure (II)

**HPLC**: La chromatographie en phase liquide a haute performance

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Acide sulfurique

**I 2**: Le diiode

**IFN $\gamma$**  : L'interféron gamma

**IL6** : Interleukine 6

**Kcl** : Le chlorure de potassium

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de potassium

**KI** : Iodure de potassium

**LDL** : Lipoprotéine de faible densité

**LPS** : lipopolysaccharide

**M** : Mol/L

**Mg** : Magnésium

**mg** : Milligramme

**mg EAG/g MS**: mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche.

**mg EC/g**: mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

**mg EHHDP-G/g** : mg équivalent hexahydroxydiphenoyl glucose par gramme.

**mL**: millilitre

**MMP -3 /MMP-7** : Les métalloprotéases matricielles

**MPO** : Myélo-peroxydase

**MVS** : Matière végétale sèche

**NaCl** : Le chlorure de sodium

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** :Hydrogénophosphate de sodium

**NAOH** : Hydroxyde de sodium

**NF-κB** : Facteur nucléaire -kappa B

**NH<sub>4</sub>OH** : Ammoniaque

**nm**: Nanomètre

**NO** :Nitric oxide ,Monoxyde d'azote

**PBS** : Phosphate Buffered Saline (Le tampon phosphate salin).

**PGE** : Extrait aqueux d'écorce de *Punica granatum*

**PGE 2** : Prostaglandin E<sub>2</sub>

**PH**: Le potentiel hydrogène

**PPT** : *Polyphenols totaux*

**PRE** : Extraits d'écorce de *Punica granatum*

**Rdt** : Rendement

**Rpm** : Tour par minute, rotation par minute

**Sélectines E** : *Endotheliale*

**Sélectines L** : Leucocytaires

**Sélectines P** : Plaquettaires

**TGF-β1** : *Transforming growth factor beta 1* , Le facteur de croissance transformant

**TNF-α** : Facteur de nécrose tumorale

**TPT** : Teneurs en polyphenols totaux

**ul** : microlitre

**UV** : Ultra violet

**VIH** : Le virus de l'immunodéficience humaine

**VLA4**: Integrinα4β1 (*very late antigen-4*)

---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

L'inflammation est au cœur de la lutte contre les agents pathogènes. Elle est définie comme étant une réponse protectrice locale à l'invasion microbienne ou aux blessures. Elle doit être affinée et régulée avec précision, car les carences ou les excès de la réponse inflammatoire provoquent une morbidité et raccourcissent la durée de vie. L'inflammation chronique qui en résulte peut contribuer à des maladies telles que l'arthrite, les crises cardiaques et la maladie d'Alzheimer. Un lien fonctionnel entre l'inflammation chronique et le cancer est également suspecté depuis longtemps (**Tracey, 2002 ; Balkwill et Coussens, 2004**).

Les mécanismes homéostatiques anti-inflammatoires inversent ces processus lorsque l'agent infectieux est éliminé par les systèmes immunitaires innés et adaptatifs. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et les glucocorticoïdes en particulier sont essentiels pour limiter et résoudre le processus inflammatoire (**Rhen et Cidlowski, 2005**).

Une variété d'agents anti-inflammatoires sûrs et efficaces sont disponibles, y compris l'aspirine et d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens, avec de nombreux autres médicaments en cours de développement. La nouvelle ère des agents anti-inflammatoires comprend les « produits biologiques » tels que les thérapies anticytokines et les petites molécules qui bloquent l'activité des kinases (**Dinarello, 2010**), ainsi que les anti-inflammatoires stéroïdiens et les glucocorticoïdes qui sont largement utilisés pour la suppression de l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques (**Barnes, 1998**). Cependant, l'utilisation de substances anti-inflammatoires synthétisées chimiquement est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires (**Bjarnason et Hayllar, 1993**).

La médecine traditionnelle et les produits naturels offrent un grand espoir pour l'identification de nouveaux composés bioactifs qui seront utilisés comme médicaments pour traiter les maladies inflammatoires (**Gautam et Jachak, 2009**). De nombreuses substances naturelles douées d'activités biologiques ont de puissants effets anti-inflammatoires sans avoir les effets secondaires des médicaments classiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de recherche dont l'objectif consiste à réaliser une étude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des écorces du fruit de grenadier d'Ain Témouchent « *Punica granatum* » sur la stabilité membranaire du globule rouge. De nombreuses études sur les propriétés antioxydantes, anticarcinogènes et anti-inflammatoires des constituants de la grenade ont été publiées, en particulier sur ses fruits qui possèdent une histoire ethnomédicale et représentent un réservoir phytochimique de valeur

médicinale heuristique, mettant l'accent sur le traitement et la prévention du cancer, des maladies cardiovasculaires, du diabète et autres (**Lansky et Newman, 2007 ; Jurenka, 2008**)

Notre étude est structurée en trois parties :

- La première partie propose une mise au point bibliographique concernant les plantes médicinales et leurs métabolites secondaires suivie par une description botanique, une classification systématique, l'utilisation traditionnelle de *Punica granatum*, et finalement quelques notions sur l'inflammation et l'activité anti-inflammatoire.
- La seconde comporte la partie expérimentale ou nous avons réalisé : la préparation des différents extraits bruts des écorces de *Punica granatum*, ainsi que des tests phytochimiques. Nous avons aussi évalué l'activité anti-inflammatoire de cette plante médicinale, en déterminant aussi la toxicité de ces extraits vis-à-vis des globules rouges.
- La troisième partie présentera les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

---

# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### 1.1. Histoire

L'histoire de la découverte des plantes médicinales par l'homme remonte à des civilisations anciennes. Les documents historiques révèlent que leur utilisation remonte à 5000 ans avant JC en Chine, 1600 avant JC par les Syriens, les Babyloniens, les Hébreux et les égyptiens (Dery *et al.*, 1999 ; El Azzouzi & Zidane, 2015).

Actuellement, de plus en plus de personne reconnaissent les vertus de ces plantes qui regain d'intérêt auprès du public (El Hilah *et al.*, 2015). Elles sont utilisées aussi bien dans les pays développés que sous-développés et ce, en raison du rendement insatisfaisant et des coûts chers des médicaments modernes (El Azzouzi & Zidane, 2015).

### 1.2. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont identifiées comme étant toute plante contenant une ou des substances à intérêt thérapeutique ou à usage médicinale dans la synthèse de drogue utile. Il est à noter qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes dérivent soit directement ou indirectement, de plantes médicinales (El Hilah Fatima *et al.*, 2015).

Actuellement, la recherche de toxicité par les herboristes sur des remèdes, confirment au patient que la préparation et sa dose sont sans danger (Sofowora, 2010).

Ces propriétés thérapeutiques des plantes sont dues à des métabolites secondaires (Triantafyllidi *et al.*, 2015). Ces derniers sont considérés comme le niveau fonctionnel du métabolisme végétal (Hartmann, 1996) et sont synthétisés par les plantes en tant que dérivés du métabolisme primaire (Aharoni & Galili, 2011).

### 1.3. Les métabolites secondaires

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui sont responsables de leurs propriétés médicinales (Konéet *et al.*, 2017). Ces derniers ont une répartition inégale capable d'atteindre des valeurs élevées lors de leurs accumulations chez les végétaux (Macheix *et al.*, 2005).

Les métabolismes secondaires ont aussi des intérêts multiples misent à bénéfice en pharmacologie, dans l'industrie alimentaire et en cosmétologie. Parmi ces principes actifs, on retrouve les composés phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les mucilages, les composés volatils, les stérols et les terpènes (Alain *et al.*, 2018).

### 1.3.1 Les composés phénoliques

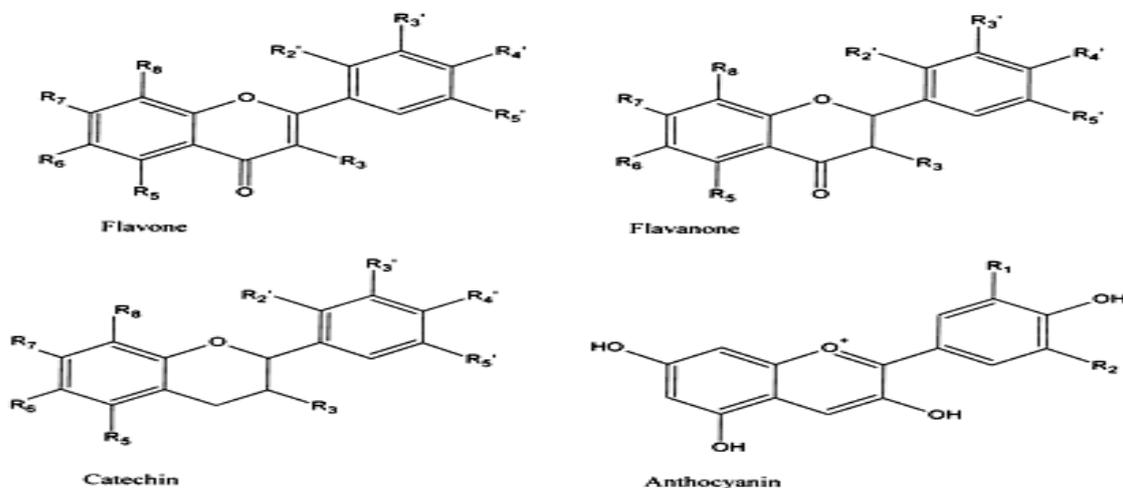
Les polyphénols sont un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont partagés en différentes classes qui sont distinguées les unes des autres par leur nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carbone (Macheix, 1996).

Ces molécules sont caractérisées par une forte bio activité, qui se manifeste au niveau de l'organisme en une large gamme de propriétés biologiques, de plus un impact positif sur la protection de la fonction vasculaire (Adriouch et al, 2017). Notamment dans la nature, les polyphénols sont les antioxydants les plus présents. Ils offrent aux plantes la possibilité de se défendre contre les phénomènes d'oxydation, ainsi que certaines agressions extérieures (Menat, 2006).

Le composé phénolique contient de nombreuses structures (plus de 5 000 molécules isolées), tels que les acides phénols, les tanins hydrolysables, les coumarines, les lignanes, les quinones, les phloroglucinols et les flavonoïdes (Hennebelle et al., 2004).

#### a- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes englobent plus de 6 000 composés naturels qui sont universels chez les plantes vasculaires mais rencontrés aussi chez les plantes médicinales (Erlund, 2004). Les flavonoïdes sont des composés dont structurellement la position 2 est substituée par un noyau benzénique (Ghedira, 2005). Ces flavonoïdes peuvent être subdivisés selon leur structure en quatre (4) principaux groupes (Nijveldt et al., 2001) (Figure N°01).

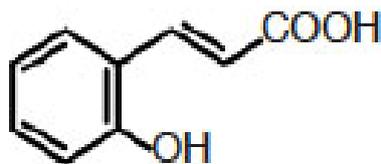


**Figure N°01 : Différents types structuraux des flavonoïdes (Nijveldt et al., 2001)**

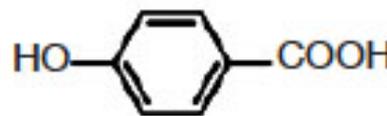
Les flavonoïdes sont capables d'influencer plusieurs fonctions biologiques comme la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Ces composés apportent un gain dans différentes pathologies chez l'homme telles que l'inflammation où les flavonoïdes agissent comme des inhibiteurs des enzymes de l'inflammation : la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (Hollmanet Katan, 1997 ; Scalbert et al.,2002 ; Blaut et al.,2003).

### b- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques qui possèdent au moins une fonction carboxylique et une fonction phénol. Cette classe est représentée par deux groupes principaux qui sont les acides hydroxy benzoïques (Figure N°02) et les acides hydroxy cinnamiques (Figure N°03) (Pompeu et al.,2018).



**Figure N°02** : Structure d'acides hydroxy cinnamiques (Pompeu et al.,2018)



**Figure N°03** : Structure d'acides hydroxy benzoïque (Pompeu et al., 2018)

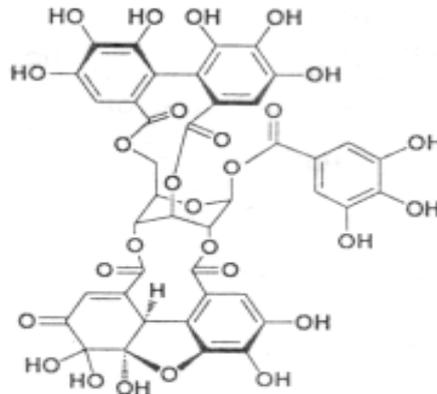
### c- Les tannins

Les vertus thérapeutiques des plantes tannifères sont liées à leurs métabolites secondaires, essentiellement aux tanins contenus dans leurs organes. Les tanins désignent un groupe de substances phénoliques polymériques, et possèdent des poids moléculaires variant entre 500 et 3000 (Séréme et al., 2008).

Ces derniers présentent des réactions classiques des phénols, ainsi que la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Cowan, 1999). Ils peuvent être trouvés dans l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Vandi et al., 2016).

Les tanins sont classés en 2 groupes et cela selon la nature de leur assemblages moléculaires.

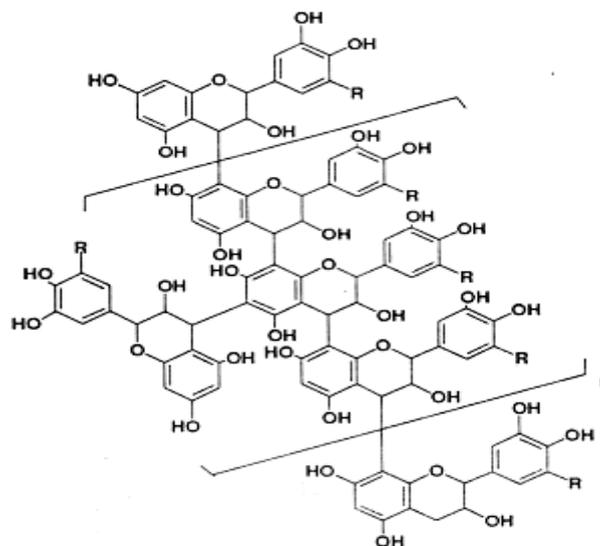
- Les tanins hydrolysables sont constitués d'une molécule glucidique sur laquelle est estérifiée de l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide éllagique, acide m-digallique). On leur attribue les noms de pyrogalliques et d'ellagitanins. Ce groupe de tanins est facilement hydrolysé par voie chimique ou enzymatique (Sereme et al., 2008) (Figure N°04).



**Figure N°04 : Structures de tanins hydrolysables (Géraniine).**

(Sereme et al., 2008)

- Les tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques dont la structure est voisine de celle des flavonoïdes. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Deli-Vandiet al., 2016) (Figure N°05).



**Polymère proanthocyanidolique**

**Figure N°05 : Exemple de structure de tanin condensé**

(Sereme et al., 2008).

### 1.3.2. Les saponines

Les saponines sont une classe de composés secondaires, produites principalement dans le règne végétal, et reconnues en tant que composé non volatiles. Ces molécules sont structurellement représentées sous forme d'un squelette stéroïdique ou triterpénique (aglycones non polaires, une génine) qui est couplé à un ou plusieurs monosaccharides (fraction glycoside). Ces derniers étant très fréquents chez les végétaux, ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives (Vincken et al., 2007).

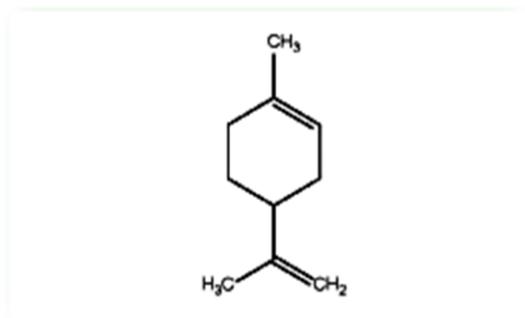
### 1.3.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des composés naturels qui comprennent une grande diversité structurelle, estimée à plus de 55 000 (Christianson, 2008).

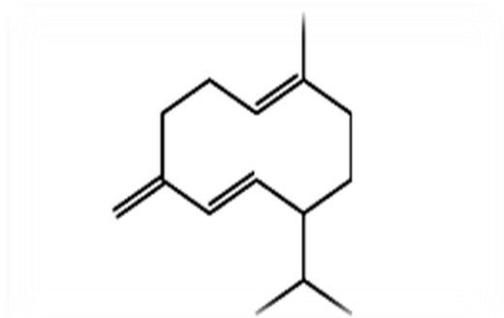
Les terpènes volatils contiennent de l'huile essentielle. Ils sont issus de la condensation d'unités isopréniques (d'unités 2-méthylbutane) et des dérivés aromatiques du phénylpropane (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

Ils peuvent être aussi semi-volatiles ou non-volatiles, saturées et insaturées, à chaîne droite, à chaîne ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou achiraux, portant éventuellement divers groupes fonctionnels oxygénés (ex. alcools, aldéhydes, cétones, esters et éthers) ou contenant de l'azote ou du soufre et sont solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann et Keeling, 2008).

Les familles moléculaires les plus connues des terpènes sont les monoterpènes en C<sub>10</sub> (Figure N°06). Ces derniers sont considérés comme des composés anti-infectieux et également d'excellents immuno-stimulants. Les sesquiterpènes en C<sub>15</sub> sont aussi majoritairement utilisés comme calmants et anti-inflammatoires (Figure N°07) (Couic-Marinier & Lobstein, 2013).



