
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^{lle} FENOUS Sarra

M^{me} BOUDAUD Yasmine

M^{lle} BOUHACIDA Nour el houda

Etude phytochimique et valorisation des extraits bruts des feuilles de grenadier d'Ain Témouchent « *Punica granatum* » par l'étude de son activité antioxydante

Encadrant : M^{me} BENTABET N

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

Soutenu le 29 juin 2020

Devant le jury composé de :

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

Examineur : M^e SEGHIR. A «MCA» C.U.B.B.A.T

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

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements :

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail, pour son aide durant des longues années d'étude.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à notre directeur de mémoire, Dr BENTABET_ LASGAA Nesrine, Maitres de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent, pour son encadrement et ses qualités scientifiques et pédagogiques qui nous ont permis de mieux structurer nos idées. Merci de nous avoir fait confiance jusqu'à la fin de notre mémoire et pour nous avoir dirigé sur ce sujet passionnant. Merci pour le suivi de nos travaux avec intérêt tout en nous prodiguons des conseils et nous redonnons du courage et de nous avoir aidé à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Aussi nous la remercions pour son soutien, son attention, ses qualités humaines. Pour tout cela, nous tenons particulièrement à la remercier profondément.

Nos remerciements les plus chaleureux s'adresse à la présidente du jury Dr BENAHBIB O, Maitre de conférence classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent, d'avoir eu l'amabilité d'accepter de critiquer et de juger ce travail. Nous sommes particulièrement reconnaissantes et honorées par votre participation au jury.

Nous exprimons aussi nos vifs remerciements au Dr SEGHIR A, Maître de conférence classe A au centre universitaire d'Ain Témouchent, de nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'avoir accepter d'examiner ce modeste travail.

A travers ce modeste travail, nous tenons à remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression notre grande reconnaissance.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire du centre universitaire d'Ain Témouchent et particulièrement à Mme MEFTAHI Choukria, Mr Nourddine, Mlle SOUSSI Chahinez et Mr MHAMEDI Walid pour leurs aides.

A tous nos ami(e)s.

A tous les étudiants du M2 Biochimie de la promotion 2019/2020.

Enfin nous tenons à remercier gracieusement toutes les personnes qui ont contribué, de façon directe ou indirecte à la réalisation du présent travail.

Dédicace :

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

Je le dédie ;

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, merci maman, merci papa, avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

A ma chère sœur Asmaa et son mari Saïd, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mon cher frère Mohamed Amine pour son appui et son encouragement.

A mon cher grand-père Bloufa et ma chère grand-mère Ouda.

A toute ma famille paternelle FENTOUS et BENARIBA et ma famille maternelle BENKRAMA pour leurs soutiens tout au long de mon parcours universitaire.

A mes cousins(es), oncles et tantes.

A ma chère copine Yasmine et sa famille BOUDAOUUD.

A mes amies : Ikram, Melissa, Bakhta, Souad, Imene, Yasmine et Aicha.

A mes binômes Yasmine et Nour El Houda et leurs familles.

A tous qui me sont chers.

A toute la promotion M2 Biochimie 2019/2020.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infailible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Sarra

Dédicace

A mes chers parents qui m'ont soutenu nuits et jours durant mon parcours, avec leurs prières qu'ils soient toujours en bonne santé et à mes côtés. Que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

A mon cher frère et mes chères sœurs ; particulièrement IMANE ainsi sa petite famille pour leurs encouragements permanents, leur amour et leur tendresse.

A mes grandes mères qui n'ont pas cessé de prier pour moi.

A toute ma famille pour leur soutien moral.

A mes binômes et toutes leurs familles.

A tous mes amis, mes camarades de promotion M2 Biochimie et a tous ceux qui me sont chers... .

Nour El houda

Dédicace

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

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chères;

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

A ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci Maman.

A mon cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, merci papa, avec mes prières qu'il soit toujours en bonne santé.

A mon cher mari Lotfi, le plus beau cadeau que j'ai pu avoir est sa présence dans ma vie, merci pour ton amour, ton soutien, ton encouragement, merci pour tous ce que tu as fais pour moi.

A mes très chères sœurs Samia, Melissa et Amel.

A mes très chers frères Hocine, Achour, Seddik et Amine.

A ma nièce Noursine.

A mon beau-père Saïd et toute ma belle-famille TANEM.

A mes très chères grand-mères Nora et Ouiza.

A ma chère copine Ikram et sa sœur Asmaa et toutes les familles: FENTOUS, BENARIBA, et BENKRAMA.

A mes cousin(e)s, oncles et tantes.

A mes amies : Ikram, Souad, Imene, Yasmine, Bakhta et Aicha.

A mes binômes Sarra et Nour El Houda ainsi que leurs familles.

A toute la promotion M2 Biochimie 2019/2020.

Yasmine

Résumé

Le grenadier « *Punica granatum* » est un arbuste de la famille *des punicacea*, pouvant atteindre 6m de hauteur. C'est l'une des espèces fruitières les plus anciennement cultivées dans le monde. Durant ces dernières décennies, cet arbre prend de plus en plus d'importance et sa culture est passée du caractère traditionnel pour se développer en vergers commerciaux. Il est considéré comme une plante médicinale qui n'a pas encore dévoilé tous ses secrets en raison de ses composants bioactifs à vertus thérapeutiques obtenus dans ses extraits. Les différentes parties de cette plante et leurs extraits (jus, huile de graines, écorces et feuilles) auraient montré des fortes activités biologiques.

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des feuilles de cette plante médicinale «*Punica granatum*» de la région d'Ain Témouchent, en vue d'identifier ses molécules bioactives possédant des propriétés antioxydantes. Dans ce contexte, cette investigation est fondée sur un ensemble d'expériences réalisées tels que les tests phytochimiques, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, puis l'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits bruts par deux méthodes à savoir le pouvoir réducteur du fer FRAP et le piégeage du radical DPPH.

Le screening phytochimique a été effectué en suivant des méthodes simples et standards et les résultats obtenus ont indiqué que les trois extraits sont riches en : tannins, flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres et en composés réducteurs. Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes révèlent que l'extrait brut aqueux a montré la meilleur teneur en polyphénols et en flavonoïdes avec des taux estimés à 38.8 mgEAG/gMS et à 1.84 mgEC/gMS respectivement.

Selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH la fraction hydro-méthanolique a présenté une excellente activité antioxydante par rapport aux deux autres extraits testés avec une IC50 égale à 0.020 mg/mL. Le même extrait a présenté la meilleure aptitude à réduire le fer dans la méthode de FRAP.

Enfin, à l'issue de ce travail nous déduisons que les feuilles de « *Punica granatum* » font de cette dernière une plante médicinale précieuse avec de nombreuses propriétés médicinales. Ceci révèle une preuve biologique qui encourage son utilisation comme un antioxydant naturel.

Mots clés : *Punica granatum*, Extraits, Activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Abstract

The pomegranate «*Punica granatum*» is a shrub of the family *Punicaceae*, which can reach 6m in height. It is one of the oldest cultivated fruit species in the world. In recent decades, this tree has become more and more important and its culture has moved from the traditional character to develop into commercial orchards. It is considered a medicinal plant which has not yet revealed all of its secrets due to its bioactive components with therapeutic properties obtained in its extracts. The different parts of this plant and their extracts (juice, seed oil, bark and leaves) have shown strong biological activities.

The present study is part of the development