**Figure N°06 :** Structure d'un monoterpène



**Figure N°07 :** Structure d'un sesquiterpène

(Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

#### 1.3.4. Les alcaloïdes

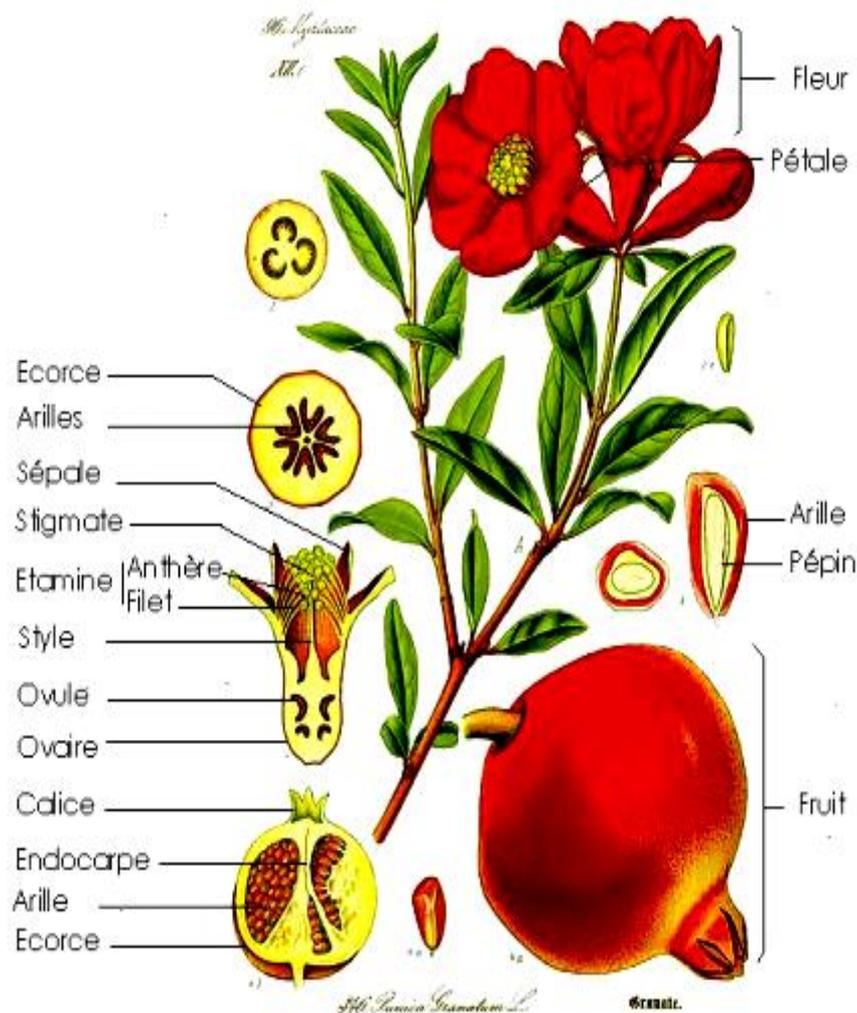
Le terme d'alcaloïde a été introduit par Meisner au début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases. Un alcaloïde est tout simplement une substance organique azotée d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure complexe (**Badiaga, 2011**).

Les alcaloïdes ont le caractère d'être des principes actifs très puissants à des très petites doses. Ils peuvent être trouvés dans 20% des plantes, de plus ils représentent une des sources les plus importantes de nos médicaments, comme la classe des alcaloïdes des Solanacées (Atropine, Scopolamine) (**Bensakhria, 2018**).

Ainsi, on divise les alcaloïdes en 3 classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et des pseudo-alcaloïde (**Badiaga, 2011**).

## 2.1. Description botanique

*Punica granatum L.* appartenant à la famille *Lythraceae* est communément appelée grenade. Le grenadier est un arbuste de 2 à 5 m de hauteur, très rameux et légèrement épineux. Les branches sont angulaires et le feuillage est caduque. Les feuilles opposées ovales sont oblongues de 2 à 8 cm de long (Roth et Lindorf, 2013 ; Jurenka, 2008). La fleur est d'un rouge écarlate, sessile, régulière et grande. Les pétales des fleurs sont de 5 à 7. Les étamines sont très nombreuses et son fruit est une baie cortiquée arrondie surmontée de dents du calice, le rendent facilement identifiable. Ils sont caractérisés par une croissance assez lente. La longévité des arbres cultivés est de 50-60 ans (Evreinoff, 1957) (Figure N°08).



**Figure N°08** : Les fleurs et fruits du grenadier (*Punica granatum L.*)

(Hmid, 2013).

## 2.2. Taxonomie

En 1753, le grenadier (*Punica granatum*) a été décrit par Linné et introduit dans sa classification comme suit:

- ✓ Embranchement: Spermaphyte
- ✓ Sous-embranchement : Angiospermes
- ✓ Classe : Magnoliopsida
- ✓ Ordre : Myrtales
- ✓ Famille : Punicaceae
- ✓ Genre : *Punica*
- ✓ Espèce : *Punicagranatum*

En 2003, cette classification a été révisée, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est la suivante :

- o Clade : Angiospermes
- o Clade : Dicotylédones vraies
- o Clade : Rosidées
- o Ordre : Myrtales
- o Famille : Lythraceae
- o Genre : *Punica*
- o Espèce : *Punica granatum*

Dans cette nouvelle classification, la famille des *Punicacées* n'existe plus. Le grenadier appartient à la famille des Lythracées, qui comporte 30 genres et 600 espèces (Spichiger et al., 2002 ; Wald , 2009 ).

## 2.3. Origine

La patrie phylogénétique du grenadier (*Punica granatum*) se trouve selon les derniers travaux des botanistes et pomologues, dans toute la vaste région englobant l'Iran, l'Afghanistan et la Transcaucasie orientale. On observe dans ces pays une multitude de formes spontanées et de variétés diverse cultivées d'un grand intérêt (Evreinoff, 1957). En Asie Mineure dans la région méditerranéenne, ainsi qu'en Afrique du Nord, l'espèce se serait naturalisée à la suite d'une très ancienne culture, et de sa dispersion par les oiseaux. Sa naturalisation dans la région

méditerranéenne est si fréquente qu'elle paraît constituer un prolongement de son habitat primitif. Une chose est certaine, la culture du grenadier a commencé en Asie occidentale à l'époque préhistorique. Son extension dans l'antiquité vers l'Occident d'abord, puis vers l'Inde et la Chine, a été suivie d'une naturalisation très fréquente et très ancienne qui peut induire en erreur sur sa véritable origine (Evreinoff, 1957).

#### 2.4. Utilisation traditionnelle

L'écorce de grenadier ainsi que ses graines, ses fruits, son épicarpe et ses fleurs, étaient depuis des milliers d'années utilisés pour leurs nombreuses propriétés médicinales et cosmétiques au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique latine (Malik et al., 2005). L'écorce de fruit astringent et des racines fraîches ont des propriétés toniques qui aident dans le traitement des troubles digestifs et intestinaux sévères ainsi que les affections parasitaires. L'infusion de feuilles de grenade aide à prévenir aussi l'anémie. Le fruit savoureux produit de grandes quantités de jus de refroidissement. Les fleurs fournissent un colorant pour les cheveux. Les feuilles et les fleurs donnent des solutions pour les gargarismes (Clay & Hubbard, 1987).

#### 2.5. Composition biochimique de *Punica granatum*

*Punica granatum* est une bonne source de protéines, fibres, sucres simples, oligo-éléments, minéraux et même des métabolites secondaires (Fournier, 1948).

Son étude phytochimique démontre sa richesse en polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes ...) ainsi qu'en alcaloïdes, acides aminés, acides organiques, sucres, stéroïdes, et sels minéraux (Gil et al., 2000 ; Lansky et Newman, 2007; Syed et al., 2007).

Les principaux constituants des différentes parties du grenadier sont résumés dans le tableau N°01.

**Tableau N°01 : Les principaux constituants des différentes parties du grenadier.**

Partie de la plante	Composants	Références
<b>Zeste de grenade</b>	Acide gallique, Acide ellagique, Punicaline, Punicalagine, Acide caféique, Ellagitannins, Alcaloïdes pelletierine, Lutéoline, Kaempferol, Quercétine	- Artik et al., 1998 - Amakura et al., 2000
<b>Jus de grenade</b>	Sucres simples, Acides organiques aliphatiques, Acide gallique, Acide ellagique, Acide quinique, Flavonols, Acides aminés, Minéraux	- Artik et al., 1998 - Amakura et al., 2000 - Waheed et al., 2004 - Lansky et Newman, 2007
<b>Racine et écorce de grenade</b>	Ellagitannins, Alcaloïdes de pipéridine, Alcaloïde de pyrrolidine, Alcaloïdes pelletierine	- Tanaka et al., 1986 - Neuhofer et al., 1993
<b>Fleur de grenadier</b>	Acides galliques, Acide ursolique, triterpénoïdes, Acides gras	- Huang et al., 2005 - Lan et al., 2009
<b>Feuilles de grenadier</b>	Glucides, Sucres réducteurs, Stérols, Saponines, Flavonoïdes, Tanins, Alcaloïdes de pipéridine, Flavone, Glycoside, Ellagitannines	- Tanaka et al., 1986 - Nawwar et al., 1994 - Gil et al., 2000 - Chaitra et al., 2012
<b>Graine de grenadier</b>	Acide 3,3'- Di - O-méthylellagique, acide 3,3 , 4'-TriOméthylellagique, acide punique, acide oléique, acidepalmitique, acide stéarique, acide linoléique, stérols	- Wang et al., 2004 - Lansky et al., 2005

## 2.6. Activités biologiques et thérapeutiques du *Punica granatum*

Les effets médicaux bénéfiques apportés par le grenadier sont définis par sa richesse en nombreux composés bioactifs. Ces derniers font de la grenade avec ces différentes parties, une plante à propriétés anticancérogène, antioxydante, antidiabétique et anti-inflammatoire (Jurenka, 2008).

### 2.6.1. Activité anticancérigène

Le grenadier présente une activité qui empêche la prolifération anormale de cellules cancéreuses ou peut ralentir la formation des tumeurs par différents mécanismes (**Wald, 2009**). Une série d'études précliniques démontre que le jus de grenade fermenté présente un ralentissement du développement des cellules cancéreuses et la formation de tumeurs prostatiques (**Maliket *al.*, 2005**).

Cette dernière a été soutenue par une étude démontrant que la combinaison entre le jus fermenté, l'écorce de grenade et l'huile de pépins de grenade inhibe la prolifération, l'invasion et la sécrétion de phospholipase A2 (sPLA2) dans le cancer de la prostate (**Lansky et *al.*, 2005**). De plus, il a été démontré dans une étude que le jus de grenade présente aussi d'intéressantes propriétés aussi bien dans un but préventif que dans un but thérapeutique contre le cancer du sein (**Kimet *al.*, 2002**). Des propriétés chimio-préventives du cancer du côlon, ont été étudiées dans des cellules cancéreuses du côlon humain HT-29 (**Kasimsetty et *al.*, 2010**).

### 2.6.2. Activité antioxydante

Des études *in vitro* ont démontré après une comparaison que le jus de grenade et les extraits des graines du grenadier ont une capacité antioxydante deux à trois fois supérieure à celle du thé vert et de onze fois celle des jus de fruits étudiés (**Gil et *al.*, 2000**). Cette capacité antioxydante agit en piégeant et en bloquant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages, la peroxydation lipidique et l'inhibition d'oxydation des LDL chez les animaux (**Basu et Penugonda, 2009**). Les composés responsables de cette activité dans le jus de grenade sont les polyphénols antioxydants tels que les ellagi-tannins qui représentent 92% de l'activité antioxydante et les anthocyanines. Ces ellagi-tannins sont retrouvés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (**Seeramet *al.*, 2004**). Plusieurs études récentes sur la grenade, soulignant principalement son rôle de vasculo-protecteur qui contribue à la réduction du stress oxydatif et l'agrégation plaquettaire (**Wang et *al.*, 2018**). Une étude en 2015 réalisée par **Salwe** sur des rats mâles (*Wistar*), montre qu'une dose plus élevée d'extrait de fruit de *P. granatum L* fut efficace pour augmenter les taux d'enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase et la catalase).

### 2.6.3. Activité antidiabétique

Il a été mentionné que les mécanismes hypoglycémiques de l'extrait de fleurs de grenadier sont similaires à ceux de l'acarbose et du 10- $\alpha$ -glucosidase qui est un inhibiteur utilisé dans le traitement de la maladie de type 2 (Jafri et al., 2000). Des études sur l'extrait aqueux de l'écorce de grenade ont également présenté des résultats significativement hypoglycémiques, et il est suggéré de l'utiliser pour traiter le diabète type 1 aussi bien que pour le type 2 (Katz et al., 2007).

Des études effectuées par Khalil en 2004 sur les rats diabétiques traités avec l'extrait aqueux d'écorce à une dose de 0,43 g / kg de poids corporel pendant quatre semaines ont présenté une baisse significative du taux de sucre dans le sang et une augmentation du nombre de cellules  $\beta$ , ce qui contribue relativement à l'intensification du taux d'insuline.

### 2.6.4. Activités antimicrobienne, antibactérienne et antivirale

Une étude a prouvé que les composés dans l'extrait de la grenade peuvent aider à lutter contre les micro-organismes nuisibles, ainsi de permettre d'améliorer l'action antibactérienne de certains antibiotiques (Braga et al., 2005). En 2014, les résultats d'une étude faite par Dastjerdi et ses collaborateurs confirment que l'extrait de *Punica granatum* avait d'importantes propriétés antibactériennes contre cinq (5) bactéries buccales (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* et *Enterococcus faecalis*). Dans une étude récente sur les extraits de zeste de grenade, une efficacité d'inhibition de la croissance d'un nombre de bactéries comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* a été obtenue (Karthikeyan et Vidya, 2019).

L'extrait d'acétate d'éthyle d'écorce de fruit a été décrit pour ces propriétés à large spectre d'activité antimicrobienne (Barathikannan et al., 2016). L'étude de Howell et D'Souza en 2013 sur l'activité antivirale de la grenade, a montré que l'acidité des solutions concentrées de jus de grenade contribuait à une activité antigrippale rapide. Une autre étude a montré que les inhibiteurs d'entrée du virus VIH-1 contenus en jus de grenade, bloquent la liaison du VIH-1 aux récepteurs de cellules hôtes CD4 et CXCR4 / CCR5 et inhibent l'infection par les clades de virus (Neurath et al., 2005).

### 2.6.5. Activité toxique

La toxicité de *Punica granatum* n'a pas été intensivement étudiée. Cependant, des études réalisées sur des extraits aqueux de grenade dans conditions similaires à celles utilisées par la médecine traditionnelle, n'ont montré aucun effet toxique (**Desta, 1995**). Il est important de garder à l'esprit que les fruits de grenade à l'exception de la pelure, ne sont pas toxiques. Néanmoins, il a été démontré que certaines parties de la plante, comme la racine et l'écorce, sont toxiques (**Fuentes et al., 1985**). L'activité toxique d'un extrait d'écorce de *Punica granatum* était liée à sa teneur en alcaloïdes selon **Tripathi et Singh (2000)**.

**Vidal et ses collaborateurs en 2003** ont mené une recherche sur l'embryotoxicité, la toxicité aiguë et la toxicité après l'administration répétée par voie intranasale d'extraits hydroalcooliques du fruit du *Punica granatum*. De tels extraits sont traditionnellement utilisés à Cuba pour traiter les troubles des voies respiratoires supérieures, comme celles causées par le virus de la grippe. Les résultats obtenus montrent que les extraits hydroalcooliques de fruits de *Punica granatum* se présentait inoffensifs lorsqu'ils sont directement administrés par cavité nasale.

La génotoxicité de *P. granatum* a également été signalée par **Settheetham et Ishida (1995)**, qui en utilisant des tests *in vitro*, ont montré que l'administration d'extrait aqueux de l'écorce d'un fruit de grenade a induit l'apoptose dans les cellules humaines. Au contraire, **Amorin en 1995**, n'a pas observé d'effet génotoxique à l'aide du test micronucléus chez la souris traitée par voie orale avec des extraits aqueux de fruits de cette plante (**Amorin, 1995 ; Sánchez-Lamar et al., 2008**).

Une autre étude à évaluer le risque génotoxique potentiel de ces extraits. À cette fin, différents paramètres génétiques ont été testés, afin d'évaluer les dommages causés à l'ADN à différents niveaux d'expression génétique. Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydroalcoolique du fruit de *P. granatum L.* a induit des dommages génétiques à différents niveaux d'expression : recombino-gène, mutagène et clastogène (**Sanchez-Lamar et al., 2008**).

### 2.6.6. Activité anti-inflammatoire

Des études menées en 2017 par **Jianjunxu**, ont montré que l'extrait du grenadier stimule un effet anti-inflammatoire capable de moduler la synthèse de plusieurs cytokines et médiateurs trouvés impliqués dans le processus inflammatoire tel que NO, d'IL6, PGE 2 et TNF- $\alpha$  dans des cellules RAW 264,7 (Cellules macrophages de souris stimulés par LPS *in vitro*). Plus

précisément c'est l'acide éllagique, l'acide gallique et la punicalagine qui ont été décrit comme possédant le potentielle d'inhiber la production de NO, de PGE-2 et d'IL-6 induit par le lipopolysaccharide durant une étude qui visait à évaluer l'effet anti-inflammatoire de composés isolés d'acétate d'éthyle (EtOAc) de la fraction de *P. granatum* (**Ben Saad, 2017**).

Des études *in vivo* ont démontré également que l'huile obtenue des graines du grenadier pressées possèdent une action inhibitrice de la cyclo-oxygénase (enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines), de la lipo-oxygénase (qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes), des prostaglandines et des leukotriènes qui sont les principaux médiateurs de l'inflammation (**Schubert et al., 1999**).

Une autre étude réalisée par **Nigris en 2007** sur des rats obèses (*Zucker Fatty*), qui après avoir reçu une supplémentation d'extraits de fruits de grenadier pendant 5 semaines ont montré une diminution significative de l'expression de thrombospondine et de cytokine TGF- $\beta$ 1. Ces dernières sont définies comme étant des marqueurs de l'inflammation vasculaire.

### 3.1. Inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est un processus habituellement bénéfique représentant une réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression (**Wald, 2009**) d'origine exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) ou endogène (cellules cancéreuses ou pathologies auto-immunes) (**Iwalewa et al., 2007**). Cette réaction est réalisée dans le but d'éliminer d'éventuels pathogènes et d'assurer le retour à l'homéostasie ainsi qu'à la cicatrisation du tissu lésé, par divers processus de réparation (**Barton, 2008**).

Les signes cliniques de l'inflammation sont considérés variables. Tandis, lors d'un phénomène inflammatoire, on rencontre les quatre signes cardinaux connus depuis Galien (131-201 après JC) : la rougeur, l'œdème, l'augmentation de la chaleur locale et la douleur (**Wald, 2009**). Ces derniers sont décrits comme les symptômes caractéristiques de l'inflammation (**Nathan, 2002**).

De nombreuses pathologies telles que l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, les maladies inflammatoires de l'intestin, et même les cancers, font intervenir des processus inflammatoires (**Wald, 2009**).

### 3.2. Types d'inflammation

Deux types d'inflammation ont pu être distingués morphologiquement dont une forme aiguë et une autre chronique comme l'infection virale, la réaction à corps étrangers et les mycoses. Cette forme chronique est très similaire sur le plan morphologique à l'inflammation observée dans la maladie de Crohn (**De Vos et al., 1989 ; Van Pra et al., 2016**). Une inflammation aiguë peut disparaître ou aboutir à une cicatrisation, mais en absence d'une résolution elle peut évoluer vers une inflammation chronique (**Stevens et al., 2004**).

#### 3.2.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est définie comme étant une réponse immédiate exercée par l'organisme contre un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines) caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Cette inflammation guérit spontanément ou avec un traitement, mais dans le cas d'une destruction tissulaire importante, elle peut laisser des séquelles (**Serhan et al., 2010 ; Weill et Batteux et al., 2003**).

L'inflammation aiguë repose sur trois grandes phases principales à savoir une phase vasculaire immédiate, une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation.

### a. Phase vasculaire

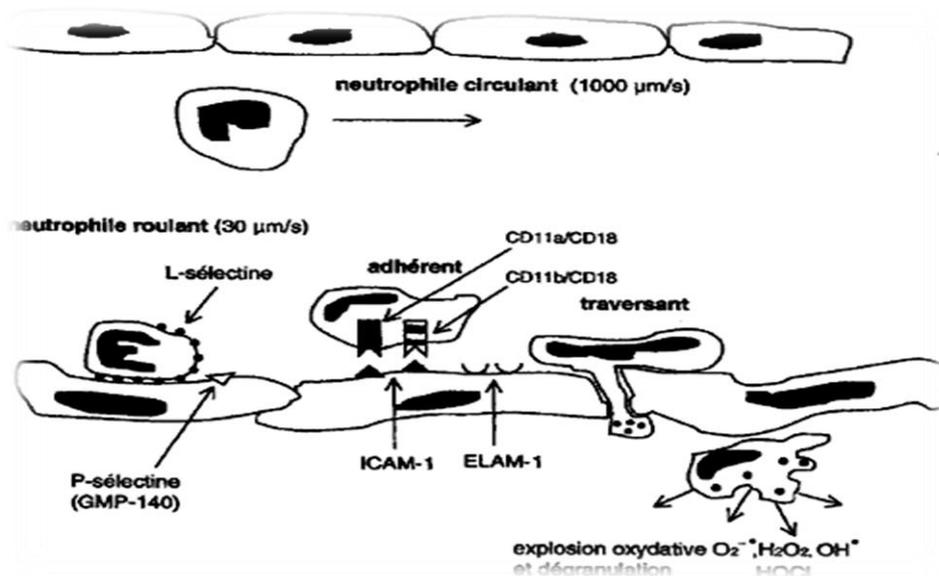
La phase vasculaire repose sur l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire entraînant une vasoconstriction artériolaire de courte durée (Weill et al., 2003 ; Serhan et al., 2010). Cette phase est médiée par la libération de médiateur d'inflammation tels que les cytokines (le TNF), l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-8, par de l'endotoxine ou lipopolysaccharide (LPS), par de l'histamine, de la thrombine etc. (Pasquier, 1995). Ces médiateurs activent les plaquettes présentes dans la circulation, ce qui conduira à une vasodilatation artériolaire, capillaire et veineuse permettant l'afflux massif de sang vers le foyer inflammatoire.

Ainsi l'augmentation de la perméabilité capillaire et veineuse par un élargissement des jonctions entre les cellules endothéliales permet l'extravasation des cellules sanguines, ce qui traduit les signes de chaleur et de rougeur résultants (Henrotin et al., 2001 ; Stankov, 2012). Les polymorphonucléaires neutrophiles et les monocytes franchissent la barrière endothéliale au niveau des jonctions intercellulaires. Une fois qu'elles sont fixées à l'endothélium vasculaire, vers le site de l'inflammation (diapédèse), cela s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème (Henrotin et al., 2001 ; Iwalewa et al., 2007).

L'adhérence des polymorphonucléaires et des macrophages à l'endothélium vasculaire est une étape indispensable à l'évolution du processus inflammatoire. Cette étape est possible grâce à des molécules de l'adhérence présentes à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes dont un grand nombre ont été décrites (Carlos et al., 1994 ; Pasquier, 1995). Il existe trois types (Figure N°09) :

- Le premier comporte des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines les "inter cellular adhésion-molécules" (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3) et les "vascular cellular adhesion molécules" (VCAM-1) ;
- Le deuxième type concerne les molécules de sélectines (P-sélectine, E-sélectine, L-sélectine) et de glycoprotéines reconnaissant un ligand de nature glucidique.
- Le dernier type regroupe les molécules appartenant à la famille des intégrines :  $\beta$ 2-intégrines et  $\beta$ 1 intégrines ou VLA4 présentes principalement à la surface des leucocytes (Pasquier, 1995).

D'autres molécules non protéiques possèdent un rôle important dans l'adhérence et sont exprimées par les cellules endothéliales dont la molécule la plus étudiée est le facteur activateur des plaquettes (PAF) (Lorant et al., 1991).



**Figure N°09 :** Les molécules de l'adhérence exprimées sur les cellules endothéliales et sur les polynucléaires neutrophiles (Pasquier, 1995).

### b. Phase cellulaire

La phase cellulaire débute au moment du rassemblement d'un grand nombre de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes au site de l'inflammation (Pasquier, 1995). Elle est attiré par un gradient de concentration de peptides chimiotactiques, formé au sein du tissu enflammé (Henrotin et al., 2001). Les neutrophiles seront suivis par les monocytes qui une fois arrivés au site de l'inflammation, infiltreront la lésion pour se différencier en macrophages activées qui participent à la déterction et exercent leurs activités phagocytaires et cytotoxiques contre l'agent agresseur ou les fragments du tissu altéré (Hold et El-Omar, 2008). La digestion des produits de phagocytose est assurée par des lysozymes incluant des enzymes hydrolytiques, des protéolytiques, des polypeptides antimicrobiens ainsi que des granules cytoplasmiques contenant des enzymes oxydatives (Borregaard et al., 1993). Cela induit la dégranulation des composants internes de la cellule, ce qui conduit à la libération de molécules pro-inflammatoires et des facteurs cytotoxiques dans les organes cibles (Asehnoune et Edouard, 2006). Cependant au cours de la phagocytose, des enzymes protéolytiques ainsi que des formes réactives de l'oxygène peuvent s'échapper des polymorphonucléaires et des macrophages, concourant ainsi à l'entretien de l'inflammation et à une destruction inappropriée de cibles tissulaires et moléculaires (Pasquier, 1995).

### c. Phase de résolution

La résolution de l'inflammation est à l'origine de la réparation tissulaire raison pour laquelle elle est aussi appelée la phase de réparation. Cette phase a lieu si les agents de l'inflammation et les produits de la nécrose tissulaire ont pu être éliminés. Dans ce cas, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, n'étant plus stimulés par les agents pro inflammatoires, cessent de libérer des formes réactives de l'oxygène et des enzymes protéolytiques. En conséquence, les cellules fibroblastiques et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation (**Pasquier, 1995**).

Généralement, les neutrophiles prennent la voie de l'apoptose après un séjour de 24 à 48 heures, et cela, en réponse à divers signaux, telle que la diminution des messagers de survie ainsi les neutrophiles apoptotiques seront phagocytés par les macrophages, donnant à ces derniers un signal qui remplace leur synthèse de cytokines pro-inflammatoires par celle de cytokines anti-inflammatoires (**Fadoket *al.*, 1998**). Ce phénomène permet la cicatrisation si le tissu lésé ne peut pas se régénérer ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante et/ou prolongée. Il ne persiste alors plus aucune trace de l'inflammation (**Weill *et al.*, 2003 ; Medzhitov, 2010**).

### 3.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée qui ne peut avoir de guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant durant plusieurs semaines voire plusieurs années. Elle est aussi définie par la présence de cellules immunitaires (**Iwalewa *et al.*, 2007 ; Serhan *et al.*, 2010**). L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë souvent lorsque la phase vasculo-exsudative est passée inaperçue et qui évoluent en inflammation chronique (**Rousselet *et al.*, 2005**). Dans l'inflammation chronique, les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire et de réparation coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Le plus souvent les tissus ne se régénèrent pas correctement et un phénomène de cicatrisation pathologique s'installe (**Weill *et al.*, 2003**).

### 3.3. Médiateurs de la réaction inflammatoire

Durant la réponse inflammatoire différentes molécules appelées médiateurs de l'inflammation, pro ou anti-inflammatoires seront libérées par de nombreuses cellules telles que les mastocytes, les thrombocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages présentes dans le sang circulant et interviennent dans le démarrage ainsi que le contrôle des étapes de la réaction inflammatoire (Pasquier, 1995 ; Henrotin et al., 2001 ; Iwalewa et al., 2007). Ces médiateurs peuvent être subdivisés en des cytokines, des neuropeptides, des médiateurs lipidiques, des fractions du complément, des facteurs de coagulations, des formes activées de l'oxygène et de l'azote (FAO) et ou encore des métalloprotéases (Henrotin et al., 2001). Leurs rôles sont résumés dans le tableau N°02.

**Tableau N°02 : Le rôle des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire**

Classe des médiateurs de l'inflammation	Principaux médiateurs d'inflammation	Rôle dans le processus d'inflammation	Références
Les cytokines	Pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)	-TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ : - jouent un rôle primordial dans l'initiation et la chronicité de la réaction inflammatoire. -Stimulent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales favorisant ainsi la migration des leucocytes vers le site enflammé, -stimulent la libération des chimiokines.	Henrotin et al., 2001
		IL-6 favorise le recrutement des monocytes sanguins vers les tissus enflammés, ainsi que l'induction locale d'activation des phagocytes,	Ostrowski et al., 1999
		IL-8 induit la libération d'enzymes lysosomiales et possède des propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles, les monocytes et les macrophages,	Henrotin et al., 2001
	Anti-inflammatoire (IL-4, IL-10 et IL-12, TGF- $\beta$ )	Inhibent la libération de TNF- $\alpha$ et d'IL-1 $\beta$ , réduisent le nombre des polymorphonucléaires dans le tissu enflammé	Henrotin et al., 2001
Les neuropeptides	Substance P	-Augmente la perméabilité vasculaire -Stimule la production de FAO par macrophage -Stimule le chimiotactisme des neutrophiles - Aussi impliqué dans le remodelage des tissus enflammés.	Henrotin et al., 2001

<b>Les médiateurs lipidiques</b>	Leucotriènes, Prostaglandines, PAF (facteur d'activation plaquettaire)	<b>Prostanoïdes</b> : -Inhibent la synthèse de cytokines activatrices des lymphocytes, -Prostaglandines et prostacycline sont des puissants vasodilatateurs, -Le thromboxane A2 est un vasoconstricteur	- <b>Henrotin et al., 2001</b> ; - <b>Iwalewa et al., 2007.</b>
		<b>Leucotriènes</b> : -Augmentent la perméabilité vasculaire, -Participent à la formation de l'œdème, -Possèdent des propriétés chimiotactiques, -Stimule la production de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$ et de l'IL-4 par les lymphocytes T	<b>Henrotin et al., 2001</b>
		<b>PAF</b> : stimulent l'agrégation plaquettaire et augmente la perméabilité vasculaire et active les leucocytes	<b>Hosford et Braquet, 1990</b>
<b>Les fractions du complément</b>	système de protéines sériques, dont certaines C3a C3b et C5a	<b>C3a et C5a</b> : sont des anaphylatoxines qui augmentent la perméabilité vasculaire et la libération de l'histamine des polynucléaires basophiles et des mastocytes.	<b>Pasquier, 1995</b>
		<b>C3b</b> : facilite la phagocytose en s'attachant aux complexes immuns et aux bactéries.	<b>Pasquier, 1995</b>
<b>Les facteurs de coagulations</b>	Lathrombine, Facteur 7a et 10a de coagulation	-Stimulent l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire, -Induit la synthèse de PAF d'IL-6 et IL-8 ainsi que la production de cytokines par les neutrophiles et les monocytes.	<b>Colman, 1999</b>
<b>Les formes activées de l'oxygène et de l'azote</b>	FAO, NO	Les effets de <b>FAO</b> peuvent être pro ou anti-inflammatoires selon l'importance et le lieu de leur production. <b>NO</b> : puissant vasodilatateur, augmente la production de TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ et inhibe la production de cytokines IL-6, IL-8.	<b>Henrotin et al., 2001</b>
<b>Les métalloprotéases</b>	Stromélysine (MMP-3) matrilysine (MMP-7)	Responsable de la dégradation des tissus de l'organe lésé définie comme étant des lésions tissulaires irréversibles responsables d'atteintes fonctionnelles graves de cet organe lésé.	<b>Henrotin et al., 2001</b>

### 3.4. Anti-inflammatoires synthétiques

Les anti-inflammatoires agissent comme des inhibiteurs sur les défenses immunitaires, et cela en inhibant le chimiotactisme des cellules de défense de l'organisme ce qui favorise l'apparition ou l'aggravation ainsi que la diffusion de l'infection (Nicot *et al.*, 2013).

Selon l'origine de la biosynthèse des anti-inflammatoires et leurs modes d'action, on distingue deux classes principales :

#### 3.4.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments aux propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires. ils sont également parmi les antalgiques les plus prescrits, en particulier dans les cas où la douleur est associée à un état inflammatoire (Burian et Geisslinger, 2005 ; Bacchi *et al.*, 2012).

Les A.I.N.S n'agissent que sur une partie de la composante inflammatoire. Ils bloquent la dégradation de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase. Ils s'opposent donc à la production des prostaglandines et du thromboxane A2. Ils agissent également sur la composante cellulaire de l'inflammation en bloquant la mobilité de cellules notamment les macrophages (Souaga *et al.*, 1998). Les A.I.N.S. ont une action réduite par rapport à celle des A.I.S. (Souaga *et al.*, 1998).

#### 3.4.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S) ou corticoïdes

Ces stéroïdes analogues ou précurseurs de la cortisone, naturellement sécrétés par les glandes surrénales, ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques glucidique, protidique et lipidique (Muster, 2005).

Les corticoïdes sont devenus des agents d'intérêt incontournables pour la période préopératoire en raison de leurs propriétés antiémétiques ainsi que leur effet antalgique (Rhen et Cidlowski, 2005). Les glucocorticoïdes ont des propriétés immunomodulatrices et peuvent être utilisés pour traiter des états de chocs anaphylactiques ou endotoxémiques. Ils peuvent aussi être prescrits pour leurs effets métaboliques (hyperglycémisants) ou pour induire la parturition, indépendamment de leurs effets anti-inflammatoires qui régule des états inflammatoires chroniques (Bousquet-Mélou, 2014). De plus, ces anti-inflammatoires stéroïdiens exercent une action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines. Cette action s'applique principalement sur la phospholipase A2, en amont du métabolisme de l'acide

arachidonique par la cyclo-oxygénase (**Rhen et Cidlowski, 2005**). Les anti-inflammatoires stéroïdiens bloquent donc, la libération de l'acide arachidonique à partir des membranes cellulaires. Ils ont donc une action globale et rapide sur l'inflammation (**Souaga et al., 1998**)

### 3.4.3. Effets indésirables communs des anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont généralement prescrit pour traiter des symptômes de nombreuses maladies inflammatoires en raison de leur efficacité. Cependant leurs utilisations sont limitées du fait de leurs effets indésirables (**Lee et Feldman, 1997**). L'utilisation des anti-inflammatoires par voie systémique ou locale expose à de nombreuses complications dont, leur fréquence et leur gravité sont en fonction de la posologie et de la durée du traitement (**Souaga et al., 1998**).

La liste des effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens pour tous types confondus : peut prévenir la formation des caillots (thrombose), aggrave les hémorragies ; provoquent aussi des problèmes gastro-intestinaux (ulcères), cardiovasculaires, hépatiques, rénaux et des hypersensibilités (**Garciaet Jick, 1994 ; Risser et al., 2009 ; Ziltener et al., 2010**). La toxicité gastro-intestinale (dyspepsie, nausées, ulcères et saignements) apparaît surtout lors d'une prise chronique (**Ziltener et al., 2010**) et le risque de lésions gastriques est majeur au cours des trois premiers mois de traitement (**Capetet al., 2001**). Les facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'hypovolémie et la diverticulose augmentent en fréquence des complications après son association à des stéroïdes ou à des anticoagulants (**Hans-Peter Wirth et al., 2006**) .

Les anti-inflammatoires peuvent aussi entraîner une élévation de la pression artérielle ce qui peut conduire à l'initiation d'un traitement anti-hypertenseur (**Johnson et al., 1994 ; Griffin et Scheiman, 2001**). De plus, ces effets secondaires se traduisent par une insuffisance rénale aiguë comme la déshydratation (**Camu et al., 1996**) .

Par ailleurs, l'administration de corticoïdes conduit souvent à des complications, dont les plus fréquents sont : les saignements, les infections, les hyperglycémies, les retards de cicatrisation, les douleurs périnéales à l'injection intraveineuse de dexaméthasone (glucocorticoïdes) et les résistances aux curares (**Ho, 2010**).

### 3.5. Anti-inflammatoires naturels

En vue de la gravité des effets secondaires que présentaient les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, plusieurs études ont été menées dans le but d'obtenir des agents anti-inflammatoires avec moins d'effets indésirables. Ceci a conduit les chercheurs à s'orienter vers la médecine traditionnelle, plus essentiellement les plantes médicinales autrement appelés les anti-inflammatoires naturels qui contiennent un très vaste nombre de composés phytochimiques avec un spectre d'activité tout aussi grand (**Tableau N°03**) (**Barnes, 1998**).

**Tableau N°03 : Quelques plantes à activité anti-inflammatoire**

Plantes	Parties utilisées	Activités	Références
<i>Zygodphyllum gaetulum</i>	Plante entière	Activité anti-inflammatoire	Ait El Cadi et al., 2012
<i>Nauclea latifolia (Rubiaceae)</i>	Racines et feuilles	Activité antipyrétique et anti-inflammatoire	Amouzoun et al., 2008
<i>Morindageminata (Rubiaceae)</i>	Écorces de racines	Activité anti-inflammatoire	Boolamo et al., 2014
<i>Limoniastrum feei (Plumbaginacea)</i>	Feuilles	Anti-inflammatoire	Smahia et al., 2016
<i>Saba senegalensis (Apocynaceae)</i>	Tiges feuillées	Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante	Yougbaré-Ziébro et al., 2015

### 3.6. 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*, *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-inflammatoire 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. Quelques méthodes sont résumées dans le **tableau N°04**.

**Tableau N°04 : Quelques méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro* et *in vivo*.**

Etude	Référence
<i>In vivo</i>	
Induction d'un œdème, par l'injection de carragénine dans la patte de la souris	<b>Ouédraogo et al., 2012</b>
Les contractions abdominales produites par l'injection de l'acide acétique chez la souris.	
Induction d'un œdème en faisant chuter un poids de 50 g au-dessus de la patte gauche des rats	<b>El Hachimi et al., 2016</b>
L'accumulation des cellules de l'inflammation induite par l'injection de curdlane	<b>Maruyama et al., 2005</b>
Induction d'œdème en appliquant l'huile de coton sur l'oreille de souris	<b>Sawadogoa et al., 2008</b>
<i>In vitro</i>	
Inhibition de la dénaturation des protéines (albumine)	-Mizushima et Kobayashi, 1968 -Sakat et al., 2010 - Govindappa et al., 2011
Action inhibitrice sur les protéinases	-Oyedepo et Famurewa, 1995 -Sakat et al., 2010
Test de stabilisation des membranes d'érythrocytes via l'induction d'hémolyse des globules rouges par hypotonie et par chaleur	- Govindappa et al., 2011

### 3.6.1 Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des écorces du fruit de grenadier d'Ain Témouchent «*Punica granatum*» :

La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (Chou, 1997). C'est la raison pour laquelle les membranes des érythrocytes humains sont choisies comme modèle dans le test de stabilisation membranaire avec le but de mettre en évidence l'activité anti inflammatoire.

La stabilisation de la membrane des érythrocytes signifie la stabilisation des membranes lysosomales. C'est le processus clé et important dans la limitation de la réponse inflammatoire par l'empêchement de la libération des constituants lysosomaux de neutrophiles activés tels que les enzymes bactéricides et les protéases, qui provoquent inflammation (**Murugasan, 1981 ; Vadivu et Lakshmi, 2008**).

Certains des AINS sont connus leurs propriétés qui conduisent à la stabilisation membranaire. Ces propriétés peuvent contribuer à la puissance de leur action anti-inflammatoire (**Vadivu et Lakshmi, 2008**). 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**).

### 3.6.2 Composition et hémolyse du sang

Le sang est un tissu conjonctif fluide qui permet d'approvisionner les organes et les tissus de l'organisme en oxygène et différents nutriments essentiels, tout en protégeant l'organisme.

Le sang se compose de cellules et de plasma. Le plasma contient des protéines diverses, dont les immunoglobulines, l'albumine, les facteurs de coagulation. Les cellules du sang se divisent en trois catégories : les globules rouges qui transportent l'oxygène des poumons aux tissus et captent le gaz carbonique qui est éliminé ensuite par les voies respiratoires ; les globules blancs qui défendent l'organisme contre les agressions des microbes, bactéries et virus ; les plaquettes qui empêchent le saignement en colmatant les lésions des vaisseaux. (**Tazerout, 2008**).

Le globule rouge humain avec une forme biconcave et un diamètre moyen d'environ 8  $\mu\text{m}$  ont une durée de vie typique de 120 jours, où il circule dans le corps humain près d'un demi-million de fois (**Dao et al., 2003**). Le globule rouge a une structure relativement simple avec une membrane composée de quantités égales de lipides et de protéines (**Op den Kamp, 1979 ; Haest, 1982**) qui forment la bicouche phospholipidique renferment un fluide (cytosol) de volume fixe et de viscosité connue. Le globule rouge ne contient pas de noyau (**Bao et Suresh, 2003**). L'hémolyse de ce dernier est définie comme une rupture des globules rouges avec libération d'hémoglobine et d'autres contenus intracellulaires dans le plasma (**Glynnis Lowe et al., 2008**).

---

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par des écorces de fruits de *Punica granatum* (**Figure N°10**), récolté dans la Wilaya d'Ain Témouchent, située dans l'ouest d'Algérie. Les écorces des fruits de la plante ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées, ces dernières ont été réduites en poudre en utilisant un broyeur automatique puis soumises à l'extraction.



**Figure N°10 : Photo du matériel végétal**

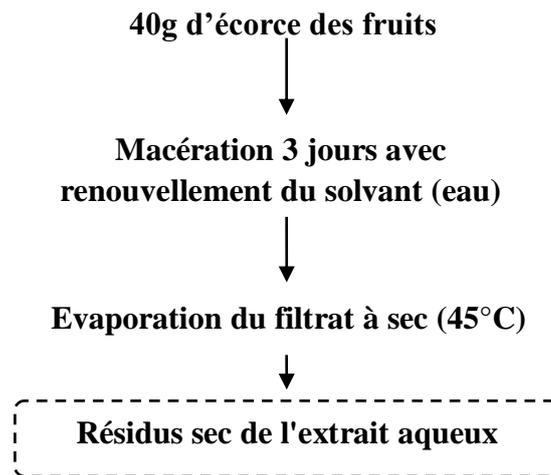
### 2. Méthodes

#### 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 écorces du fruit de la plante.

##### 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**).

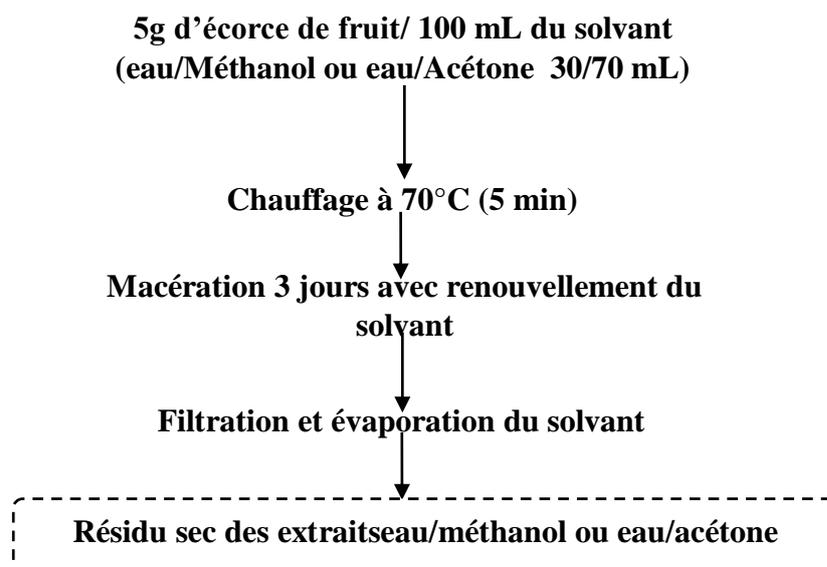


**Figure N°11:** Schéma de l'extraction aqueuse d'écorce des fruits de *Punica granatum*

### 2.1.2. Extraits bruts eau/Méthanol et eau/acétone :

Selon la méthode d'Upson et coll. (2000), 5 g de matières végétales séchées 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 rotavapeur à température 45-50°C (Figure N°12).



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

### 2.1.3. 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 avant évaporation ;

**P3**: poids de la matière végétale initial.

### 2.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits des écorces de fruits de *Punica granatum*.

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

On ajoute 3 gouttes de FeCl<sub>3</sub> 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 stéroïdes: réaction de Libermann-Burchard**

On traite 1 mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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  $\text{NH}_4\text{OH}$  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' $\text{HgCl}_2$  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 127g de  $\text{I}_2$ . 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**).

### 2.3. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes totaux

#### 2.3.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

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

#### 2.3.2. 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 ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus 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 présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

##### b- 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 de matière végétale sèche. 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)

### 2.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

#### *a- Principe*

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ). 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  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée
- Addition de 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15 %
- Laisser reposer pendant 6 minutes
- Addition de 150  $\mu\text{L}$  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 ( $\text{NaOH}$ ) 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 :

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

**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).

### **2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des écorces du fruit de *Punica granatum*.**

#### **2.4.1. Echantillons de sang humain**

Des échantillons de sang frais (environ 6 mL) ont été récupérés dans des tubes hépariné, 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.

#### **2.4.2. 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 :  $K_2HPO_4$  (8Mm) ;  $KH_2PO_4$  (2Mm) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137mM) (Mohan, 2006).

#### **2.4.3. 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 de 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).

#### **2.4.4. 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.

### 2.4.5. Evaluation de la toxicité des extraits de l'écorce des fruits de *Punica granatum* vis-à-vis des globules rouges

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits de l'écorce des fruits 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 du 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 distillé, 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 :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_t / A_c) * 100 \text{ (Shobana et Vidhya, 2016).}$$

A<sub>t</sub> : absorbance de l'échantillon (test)

A<sub>c</sub> : absorbance de control (100 % d'hémolyse)

### 2.4.6. 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 l'écorce des fruits 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

## Matériel et méthodes

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)

---

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

---

### 1. Etude phytochimique

#### 1.1. Les tests phytochimiques

Les effets thérapeutiques sont induits par divers composés chimiques tels que : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les polyterpènes, les saponosides, les stérols et les tanins catéchiques qui constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique traditionnelle des plantes étudiées (N'Guessan *et al.*, 2009).

Les approches de dépistage phytochimique décrivent et évaluent les méthodes utilisées pour la détection des classes de composés phytochimiques (Farnsworth, 1966). L'étude de la phytochimie fait l'objet d'intenses investigations pour aider à déterminer les constituants chimiques présents dans les plantes médicinales (Badiaga, 2011). La méthode choisie dans le criblage phytochimique devrait être (a) simple, (b) rapide, (c) conçue pour un minimum d'équipement, et (d) raisonnablement sélectif pour la classe de composés étudiés (Farnsworth, 1966).

Les tests phytochimiques réalisés sur nos trois extraits bruts d'écorce de grenade (*Punica granatum L.*), nous ont permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires et cela par le biais des réactions qualitatives de caractérisation comme : la formation de précipitation, l'apparition de coloration par des réactifs spécifiques, ou par un examen sous la lumière UV. Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le **tableau N°05**.

**Tableau N°05** : Les résultats de caractérisation des composants chimiques qui sont présents dans les différents extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum*.

Tests	Réaction	Extraits		
		Aqueux	Eau/Méthanol	Eau/Acétone
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++	+++
Flavonoïdes	Mg <sup>++</sup>	+++	++	++
Terpénoïdes	Chloroforme+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	-	+
Stérols	Anhydre acétique+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-
Coumarines	Fluorescence / UV	-	-	-
Alcaloïdes	Wagner	+	+	++
	Mayer	++	++	++
Quinones libres	NH <sub>4</sub> OH	++	+++	+++
Saponosides	Test de mousse	-	-	-
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	+++	+++	+++
- : Absence totale.		+ : Présence en quantité faible.		
++ : Présence en quantité moyenne.		+++ : Présence en quantité abondante.		

Nos trois extraits testés ont permis de mettre en évidence les constituants chimiques suivants : une richesse avec quantité abondante en tanins, quinones libres, flavonoïdes et composés réducteurs. Les alcaloïdes quant à eux se sont révélés présents avec une quantité moyenne à faible. Les terpénoïdes sont présents en faible quantité dans les deux extraits aqueux et eau /acétone. Cependant, on a remarqué une absence totale en stérols, coumarines et saponosides au niveau des trois extraits testés.

Nos résultats obtenus corrélerent avec les travaux de **Middha et al., 2013a** et **Jayaprakash et Sangeetha en 2015**, qui ont mis en évidence la présence des tanins et des flavonoïdes dans les écorces de fruits de *Punica granatum*. **Singh et al. en 2018** ont démontré que les composés phénoliques sont considérés comme des substances phytochimiques bénéfiques dans l'écorce de la grenade. **Li et al., (2006)** ont montré que l'extrait d'écorce était plus riche que l'extrait de pulpe en flavonoïdes.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Middha et al., en 2013a** concernant la présence des alcaloïdes et des composés réducteurs en extrait aqueux et eau /méthanol.

D'autre part, l'absence en stérols et en terpénoïdes dans l'extrait eau /méthanol est confirmée par les recherches faites par **Ouachrif et al., (2012)**. Cependant la présence en terpénoïdes et en quinones libres dans l'extrait aqueux et eau/acétone ainsi que l'absence des saponosides dans l'extrait eau/acétone ont été conclues dans les travaux antérieurs de **Jayaprakash et Sangeetha en 2015**.

Selon **Gözlekçi et al. (2011)**, les écorces de fruits de *Punica granatum L* étaient responsables de la majorité de la teneur phénolique totale de la grenade.

La différence des résultats trouvés comparée à d'autres recherches peut être due à plusieurs facteurs tel que : la variété du fruit, le statut de maturité et le traitement après la récolte, la nature du solvant, le lieu géographique, la période de récolte et aussi la méthode d'extraction qui peuvent contribuer à cette différence.

### 1.2. Les rendements en extraits secs

Nos trois extraits bruts dont l'aspect physique est sous forme de poudre et de couleur marron sont obtenus après une macération en utilisant trois solvants de polarité différente.

Les rendements ont été calculés et les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau N°06**.

**Tableau N°06:** Les résultats du rendement d'extraction des écorces de fruits de *Punica granatum*

Échantillon	Méthode	Solvant	M échantillon (g)	M extrait (g)	Rdt( %)
Écorce	Macération	Eau distillée	40	11.96	29.9%
		Méthanol 70%	5	1.8	36%
		Acétone 70 %	5	2	40%

Avec :

**M extrait** = Masse de l'extrait en gramme.

**M échantillon** = Masse de l'échantillon en gramme.

Dans notre étude, les résultats des rendements en extraits obtenus d'écorce de fruit de *Punica granatum L* varient de 29.9% à 40%. Le solvant eau / acétone correspond au meilleur rendement obtenu avec un pourcentage de l'ordre de 40% suivie par l'extrait eau/méthanol avec une teneur de 36%, tandis que l'extrait aqueux a abouti à l'obtention du plus faible rendement estimé à 29.9%.

Ces résultats traduisent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. En général, les composés phénoliques des plantes sont des composés polaires, qui sont généralement extraits avec des solvants polaires tels que l'acétone et le méthanol (Kylli, 2010 ; Wissam et al., 2012), puisque la solubilité des polyphénols est principalement affectée par la polarité des solvants utilisés (Wissam et al., 2012).

Nous remarquons aussi que les solvants mixtes caractérisent les plus hauts rendements. Ce résultat est confirmé dans une étude faite par Bourgou et al., en 2016 qui a démontré l'effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*.

Le rendement de l'extrait eau/acétone qui représente le plus haut rendement corréle avec une étude réalisée par Mirad en 2013.

La technique d'extraction par solvant en raison de son efficacité, de sa facilité d'utilisation et de sa large applicabilité est la plus couramment utilisée comme procédure de préparation d'extraits à partir des plantes. Cependant, le rendement de l'extraction au solvant dépend de divers facteurs y compris le type de solvants avec ces polarités variables, le temps et la

## Résultats et discussion

température d'extraction, la composition chimiques de la partie de la grenade utilisée comme échantillon (Sood & Gupta, 2015), ainsi que l'influence du pH, l'influence du nombre d'extraction, l'influence de la température de stockage et de la procédure d'extraction choisie (Wissam et al., 2012).

### 2. Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes

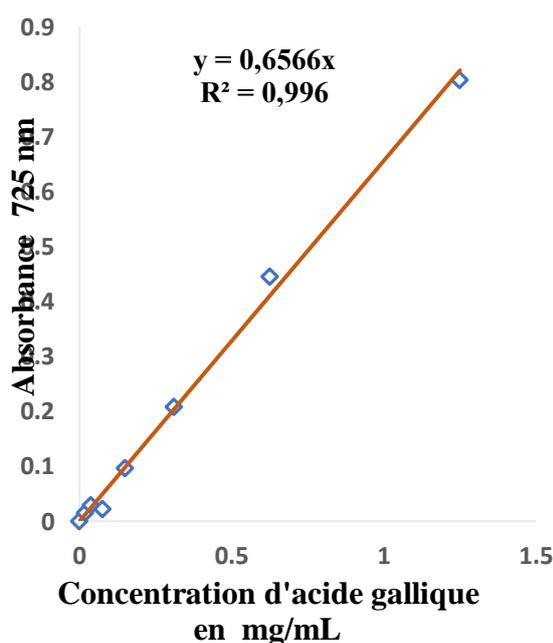
#### 2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des polyphénols totaux est une analyse quantitative effectuée dans le but de confirmer les résultats obtenus lors des tests phytochimiques. Ces derniers ont montré que les écorces de fruit de *Punica granatum L* contiennent une grande quantité de polyphénols et de tanins.

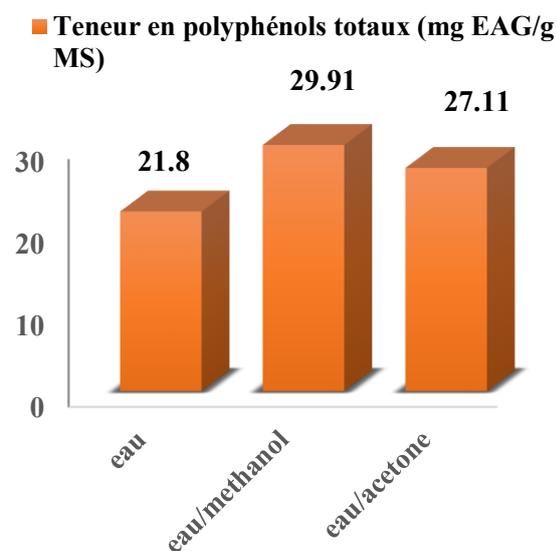
La teneur en polyphénols dans nos trois extraits (aqueux, eau/méthanol, eau/acétone) a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec différentes concentrations (0,018-0,037-0,075-0,15-0,31-0,625-1,25 mg/mL) d'une solution standard d'acide gallique.

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°13.

Les résultats de la teneur en polyphénols de nos trois extraits obtenus à partir de l'équation de la régression linéaire de notre courbe d'étalonnage sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique (mg EAG) par g d'extrait, après une analyse quantitative par spectrophotomètre en utilisant la méthode du Folin-Ciocalteu (Figure N°14).



**Figure N°13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**



**Figure N°14 : Teneur en polyphénols totaux (TPT) dans les différents extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum L***

Les résultats obtenus montrent que nos trois extraits préparés avec les différents solvants possèdent des composés phénoliques, mais que ces derniers sont à des concentrations plutôt variables.

L'extrait eau /méthanol présente la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux avec un taux de l'ordre de 29,91 mg EAG /g suivie par l'extrait eau/acétone avec une teneur estimée à 27,11mg EAG /g .Tandis que l'extrait aqueux a révélé la teneur la plus faible en composés phénoliques équivalente à 21,8 mg EAG /g .

Nos résultats enregistrés concordent avec l'étude **d'Elfalleh et al.,( 2012)**, dont les résultats ont montré que les teneurs en composés phénoliques variaient selon les parties de la plante et aussi selon le solvant d'extraction utilisé et qu'avec le méthanol ils ont obtenu les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux. Ce résultat concorde avec les travaux **d'Arash Mahboubi et ses collaborateurs en 2015**, qui confirment que l'extrait méthanolique représentent la teneur en polyphénols la plus élevée.

En **1996**, les travaux antérieurs de **Ben Nasr** ont révélé que les polyphénols totaux dans l'extrait d'écorce de la grenade est égale à  $216,9 \pm 7.3$  (mg GAE/g). Cette teneur élevée est due à la contenance des écorces d'une quantité importante de polyphénols tels que l'acide ellagique, les ellagitanins et les acides galliques (**Nasr et al., 1996**). Les travaux **de Li en 2006** montrent que la fraction d'écorce de la grenade a une teneur en phénols totaux de l'ordre de 249,4 mg / g et qui est plus élevée que la fraction de pulpe (**Li et al., 2006**).

Le total du polyphénols dans cette dernière étude est plus élevé que celui obtenu dans notre étude ce qui peut être expliqué par la différence du solvant utilisé mais aussi à l'exposition des échantillons au soleil. Les résultats obtenus par **Nasr et al., en 1996** durant la même étude et qui se porte en faveur d'une biosynthèse différenciée des phénols totaux selon les motifs d'éclairage auxquels les fruits sont exposés , dont l'écorce à l'ombre a une teneur de l'ordre de  $176.7 \pm 1.2$  (mg EHHDP-G/g) et l'écorce exposée au soleil présente une teneur de  $85.8 \pm 2.7$  (mg EHHDP-G/g).

**Amol et al., en 2011**, ont mené une étude sur l'effet de l'irradiation gamma sur la teneur totale en phénols et l'activité antioxydante *in vitro* des écorces de grenade et ils ont montré qu'immédiatement, après l'irradiation (0 jour), il y a eu une augmentation significative du contenu phénolique total. D'autre part, l'étude faite par **Yasoubi et ses collaborateurs en 2007**, a montré que l'acétone avec sonication produisait la quantité maximale de composés phénoliques à partir d'extraits d'écorce de grenade.

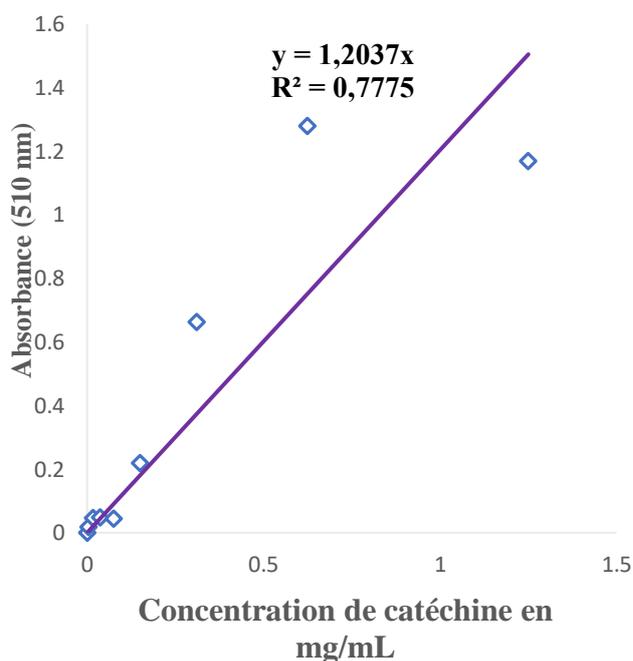
### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

Tout comme le dosage des polyphénols totaux, celui des flavonoïdes totaux reste une analyse quantitative effectuée dans le but de confirmer la présence des flavonoïdes détectés lors des tests phytochimiques.

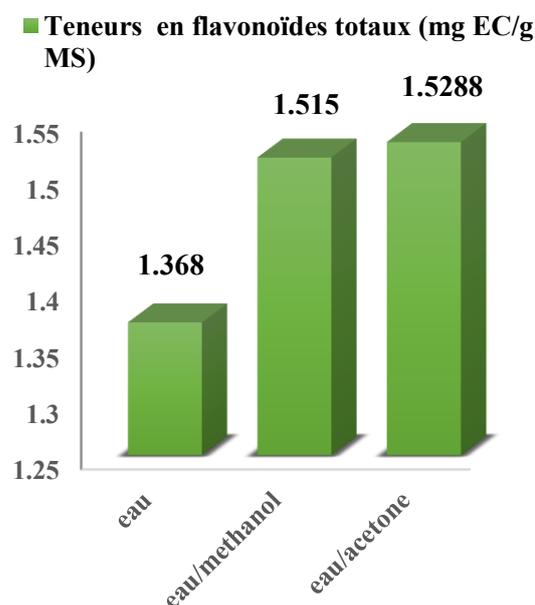
La teneur en flavonoïdes dans nos trois extraits a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage élaborée avec différentes concentrations (0.0045, 0.018, 0.037, 0.075, 0.15, 0.31, 0.625, 1.25 mg/mL) d'une solution standard de catéchine.

Notre courbe d'étalonnage comprend une équation de la régression linéaire ( $y = 1,2037x$ ) et un coefficient de corrélation de ( $R^2 = 0,7775$ ) qui sont reportés sur **la figure N°15**.

Les résultats de la teneur en flavonoïdes de nos trois extraits obtenus à partir de l'équation de la régression linéaire de notre courbe d'étalonnage sont exprimés en mg équivalents catéchine (mg EC) par g d'extrait, après une analyse quantitative par spectrophotomètre par la méthode au trichlorure d'aluminium (**Figure N°16**).



**Figure N°15:** Courbe d'étalonnage de la catéchine



**Figure N°16:** Teneur en flavonoïdes totaux (FVT) dans les différents extraits d'écorce de *Punica granatum L*

Les résultats obtenus durant notre étude ont révélé la présence des flavonoïdes dans les trois extraits testés mais avec des concentrations différentes.

L'extrait eau /acétone et eau/ méthanol présentent les teneurs les plus élevées en flavonoïdes totaux avec des taux de l'ordre de 1,5288 mg EC /g et de 1,515 mg EC /g respectivement, suivie par l'extrait aqueux avec une teneur plus faible estimée à 1,368 mg EC /g.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus dans l'étude faite par **Middha et al., en 2013b** et qui ont trouvé que la teneur en flavonoïdes totaux était plus faible dans l'extrait aqueux que celle dans l'extrait méthanolique avec des taux de l'ordre de 23,05 et 49,8 équivalent quercétine /g respectivement. Nos résultats obtenus sont soutenus par les résultats d'une étude faite par **Al-Rawahi et al., en 2014** concernant les composants phénoliques des écorces de grenade (*Punica granatum L.*) cultivées à Oman où l'extrait d'écorce présentait des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes totaux, estimées à 64,2 mg de GAE / g de MVS et 1,4 mgCE / g de MVS, respectivement. Les flavonoïdes représentaient une petite quantité de composés phénoliques totaux dans l'extrait d'écorce de grenade(**Al-Rawahi et al., 2014**).

Les travaux antérieurs faits en **2011** sur la comparaison de l'activité antioxydante et de la teneur totale en flavonoïdes des cultivateurs de grenade perse (*Punica granatum L.*) ont montré que la teneur en flavonoïdes dans les extraits d'écorce variait de  $18,61 \pm 0,53$  à  $36,40 \pm 1,34$  mg d'équivalents de catéchine par gramme d'extrait et qu'elle était plus élevée que la teneur en flavonoïdes trouvés dans l'extrait de pulpe qui variait de  $0,84 \pm 0,08$  à  $2,14 \pm 0,11$  mg d'équivalents de catéchine par gramme d'extrait (**Ardekani et al., 2011**).

Cependant, cette variation en taux de flavonoïdes totaux pourrait être associée à la différence entre les cultivateurs, les méthodes d'extraction et les conditions environnementales telles que l'humidité relative et la température de préparation des extraits(**Al-Rawahi et al., 2014**).

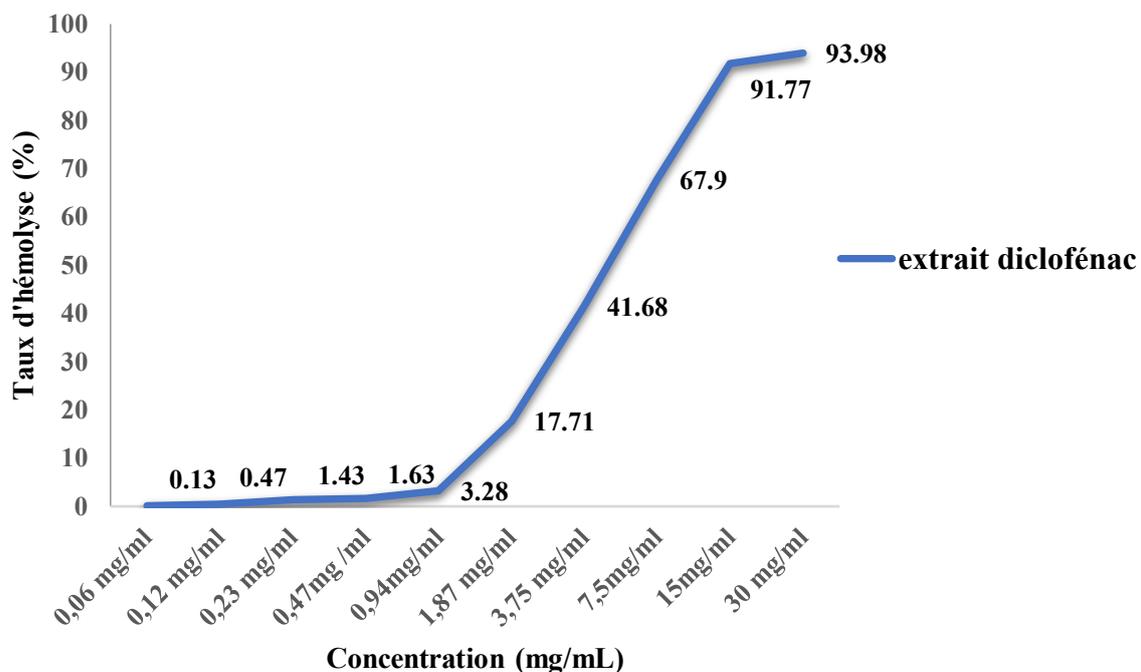
Les résultats globaux ont montré que les extraits d'écorce de grenade ont à la fois des propriétés antioxydantes et antimutagènes car ils sont une source importante de composés phénoliques, flavonoïdes et tanins; et peuvent être exploités comme bio-préservateurs dans les applications alimentaires et les nutraceutiques (**Negi et al., 2003; Viuda-martos et al., 2013**).

### 3. Evaluation de la toxicité des extraits des écorces de fruits de *Punica granatum L.* vis-à-vis des globules rouges :

Pendant des milliers d'années, la grenade a été largement consommée par des personnes dans différentes cultures. Elle est généralement considérée comme sûr et sans incident indésirable. Cependant, une certaine toxicité est connue et reste encore à être découverte (Lansky & Newman, 2007).

Afin d'étudier la cytotoxicité dans notre présente étude, les globules rouges humains ont été choisis comme modèle de la cellule animale *in vitro*.

Les résultats obtenus à partir des tests de cytotoxicité effectués sont représentés sur les figures N°17 et N°18, et qui montrent une évolution en pourcentage d'hémolyse des globules rouges en fonction des concentrations du diclofenac et des différents extraits testés d'écorce de fruit *Punica granatum*.



**Figures N°17 : Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction des différentes concentrations d'extraits de diclofenac.**

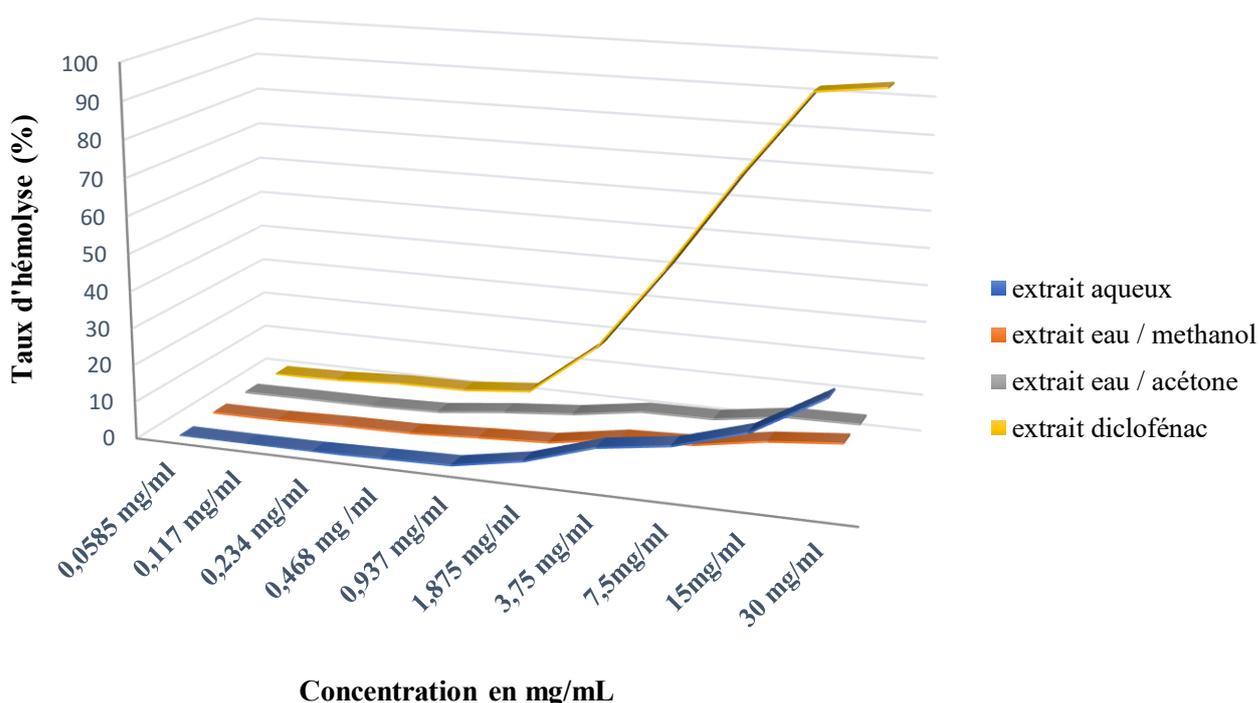
Nos résultats obtenus révèlent qu'après le traitement des globules rouges par les différentes concentrations en anti-inflammatoire de référence 'le diclofenac', une augmentation en pourcentage d'hémolyse est notée.

17,71 % est le taux d'hémolyse obtenu après le traitement avec une concentration de 1,87 mg/mL de diclofenac. Ce dernier représente le début des effets hémolytiques significatifs

## Résultats et discussion

qui continuent d'augmenter jusqu'à atteindre un taux maximum de 93,98% à une concentration de 30mg/mL.

Pour nos trois extraits, les résultats retenus après l'évaluation de leur toxicité sont mises en comparaison avec le diclofenac qui est la molécule de référence dans notre étude. Nous remarquons que les taux de toxicité obtenus dans les trois extraits sont bien inférieurs par rapport à ceux du diclofenac. Les résultats sont résumés dans **la figure N°18**.



**Figures N°18** : Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction des différentes concentrations d'extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum L* et du diclofenac.

La figure N°18 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 écorces de *Punica granatum* 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.

Nous remarquons que les taux d'hémolyse obtenus dans l'extrait aqueux augmentent en fonction des concentrations d'extrait utilisé pour le traitement des globules rouges humains.

Nous constatons que l'hémolyse ne dépasse pas les 30 % même à des concentrations élevées qui ont causé des hémolyses dépassant les 50 % des globules rouges après le traitement par le diclofenac.

Le taux d'hémolyse maximum atteint après le traitement des érythrocytes par 30 mg /mL d'extrait aqueux est de l'ordre de 29,55 % et qui reste inférieur à celui de l'hémolyse total (100%) obtenue par le contrôle.

L'extrait eau /méthanol et eau /acétone, ont montré des taux d'hémolyse qui augmente en fonction de l'élévation des concentrations en extraits. Cependant, ces taux ne dépassent pas 15% d'hémolyse même après utilisation des concentrations élevées tels que : 7.5, 15 et 30 mg/mL pour les deux extraits et qui reste inférieur à 100% d'hémolyse obtenus par le contrôle.

Si on classe nos extraits testés selon leur toxicité à la concentration de 30mg/mL par rapport au diclofenac, on obtiendra l'ordre suivant: diclofenac>extrait aqueux>extrait eau/méthanol.> extrait eau/acétone.

Comme le but de notre étude est l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des écorces de grenades, il s'est révélé important de vérifier d'abord si nos échantillons contiennent une certaine toxicité qui peut réduire ou empêcher totalement leurs utilisations. Pour cela, les globules rouges humain ont été choisis comme modèle d'évaluation durant notre étude.

Ce choix est justifié par le fait que les membranes des globules rouges humain sont considérées comme similaires aux composants de la membrane lysosomale qui pendant l'inflammation, ces enzymes et les composants hydrolytiques sont libérés vers l'espace extracellulaire, ce qui provoque des dommages (**Ackerman & Beebe, 1974; Hossain et al., 2014**). Ainsi, la présence d'une toxicité au niveau de l'échantillon testé est traduite par une hémolyse résultant de la lyse de la membrane des érythrocytes.

Les résultats obtenus à partir des trois extraits testés d'écorce de grenadier '*Punica granatum*' ont révélé la présence d'un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 30%. Ce taux reste inférieur au taux d'hémolyse obtenu durant une étude faite par **Kota et al., en 2018** portant sur la validation scientifique de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique de *Punica granatum L* par la technique de la stabilisation de la membrane des globules rouges humains.

Des travaux antérieurs faites par **Hasan et ses collaborateurs en 2016** sur le rôle protecteur d'un extrait aqueux d'écorce de *Punica granatum* sur le plomb qui induit l'anémie chez les rats a révélé des résultats inattendus selon lesquels les rats traités par l'extrait aqueux de grenade ont montré une diminution significative ( $P < 0,05$ ) des globules rouges.

Ces faibles taux de toxicité obtenus dans notre présente étude sont soupçonnés être due à certains métabolites secondaires présents dans nos extrait d'écorce de grenadier tels que les tanins, les alcaloïdes ou certains formes de flavonoïdes. Ceci est confirmé par l'étude de **Segura et al., 1990** qui démontrent que certaines parties des plantes ont des effets toxiques sur diverses espèces animales. Ce résultat est soutenu par **Vidal et al., en 2003**, qui ont trouvé que l'extrait hydro-alcoolique préparé à partir de fruits entiers (y compris les écorces) s'est révélé être toxique à cause de la présence des alcaloïdes et de d'autres composés pouvant être toxiques.

D'autres travaux ont révélé que le groupe de rats traités par l'extrait aqueux d'écorce de grenade a montré une augmentation très significative des éosinophiles par rapport aux autres groupes. Ce résultat est cohérent avec les résultats de **Valadares et al., (2010) et hasan et al., (2016)** qui ont mentionné que des effets toxiques sont attribués à la consommation de grenade, y compris des réactions allergiques.

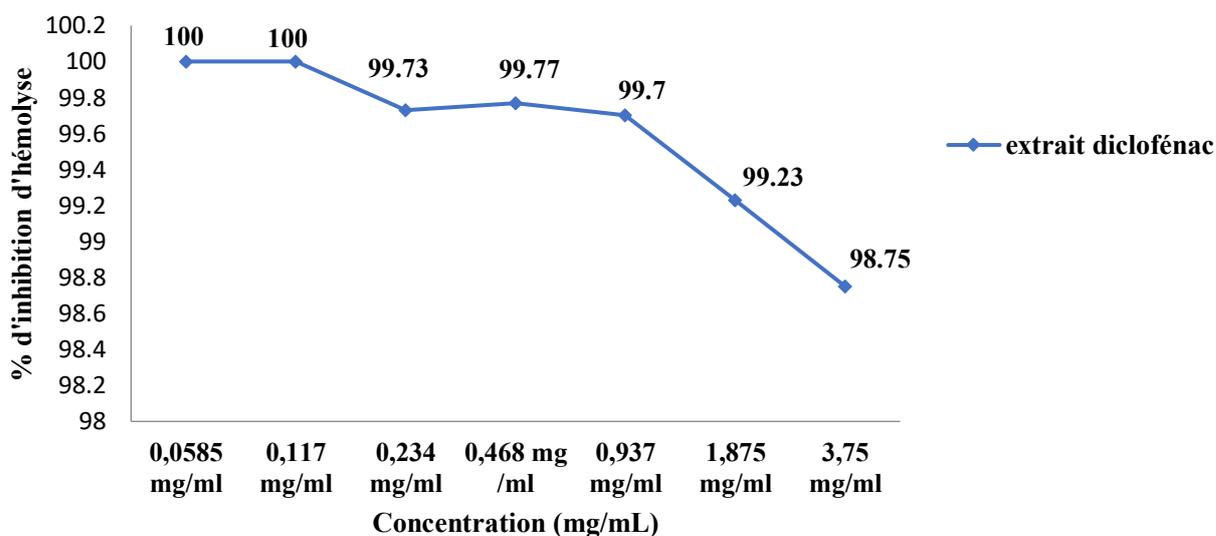
Cependant, il existe bien des études qui n'ont pas révélé de toxicité comme celle de **Jahromi et al., 2015** qui ont trouvé que les extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum* n'ont provoqué aucune toxicité chez les souris et leurs utilisations sont suggérés avec des applications potentielles contre les maladies. Cette étude va dans le même sens que celle de **Khalil en 2004**, qui a travaillé sur l'effet antidiabétique d'un extrait aqueux de pelures de grenade chez des rats normaux et diabétiques par alloxanes qui une fois traités avec de l'extrait d'écorce de grenade leurs globules rouges et l'hémoglobine ont augmenté de manière significative en raison de la propriété hémostatique d'écorce de grenade.

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

Plusieurs essais *in vitro* et *in vivo* réussis ont indiqué que l'extrait d'écorce de grenade est un moyen de traitement très efficace contre les troubles inflammatoires (**Ismail et al., 2012**). C'est sur cette base que c'est fondue notre étude dont le but est d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire que peut avoir nos extraits testés (aqueux, eau/méthanol, eau /acétone) d'écorce

de grenade '*Punica granatum L*' de la région d'Ain Témouchent *in vitro* sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.

Le test effectué se base sur l'effet protecteur des différentes concentrations choisies d'extraits de *Punica granatum L* sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée. Les résultats obtenus sont résumés sur **la figure N°20**.

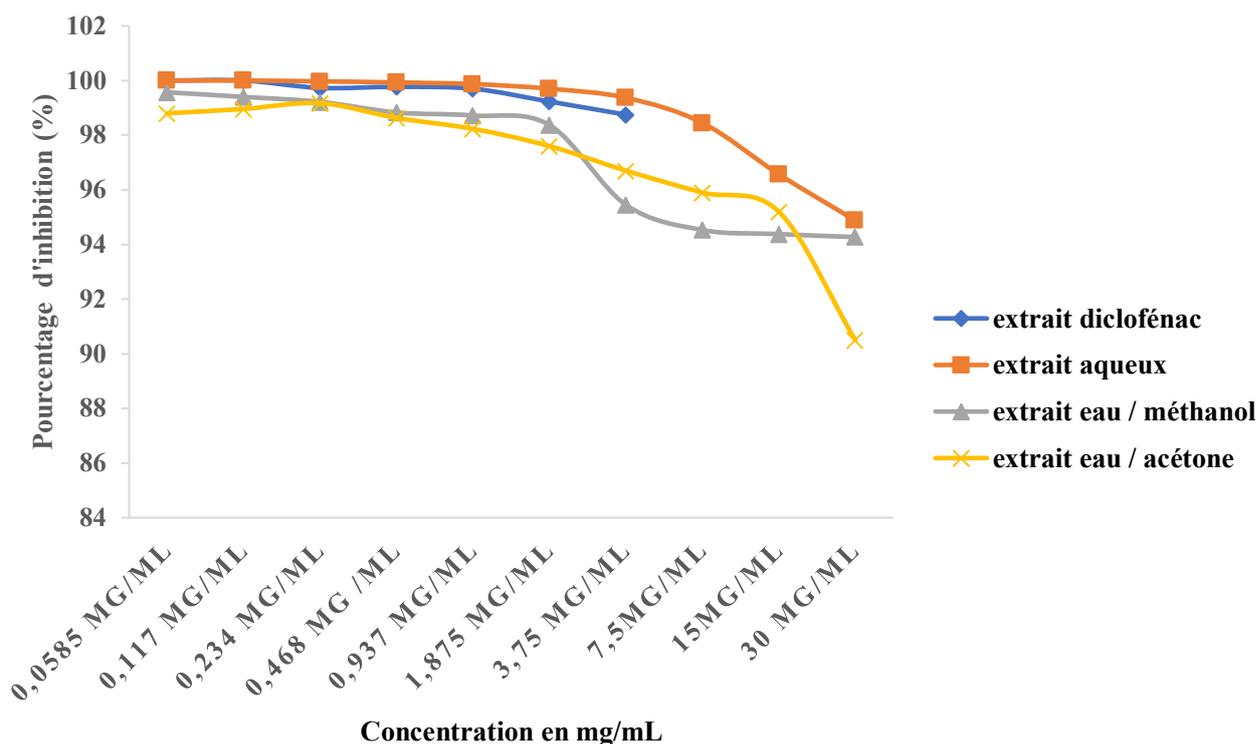


**Figure N°19:** Pourcentage d'inhibition (%) d'hémolyse des globules rouge en fonction des différentes concentrations de diclofenac.

Pour l'anti-inflammatoire de référence : le diclofenac, les concentrations choisies pour l'évaluation de leur effet anti-inflammatoire sont celle qui ont permis d'obtenir moins de 45% de toxicité à savoir : 0.0585 /0,117/0,234/ 0,468 /0,937 /1,875 et 3,75 mg/mL.

D'après les résultats obtenus et illustrés dans **la figure N°19**, nous constatons que le pourcentage d'inhibition diminue en parallèle avec l'augmentation de la concentration des extraits. Cependant, ce pouvoir anti-inflammatoire garde des pourcentages de protection bien élevé estimés à 98.75 % et à 100%.

Le maximum de protection 100 % est obtenus dès le traitement des globules rouges par la plus faible des concentrations testés à savoir 0.0585 mg /mL d'extrait de diclofenac.



**Figures N°20:** Pourcentage d'inhibition (%) d'hémolyse des globules rouge en fonction des différentes concentrations d'extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum L* et du diclofenac.

D'après la **figure N°18**, nous remarquons que toutes les concentrations testées ont révélé une toxicité inférieure à 30%, ce qui permet leurs usages sans crainte d'hémolyse.

Les résultats obtenus dans la **figure N°20**, après le traitement des globules rouges par différentes concentrations d'extrait d'écorce *Punica granatum L* ont permis de constater une diminution en pourcentage d'inhibition en fonction d'une augmentation des concentrations des trois extraits testés. Cependant, ces trois extraits gardent des pourcentages de protection bien élevés et comprises entre 90 % et 100%.

Pour l'extrait aqueux, les résultats enregistrés indiquent un pourcentage d'inhibition de 100% aux concentrations 0.0585 mg/mL et 0.1117 mg/mL. Tandis que pour l'extrait eau/méthanol le maximum de protection est de l'ordre de 99.57 % à la concentration de 0,0585mg/mL et le minimum de protection atteint un pourcentage de 94.27 % et ceci à 30 mg/mL.

L'extrait eau /acétone a pu permettre d'obtenir une inhibition maximale de 99.17% à la concentration de 0.234 mg/mL et qui diminue jusqu'à 90.5 % à la concentration 30mg/mL. D'après les résultats enregistrés, nous remarquons que l'activité anti-inflammatoire des extraits testés dépend de leur concentration.

Les résultats révèlent que les extraits d'écorce de grenades *Punica granatum L* exercent un effet anti-inflammatoire comparable, à celui de la molécule de référence Diclofenac® ce qui rend possible son utilisation comme un traitement alternatif dans la prévention de l'inflammation.

Comme déjà cité pendant le processus de l'inflammation, les enzymes lysosomales et les composants hydrolytiques sont libérés vers l'espace extracellulaire, ce qui provoque des dommages aux organites, aux tissus environnants et aident également à provoquer une variété de troubles (Ackerman & Beebe, 1974 ; Hossain et al., 2014).

Comme la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale, sa stabilisation implique que les extraits testés peuvent aussi bien stabiliser les membranes lysosomales (Gautam et al., 2013). L'exposition des globules rouges à des substances nocives telles que le milieu hypotonique et la chaleur, entraînent la lyse des membranes (Ferrali et al., 1992; Hossain et al., 2014). L'inhibition de l'hypotonie et de la lyse des membranes des globules rouges induite par la chaleur ont été donc prises comme mesure du mécanisme de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de plante dans notre étude.

Le diclofenac étant un AINS est utilisé comme molécule de référence puisqu'il a été constaté que les AINS agissent soit en inhibant ces enzymes lysosomales soit en stabilisant les membranes lysosomales et donc les membranes des globules rouges humaine (Hossain et al., 2014) .

Nos résultats obtenus ont confirmé l'effet protecteur de nos trois extraits d'écorce de grenade vis-à-vis de la stabilisation de la membrane des globules rouges humaine contre l'hémolyse induite par la solution hypotonique et la chaleur. Cet effet protecteur concorde avec les résultats d'une étude faite par Karunakar Kota et al., en 2018 sur les hématies humaine (Kota et al., 2018) .

Cette protection des cellules générées est due à un mode d'action exercé par les extraits et des anti-inflammatoires standards. Ce mode d'action est soupçonné d'être selon une étude faite par Hossain et al. en 2014, due à la liaison des extraits ou des anti-inflammatoires aux membranes érythrocytaires avec une altération conséquente des charges de surface des cellules qui aurait pu empêcher une interaction physique avec des agents d'agrégation ou favoriser la dispersion par répulsion mutuelle des charges comme celles qui sont impliquées dans l'hémolyse des globules rouges. Ce résultat concorde avec celui de Sandhya et al., 2010, qui ont prouvé que certains composants chimiques présents dans les extraits peuvent avoir le

même mécanisme. Comme le tanin et les saponines qui ont la capacité de se lier aux cations et autres biomolécules, et par conséquent, de stabiliser la membrane érythrocytaire (**Hossain et al. en 2014.**)

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire d'écorce de grenadier *Punica granatum L* est une technique de recherche qui a été réalisé sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de ces études ont contribué à plus de confirmation et de spécificité sur le mode d'action des composés chimiques présents dans les extraits vis-à-vis de l'inflammation. Des études *in vitro* et *in vivo* réalisés sur des animaux de laboratoire ont montré que les flavonoïdes exercent des effets stabilisants largement les lysosomes (**Hossain et al., 2014; Van Caneghem, 1972.**)

Les résultats obtenus par **Romier et al., en 2008**, ont montré que les polyphénols peuvent moduler l'activation de NF-κB en agissant sur un événement commun à la cytokine dans les cellules Caco-2 intestinales humaines.

Cette action de réduction de l'activité des cytokines a aussi été remarquée chez les patients atteints de parodontite une forme d'inflammation buccale qui plusieurs mois après le traitement par l'extrait d'écorce de grenade, une réduction des cytokines inflammatoires (IL-1beta et IL-6) a été constaté (**Sastravaha et al., 2005**). **Amer et al., en 2015** ont trouvé que l'extrait de grenade avait une grande influence sur les ARNm des cytokines inflammatoires contribuant à une réduction d'inflammation chez des souris infectées par *E. papillata*.

D'autre études ont conclu que la punicalagine (PCG) qui est un composant anti-inflammatoire isolé du fruit de *Punica granatum* était responsable d'inhibition de l'expression des protéines pro-inflammatoires (**Lee et al., 2008**) et que les quatre tanins hydrolysables de l'extrait eau/acétone à savoir : punicalin , strictinin A , granatin B ainsi que punicalagin, ont non seulement affiché les meilleures capacités inhibitrices de NO dans le RAW 264.7 induit par le LPS, mais ont également provoqués des inhibitions de PGE2 dans les essais *in vitro* et *in vivo* (**Lee et al., 2010**).

Selon l'étude de **Bachoual et al., en 2011**, l'extrait aqueux d'écorce de *Punica granatum* serait capable d'inhiber l'activité des neutrophiles MPO et d'atténuer l'inflammation pulmonaire induite par le lipopolysaccharide chez la souris. L'inhibition de l'activité MPO par la PGE pourrait expliquer son action anti-inflammatoire.

Des travaux antérieurs portant sur l'activité anti-inflammatoire des extraits d'écorce de *Punica granatum L*. (Grenade) appliqués localement sur la peau *ex vivo* ont démontré que ces

extraits exercent un effet anti-inflammatoire significatif sur l'expression de COX-2 dans la peau. Indirectement, ce résultat confirme que PRE en particulier la punicalagine pénètre dans la peau et module la régulation de la COX-2 dans l'épiderme viable(**Houston et al., 2017**).

La quantité de résultats scientifiques convaincantes concernant les avantages thérapeutiques de la grenade et de ses fractions a construit un consensus scientifique selon lequel l'extrait d'écorce de grenade a la capacité d'inhiber l'inflammation et les allergies (**Panichayupakaranant et al., 2010**).

---

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

---

## Conclusion générale

L'inflammation chronique est reconnue être, durant ces dernières décennies, comme le principal facteur de risque pouvant conduire à une progression pathologique des maladies chroniques. Pour cela, la réduction de la réponse inflammatoire chronique semble être une stratégie permettant de lutter contre ces maladies chroniques.

Depuis l'Antiquité, les troubles inflammatoires ont été traités par des composés anti-inflammatoires naturels à base de plante, qui offrent l'avantage d'effet secondaire moindre au contraire des agents anti-inflammatoires synthétique, bien que très efficaces, possèdent des effets secondaires indésirables importants.

L'utilisation potentielle d'extrait d'écorce de grenade comme antibactériens, anti-inflammatoires et antiallergiques est soutenue par plusieurs études. Afin de justifier son utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle, nous nous sommes intéressées dans notre présent travail à l'étude des composés bioactifs présents dans les extraits d'écorce de fruit de *Punica granatum L* ainsi que la caractérisation de leurs propriétés anti-inflammatoires.

Durant cette étude, nous avons réalisé une analyse phytochimique qualitative ainsi que quantitative montrant une teneur considérable en polyphénols et flavonoïdes dans les trois extraits testés (eau, eau /méthanol, eau /acétone) d'écorce de fruit de *Punica granatum*.

Les rendements d'extraction obtenus varient selon la polarité des solvants utilisés et ont permis d'obtenir des rendements élevés de l'ordre de 36 % et 40 % pour les extraits eau /méthanol et eau/acétone respectivement suivie par l'extrait aqueux avec un rendement estimé à 29.9%.

Avant d'évaluer l'activité anti-inflammatoire, une étude toxicologique est mise en point sur des modèles de globules rouges humaine, afin de limiter les effets indésirables de nos échantillons pour une meilleure utilisation de leurs bienfaits. Les résultats obtenus indiquent que nos trois extrait possèdent une toxicité très faible et inférieure à 30 %, ce qui les rends apte à être testés.

L'activité anti-inflammatoire de nos trois extraits d'écorce de *Punica granatum* a été évaluée selon la méthode spectrophotométrique de stabilisation des érythrocytes, *in vitro*, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée, en présence des différentes concentrations des extraits d'écorce de grenade ainsi que d'une molécule de référence : le diclofenac. Les résultats obtenus montrent que nos trois extraits possèdent des capacités anti-inflammatoire importante allant de 90 à 100 % et comparable à l'effet protecteur de la molécule de référence à savoir le diclofenac. Ceci rend possible leurs utilisation comme un traitement alternatif dans la prévention de l'inflammation.

## Conclusion générale

Cet effet protecteur est soupçonné d'être due aux composés actifs présents dans les extraits et qui méritent des études plus approfondies par le biais :

- De différentes extractions réalisées en modifiant à chaque fois un des paramètres influençant le résultat d'extraction (le temps, le solvant, la méthode, la température d'extraction ...)
- D'une extraction sélectif des composés chimiques présents dans la poudre d'écorce de fruit de *Punica granatum* ainsi que leurs isoléments en utilisant plusieurs techniques plus fines tels que CCM et HPLC.
- D'une étude de la toxicité des différents composés chimiques *in vivo* sur des modèles animaux.
- De l'évaluation de leurs capacités anti-inflammatoires sur d'autre modèle *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une identification de leurs mécanismes et site d'action spécifique envers la réponse inflammatoire.
- Enfin, des études précliniques et cliniques dans le but du développement de médicaments anti-inflammatoires.

---

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Ackerman, N. R., & Beebe, J. R. (1974).** Release of lysosomal enzymes by alveolar mononuclear cells. *Nature*, 247(5441), 475–477.
- Adriouch, S., Kesse-Guyot, E., Hercberg, S., Touvier, M., & Fezeu, L. K. (2017).** Association entre les apports en polyphénols et le risque de maladies cardiovasculaires : Résultats d’une étude prospective sur 84 000 adultes français. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(3), 238.
- Aharoni, A., & Galili, G. (2011).** Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 239–244.
- Ait El Cadi, M., Makram, S., Ansar, M., Khabbal, Y., Alaoui, K., Faouzi, M. A., Cherrah, Y., & Taoufik, J. (2012).** Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 70(2), 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2011.11.004>
- Alain, K. Y., Cokou, A. D. P., Diane, B., Reine, B. S., Alain, A. G., Felicien, A., & Dominique, S. C. K. (2018).** Métabolites secondaires et activités biologiques des extraits de l’écorce de tronc de *Khaya senegalensis*, une plante à usage vétérinaire récoltée au Bénin [Secondary metabolites and biological activities of the trunk bark extracts of *Khaya senegalensis*, a veterinary plant harvested in Benin]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 23(4), 441–450.
- Al-Rawahi, A. S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A. S., & Rahman, M. S. (2014).** Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum* L.) cultivated in Oman. *European Journal of Medicinal Plants*, 315–331.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000).** Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 183-188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00625-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00625-7)
- Amer, O. S., Dkhil, M. A., Hikal, W. M., & Al-Quraishy, S. (2015).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of pomegranate (*Punica granatum*) on *Eimeria papillata*-induced infection in mice. *BioMed research international*, 2015.
- Amol B, M., Kalpana, K., & Smita S, L. (2011).** Effect of gamma irradiation on total phenolic content and in vitro antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels. *Food and Nutrition Sciences*, 2011.
- Amorin, A. (1995).** Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L. *Revista Brasileira de Farmacia*, 74, 110-111.

- Amouzoun, L. A.-L., Agbonon, A., Ekl-Gadegbeku, K., Aklikokou, K., & Gbéassor, M. (2008).** Activités antipyrétique et anti-inflammatoire d'extraits hydro-alcooliques des racines et feuilles de *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) chez le rat Wistar. *Phytothérapie*, 6(4), 228. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0323-1>
- Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A. M., Gholam, N., & Moridi, T. (2011).** Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(3), 519.
- Artik, N., Murakami, H., & Mori, T. (1998).** *Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC*. 8, 492–499.
- Asehnoune, K., & Édouard, A. (2006).** Réponse inflammatoire et polytraumatisme : Mise au point. *Réanimation*, 15(7), 568-575. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.10.011>
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., & Coppolino, M. F. (2012).** *Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://doi.org/info:doi/10.2174/187152312803476255>
- Bachoual, R., Talmoudi, W., Boussetta, T., Braut, F., & El-Benna, J. (2011).** An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1224–1228.
- Badiaga, M. (2011).** *Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali [PhD Thesis].
- Balkwill, F., & Coussens, L. M. (2004).** An inflammatory link. *Nature*, 431(7007), 405–406.
- Bao, G., & Suresh, S. (2003).** Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2(11), 715-725. <https://doi.org/10.1038/nmat1001>
- Barathikannan, K., Venkatadri, B., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., Agastian, P., Arasu, M. V., Choi, H. S., & Kim, Y. O. (2016).** Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1237-3>
- Barnes, P. J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : Molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557–572.
- Barton, G. M. (2008).** A calculated response : Control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413-420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>

- Basu, A., & Penugonda, K. (2009).** Pomegranate juice : A heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67(1), 49-56. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00133.x>
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., & Shahimi, M. (2017).** Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>
- Bensakhria, A. (2018).** *Les Plantes Toxiques*.
- Bjarnason, I., & Hayllar, J. (1993).** Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology*, 104(6), 1832–1847.
- Blaut, Schoefer, & Braune. (2003).** Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(2), 79–87.
- Bohlmann, J., & Keeling, C. I. (2008).** Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54(4), 656-669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x>
- Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*, 79–82.
- Boolamou, B. N., Lapo, A. R., Camara, K. P., Assane, M., Bassene, E., & Samb, A. (2014).** Activité anti-inflammatoire du décocté aqueux des écorces de racines de *Morinda geminata* DC (Rubiaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(4), 1871-1875. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i4.46>
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., & Bainton, D. F. (1993).** Human neutrophil granules and secretory vesicles. *European Journal of Haematology*, 51(4), 187-198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00629.x>
- Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- Bousquet-Mélou, A. (2014).** Pharmacologie des anti-inflammatoires disponibles pour les animaux de rente. *Bulletin des G.T.V.* 76 , 35-40. (2014). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2016207782>

- Braga, L. C., Leite, A. A. M., Xavier, K. G. S., Takahashi, J. A., Bemquerer, M. P., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2005).** Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*, *51*(7), 541-547. <https://doi.org/10.1139/w05-022>
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. *Phytochimie. Plantes medicinales, Paris, Ed. Tec- Doc.*
- Burian, M., & Geisslinger, G. (2005).** COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology & Therapeutics*, *107*(2), 139-154. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004>
- Capet, C., Bentot, C., Druesne, L., Chassagne, P. H., & Doucet, J. (2001).** Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *La Revue de gériatrie*, *26*(5), 379–384.
- Carlos, T. M., & Harlan, J. M. (1994).** *Leukocyte-endothelial adhesion molecules.*
- Chaitra, R., Madhuri, M., Nishitha, S. T., Arijit, D., & Sourav, B. (2012).** *Evaluation of Antimicrobial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of Leaf Extracts of Punica granatum L.* <https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-Antimicrobial-Properties%2C-Contents-of-Chaitra-Madhuri/bf60c91b96296fe6870d20dc56f730d7c3ec21d3>
- Chou, C.-T. (1997).** The Antiinflammatory Effect of an Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on Adjuvant-induced Paw Oedema in Rats and Inflammatory Mediators Release. *Phytotherapy Research*, *11*(2), 152-154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199703\)11:2<152::AID-PTR45>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199703)11:2<152::AID-PTR45>3.0.CO;2-L)
- Christianson, D. W. (2008).** Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology*, *12*(2), 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.008>
- Clay, H. F., & Hubbard, J. C. (1987).** *Tropical Shrubs.* University of Hawaii Press.
- Colman, R. W. (1999).** Biologic Activities of the Contact Factors In Vivo. *Thrombosis and Haemostasis*, *82*(12), 1568-1577. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1614880>
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013).** Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, *52*(525), 22-25. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.006>
- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, *12*(4), 564–582.

- Dao, M., Lim, C. T., & Suresh, S. (2003).** Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, *51*(11-12), 2259-2280. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2003.09.019>
- De Nigris, F., Balestrieri, M. L., Williams-Ignarro, S., D'Armiento, F. P., Fiorito, C., Ignarro, L. J., & Napoli, C. (2007).** The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide*, *17*(1), 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2007.04.005>
- De Vos, M., Cuvelier, C., Mielants, H., Veys, E., Barbier, F., & Elewaut, A. (1989).** Ileocolonoscopy in Seronegative Spondylarthropathy. *Gastroenterology*, *96*(2, Part 1), 339-344. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)91557-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)91557-6)
- Dery, B. B., Ofsynia, R., & Ngatigwa, C. (1999).** Indigenous knowledge of medicinal trees and setting priorities for their domestication in shinyanga region, Tanzania; Nairobi, Kenya : International center for research in Agroforestry. In *Indigenous knowledge of medicinal trees and setting priorities for their domestication in shinyanga region, Tanzania; Nairobi, Kenya : International center for research in Agroforestry* (p. 284-293).
- Desta, B. (1995).** Ethiopian traditional herbal drugs. Part I: Studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medications. *Journal of Ethnopharmacology*, *45*(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01191-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01191-2)
- Dinarello, C. A. (2010).** Anti-inflammatory agents : Present and future. *Cell*, *140*(6), 935–950.
- El Azzouzi, F., & Zidane, L. (2015).** La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, *91*(1), 8493–8502.
- El Hachimi, F., Alfaiz, C., Bendriss, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2017).** Activité anti-inflammatoire de l'huile des graines de *Zizyphus lotus* (L.) Desf. *Phytothérapie*, *15*(3), 147-154. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1056-1>
- El Hilah Fatima, F. B. A., Dahmani, J., Belahbib, N., & Zidane, L. (2015).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. *Journal of Animal & Plant Sciences*, *25*(2), 3886–3897.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012).** Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(32), 4724–4730.

- Erlund, I. (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851–874.
- Evreinoff, V. A. (1957).** Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 4(3), 124-138. <https://doi.org/10.3406/jatba.1957.2380>
- F, C., Mh, L., & C, V. (1996).** Side effects of NSAIDs and dosing recommendations for ketorolac. *Acta Anaesthesiologica Belgica*, 47(3), 143-149.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998).** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(4), 890-898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>
- Farnsworth, N. R. (1966).** Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55(3), 225–276.
- Ferrali, M., Signorini, C., Ciccoli, L., & Comporti, M. (1992).** Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochemical Journal*, 285(1), 295–301.
- Fournier, P. (1948).** *Le livre des plantes médicinales et vénéuses de France : 1.500 espèces par le texte et par l'image, d'après l'ensemble de nos connaissances actuelles* (Vol. 25). P. Lechevalier.
- Fuentes, V. R., Rodríguez, M., Poucheaux, M., Cabrerias, L., & Lara, S. (1985).** Estudio en la medicina tradicional en Cuba. *Rev Plant Med*, 5, 13–38.
- Gadamsetty, G., Maru, S., Tyagi, A., & Chakravarthula, S. N. (2013).** Anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant effects of methanolic extracts of *Drypetes Sepiaria* (Euphorbiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5), 274-282. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.9>
- García Rodríguez, L., & Jick, H. (1994).** Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet*, 343(8900), 769-772. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91843-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91843-0)
- Gautam, K. R., Sharma, S., & Sharma, K. (2013).** Comparative evaluation of anti-arthritis activity of *Pongamia pinnata* (Linn.) Pierre and *Punica granatum* Linn : An in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(4), 721–724.

- Gautam, R., & Jachak, S. M. (2009).**Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal research reviews*, 29(5), 767–820.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162–169.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000).** Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Govindappa, M., Naga Sravya, S., Poojashri, M. N., Sadananda, T. S., & Chandrappa, C. P. (2011).** Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of pharmacognosy and phytotherapy*, 3(3), 43–51.
- Gözlekçi, Ş., Saraçoğlu, O., Onursal, E., & Özgen, M. (2011).** Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy magazine*, 7(26), 161.
- Griffin, M. R., & Scheiman, J. M. (2001).** Prospects for changing the burden of nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicity | Reprints are not available. *The American Journal of Medicine*, 110(1, Supplement 1), S33-S37. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00634-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00634-3)
- Haest, C. W. M. (1982).** Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 694(4), 331-352. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(82\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(82)90001-6)
- Hartmann, T. (1996).** Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Proceedings of the 9th International Symposium on Insect-Plant Relationships*, 177–188.
- Hasan, S. M., Abou-Rawash, A. E. A., & Bekheet, M. S. (2016).** Protective Role of an Aqueous Extract of *Punica Granatum* (Pomegranate) Peel on Lead-Induced Anemia In Rats. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 50(1).
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3–6.
- Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J.-Y. (2001).** Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue Médicale de Liège*, 56(6). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/118957>

- Hmid, I. (2013).** *Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (Punica granatum l.) : caracterisation physicochimique, biochimique et stabilite de leur jus frais* [phdthesis, université d'angers]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01066442>
- Ho, K. M. (2010).** *Dexamethasone for postoperative nausea and vomiting : Time for a definitive phase IV trial.* SAGE Publications Sage UK: London, England.
- Hold, G. L., & El-Omar, M. E. (2008).** Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochemical Journal*, 410(2), 225-235. <https://doi.org/10.1042/BJ20071341>
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1997).** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8), 305–310.
- Hosford, D., & Braquet, P. (1990).** 8 Antagonists of Platelet-Activating Factor : Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications. In G. P. Ellis & G. B. West (Éds.), *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 27, p. 325-380). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70295-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70295-9)
- Hossain, M. M., Ahamed, S. K., Dewan, S. M. R., Hassan, M. M., Istiaq, A., Islam, M. S., & Moghal, M. M. R. (2014).** In vivo antipyretic, antiemetic, in vitro membrane stabilization, antimicrobial, and cytotoxic activities of different extracts from *Spilanthes paniculata* leaves. *Biological research*, 47(1), 45.
- Houston, D. M., Bugert, J., Denyer, S. P., & Heard, C. M. (2017).** Anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L.(Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112, 30–37.
- Howell, A. B., & D'Souza, D. H. (2013).** *The Pomegranate : Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health* [Review Article]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2013/606212>
- Huang, T. H. W., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D., & Li, Y. (2005).** Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract : Activation of PPAR- $\gamma$  and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.009>
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. (2012).** Pomegranate peel and fruit extracts : A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 397–405.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007).** Inflammation : The foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25), Article 25. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i25.58240>

- Jafri, M. A., Aslam, M., Javed, K., & Singh, S. (2000).** Effect of *Punica granatum* Linn. (Flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 309-314. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00170-1)
- Jahromi, S. B., Pourshafie, M. R., Mirabzadeh, E., Tavasoli, A., Katirae, F., Mostafavi, E., & Abbasian, S. (2015).** *Punica granatum* peel extract toxicity in mice. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 10(4).
- Jayaprakash, A., & Sangeetha, R. (2015).** Phytochemical screening of *Punica granatum* Linn. Peel extracts. *Journal of academia and industrial research*, 4(5), 160–162.
- Johnson, A. G. (1994).** Do Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Affect Blood Pressure? A Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine*, 121(4), 289. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-4-199408150-00011>
- Jurenka, J. (2008).** Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alternative medicine review*, 13(2).
- Karthikeyan, G., & Vidya, A. (2019).** Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activity of pomegranate peel. *Research Journal of Life Science, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Science*, 5(1). <https://doi.org/10.26479/2019.0501.22>
- Karumi, Y., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179–182.
- Kasimsetty, S. G., Bialonska, D., Reddy, M. K., Ma, G., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2010).** Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2180-2187. <https://doi.org/10.1021/jf903762h>
- Katz, S. R., Newman, R. A., & Lansky, E. P. (2007).** *Punica granatum* : Heuristic Treatment for Diabetes Mellitus. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 213-217. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.290>
- Khalil, E. A. (2004).** Antidiabetic effect of an aqueous extract of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 16(1), 92–99.
- Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., & Lansky, E. (2002).** Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71(3), 203-217. <https://doi.org/10.1023/A:1014405730585>

- Koné, K. P. F. O., Soro, Y., & Siaka, S. (2017).**Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 15–22.
- Kota, K., Sharma, S., & Tahashildar, J. (2018).**A scientific validation of In vitro antiinflammatory activity of *Punica granatum* L. by human red blood cell membrane stabilization. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 6(7), 2430.
- Kylli, P. (2010).***Berry phenolics : Isolation, analysis, identification, and antioxidant properties.*
- Lan, J., Lei, F., Hua, L., Wang, Y., Xing, D., & Du, L. (2009).**Transport behavior of ellagic acid of pomegranate leaf tannins and its correlation with total cholesterol alteration in HepG2 cells. *Biomedical Chromatography*, 23(5), 531-536. <https://doi.org/10.1002/bmc.1150>
- Lansky, E. P., Jiang, W., Mo, H., Bravo, L., Fromm, P., Yu, W., Harris, N. M., Neeman, I., & Campbell, M. J. (2005).** Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Investigational New Drugs*, 23(1), 11-20. <https://doi.org/10.1023/B:DRUG.0000047101.02178.07>
- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 177–206.
- Lee, C.-J., Chen, L.-G., Liang, W.-L., & Wang, C.-C. (2010).** Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 118(2), 315–322.
- Lee, M., & Feldman, M. (1997).** The aging stomach : Implications for NSAID gastropathy. *Gut*, 41(4), 425-426. <https://doi.org/10.1136/gut.41.4.425>
- Lee, S.-I., Kim, B.-S., Kim, K.-S., Lee, S., Shin, K.-S., & Lim, J.-S. (2008).** Immune-suppressive activity of punicalagin via inhibition of NFAT activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 799–803.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006).** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*, 96(2), 254–260.
- Lorant, D. E., Patel, K. D., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., & Zimmerman, G. A. (1991).** Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin : A juxtacrine system for adhesion and activation

- of neutrophils. *Journal of Cell Biology*, 115(1), 223-234.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.223>
- Lowe, G., Stike, R., Pollack, M., Bosley, J., O'Brien, P., Hake, A., Landis, G., Billings, N., Gordon, P., Manzella, S., & Stover, T. (2008).** Nursing Blood Specimen Collection Techniques and Hemolysis Rates in an Emergency Department : Analysis of Venipuncture Versus Intravenous Catheter Collection Techniques. *Journal of Emergency Nursing*, 34(1), 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jen.2007.02.006>
- Macheix, J.-J. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux : Quelles perspectives à la fin du XXème siècle? *Acta botanica gallica*, 143(6), 473–479.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PUR presses polytechniques.
- Mahboubi, A., Asgarpanah, J., Sadaghiyani, P. N., & Faizi, M. (2015).** Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. *Pleniflora* flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 366.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., & Mukhtar, H. (2005).** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14813-14818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505870102>
- Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2005).** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-1>
- Medzhitov, R. (2010).** Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771-776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Menat, É. (2006).** Les polyphénols de thé, du vin et du cacao. *Phytothérapie*, 4(1), hs40–hs45.
- Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2013a).** A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *Punica granatum* peel waste. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2013b).** HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in pharmacological sciences*, 2013.

- Mirad, m. (2013).** *Extraction et L'étude de L'effet Antibactérien des Extraits Polyphénolique de la Grande Punica Granatum Vis-à Vis* [PhD Thesis].
- Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x>
- Mohan, C. (2006).** *Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*.
- Mounnissamy, V. M., Kavimani, S., Balu, V., & Quine, S. D. (2007).** Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane stabilizing property of Ethanol Extract of *Cassia sophera* L. (Fabaceae). *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 6(2), 235–0.
- Muruges, N., Vembar, S., & Damodaran, C. (1981).** Studies on erythrocyte membrane IV : In vitro haemolytic activity of oleander extract. *Toxicology Letters*, 8(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(81\)90134-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(81)90134-X)
- Muster, D. (2005).** Médicaments de l'inflammation. *EMC - Stomatologie*, 1(1), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.emcsto.2005.01.005>
- Naik, S. R., & Sheth, U. K. (1976).** Inflammatory process and screening methods for anti-inflammatory agents- a review. *Journal of Postgraduate Medicine*, 22(1), 5.
- Nasr, C. B., Ayed, N., & Metche, M. (1996).** Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203(4), 374–378.
- Nathan, C. (2002).** Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
- Nawwar, M. A. M., Hussein, S. A. M., & Merfort, I. (1994).** Leaf phenolics of *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 37(4), 1175-1177. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89552-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89552-7)
- Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2003).** Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food chemistry*, 80(3), 393–397.
- Neuhöfer, h., witte, l., gorunovic, m., & czygan, f.-c. (1993).** Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (Pomegranate) from Yugoslavia. *Alkaloids in the bark of Punica granatum L. (Pomegranate) from Yugoslavia*, 48(5), 389-391.
- Neurath, A. R., STRICK, N., LI, Y.-Y., & DEBNATH, A. K. (2005).** *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056(1), 311–327.

- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- Nicot, R., Hippy, C., Hochart, C., Wiss, A., Brygo, A., Gautier, S., Caron, J., Ferri, J., & Raoul, G. (2013).** Les anti-inflammatoires aggravent-ils les cellulites faciales d'origine dentaire ? *Revue de Stomatologie, de Chirurgie Maxillo-faciale et de Chirurgie Orale*, 114(5), 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.revsto.2013.07.011>
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001).** Flavonoids : A review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418–425.
- Oloyede, O. I. (2005).** Chemical profile of unripe pulp of carica papaya. *Pak. J. Nutr*, 379–381.
- Op den Kamp, J. A. F. (1979).** Lipid Asymmetry in Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 47-71. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.000403>
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999).** Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of Physiology*, 515(1), 287-291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>
- Ouachrif, A., Khalki, H., Chaib, S., Mountassir, M., Aboufatima, R., Farouk, L., Benharraf, A., & Chait, A. (2012).** Comparative study of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of two varieties of Punica granatum. *Pharmaceutical Biology*, 50(4), 429–438.
- Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R. W., Tibiri, A., Hay, A.-E., Koudou, J., Dijoux, M.-G., & Guissou, I. P. (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 10(5), 286-292. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0732-z>
- Oyedapo, O. O., & Famurewa, A. J. (1995).** Antiprotease and Membrane Stabilizing Activities of Extracts of Fagara Zanthoxyloides, Olax Subscorpioides and Tetrapleura Tetraptera. *International Journal of Pharmacognosy*, 33(1), 65-69. <https://doi.org/10.3109/13880209509088150>
- Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., & Yuenyongsawad, S. (2010).** Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chemistry*, 123(2), 400–403.

- Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des Laboratoires*, 1995(276), 87-92. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(95\)80364-5](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(95)80364-5)
- Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez, H., Abbas, O., Pierna, J. A. F., & Baeten, V. (2018).** Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools. *BASE*.
- Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005).** Antiinflammatory action of glucocorticoids—New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711–1723.
- Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009).** NSAID Prescribing Precautions. *American Family Physician*, 80(12), 1371-1378.
- Romier, B., Van De Walle, J., During, A., Larondelle, Y., & Schneider, Y.-J. (2008).** Modulation of signalling nuclear factor- $\kappa$ B activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 100(3), 542–551.
- Roth, I., & Lindorf, H. (2013).** *South American Medicinal Plants : Botany, Remedial Properties and General Use*. Springer Science & Business Media.
- Rousselet, M. C., Vignaud, J. M., Hofman, P., & Chatelet, F. P. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3). *Copyright AFECAP*, 1–75.
- Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(1), 146–155.
- Salwe, K. J., Sachdev, D. O., Bahurupi, Y., & Kumarappan, M. (2015).** Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of *Punica granatum* in male Wistar albino rats. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(1), 56-62. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.149085>
- Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., & De Salvia, R. (2008).** Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.011>
- Sandhya, S., Venkatramana, K., Vinod, K. R., Chaitanya, R. K., Chandrasekhar, J., Sudhakar, K., & Rajeswar, T. (2010).** Membrane stabilizing potency of two *Tephrosia* species. *Journal of Phytology*.
- Sastravaha, G., Gassmann, G., Sangtherapitikul, P., & Grimm, W.-D. (2005).** Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol*, 7(3), 70–9.

- Sawadogo, W. R., Lompo, M., Guissou, I. P., & Nacoulma, O. G. (2008).** Dosage des triterpènes et stéroïdes de *Dicliptera verticillata* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire topique. *Médecine d'Afrique Noire*, 55, 223–229.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002).** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276–282.
- Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999).** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1), 11-17. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00222-0)
- Seeram, N. P., Lee, R., & Heber, D. (2004).** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, 348(1-2), 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.029>
- Segura, J. J., Morales-Ramos, L. H., Verde-Star, J., & Guerra, D. (1990).** Growth inhibition of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* produced by pomegranate root (*Punica granatum* L.). *Archivos de investigacion medica*, 21(3), 235–239.
- Séréme, A., Millogo Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2008).** Concentration en tanins des organes de plantes tannifères du Burkina Faso. *J. Soc. Ouest-afriq. Chim*, 25, 55–61.
- Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (2010).** *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press.
- Shiva Shankar Reddy, C. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R., & Asha Devi, S. (2007).** In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1355-1364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
- Shobana, S., & Vidhya, R. (2016).** Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (linn.). *World J Pharm Pharm Sci*, 5(5), 1182–96.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018).** Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food chemistry*, 261, 75–86.
- Smahia, R., Nasser, B., Khaled, S., & Abdelkrim, C. (2016).** EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE D'EXTRAITS AQUEUX DE FEUILLES *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 6(1), Article 1. <https://193.194.92.23/index.php/AJAE/article/view/150>

- Sofowora, A. (2010).** *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions.
- Sood, A., & Gupta, M. (2015).** Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*, *12*, 100–106.
- Souaga, K., Adou, A., Amantchi, D., & Angoh, Y. (1998).** Plaidoyer pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires en odonto-stomatologie. *Odontostomatol Trop*, *21*, 16–21.
- Spichiger, R.-E., Figeat-Hug, M., & Jeanmonod, D. (2002).** *Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*. PPUR presses polytechniques.
- Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J. M., & Sreeharshan, S. (2014).** *Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds* [Review Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2014/686921>
- Stankov, S. (2012).** Definition of inflammation, causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *The open inflammation journal*, *5*(1).
- Stevens, A., Lowe, J., & Young, B. (2004).** *Anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2007).** Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(5), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2007.05.004>
- Tanaka, T., Nonaka, G.-I., & Nishioka, I. (1986).** Tannins and Related Compounds. XL. : Revision of the Structures of Punicalin and Punicalagin, and Isolation and Characterization of 2-O-Galloylpunicalin from the Bark of Punica granatum L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *34*(2), 650–655. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.650>
- Tazerout, M. (2008).** Manuel d'aide à la formation en transfusion sanguine. *Coordination Régionale d'Hémovigilance, Toulouse*.
- Tracey, K. J. (2002).** The inflammatory reflex. *Nature*, *420*(6917), 853–859.
- Trease, G. E., & Evans, W. C. (1987).** *A text book of pharmacognosy*. ELSB Baillere Tindal. Oxford.
- Triantafyllidi, A., Xanthos, T., Papalois, A., & Triantafyllidis, J. K. (2015).** Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, *28*(2), 210.

- Tripathi, S. M., & Singh, D. K. (2000).** Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(11), 1351-1355. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000001100014>
- Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-ghamdi F., et Chen F.(2000).** Leaf flavonoids as systematic characters in the *Generalavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systemical systematic and ecology*, 28: 991-1007.
- Vadivu, R., & Lakshmi, K. S. (2008).**In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh Journal of Pharmacology* *///*, 3(2), 121-124.
- Vahid dastjerdi, e., abdolazimi, z., ghazanfarian, m., amdjadi, p., kamalinejad, m., & mahboubi, a. (2014).** Effect of *Punica granatum* L. Flower Water Extract on Five Common Oral Bacteria and Bacterial Biofilm Formation on Orthodontic Wire. *Iranian Journal of Public Health*, 43(12), 1688-1694.
- Valadares, M. C., Pereira, E. R. T., Benfica, P. L., & Paula, J. R. (2010).** Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 121–127.
- Van Caneghem, P. (1972).** Influence of some hydrosoluble substances with vitamin P activity on the fragility of lysosomes in vitro. *Biochemical pharmacology*, 21(11), 1543–1548.
- Van Praet, L., Elewaut, T., Elewaut, D., & Van den Bosch, F. (2016).**Inflammation chronique de l'intestin et rhumatismes inflammatoires : Caractéristiques cliniques et paracliniques. *Revue du Rhumatisme Monographies*, 83(4), 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2016.07.002>
- Vandi, D., Nga, E. N., Betti, J. L., Loe, G. M. E., Ottou, P. B. M., Priso, R. J., Foze, T. N., Boumsong, P. C. N., Dibong, S. D., & Mpondo, E. M. (2016).** Contribution des populations des villes de Yaoundé et Douala à la connaissance des plantes à tanins et à anthocyanes. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 30(3), 4797–4814.
- Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., & Vuorela, P. M. (2003).** Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 89(2-3), 295–300.
- Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275–297.
- Viuda-martos, m., pérez-álvarez, j. A., sendra, e., & fernández-lópez, j. (2013).**In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel powder extract obtained

- as coproduct in the juice extraction process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 772–776.
- W, S., & T, I. (1995).** Study of genotoxic effects of antidiarrheal medicinal herbs on human cells in vitro. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 26 Suppl 1, 306-310.
- Waheed, S., Siddique, N., Rahman, A., Zaidi, J. H., & Ahmad, S. (2004).** INAA for dietary assessment of essential and other trace elements in fourteen fruits harvested and consumed in Pakistan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260(3), 523-531. <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000028211.23625.99>
- Wald, E. (2009).** *Le grenadier (punica granatum): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes* (p. non renseigné) [Other, UHP - Université Henri Poincaré]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734473>
- Wang, D., Özen, C., Abu-Reidah, I. M., Chigurupati, S., Patra, J. K., Horbanczuk, J. O., Józwik, A., Tzvetkov, N. T., Uhrin, P., & Atanasov, A. G. (2018).** Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00544>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300–312.
- Wang, R.-F., Xie, W.-D., Zhang, Xing, D.-M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C., & Du, L.-J. (2004).** Bioactive Compounds from the Seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67(12), 2096-2098. <https://doi.org/10.1021/np0498051>
- Weill, B., & Batteux, F. (2003).** *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur.
- Wirth, H. P., Hürlimann, R., & Flückiger, T. (2006).** Les AINS et les inhibiteurs de la COX-2 : Principaux effets indésirables. *Forum Médical Suisse*, 6(12), 284–290.
- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012).** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(Suppl 3), 675–682.
- Xu, J., Zhao, Y., & Aisa, H. A. (2017).** Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 2095-2101. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1357737>
- Yasoubi, P., Barzegar, M., SAHARI, M. A., & Azizi, M. H. (2007).** *Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum L.) peel extracts*.

- Yougbaré-Ziébrou, M. N., Ouédraogo, N., Lompo, M., Bationo, H., Yaro, B., Gnoula, C., Sawadogo, W. R., & Guissou, I. P. (2016).** Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of an aqueous extract of *Saba senegalensis* Pichon stems with leaves (Apocynaceae). *Phytothérapie*, *14*(4), 213-219. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0992-5>
- Ziltener, J.-L., Leal, S., & Fournier, P.-E. (2010).** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes : An update. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, *53*(4), 278-288. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2010.03.001>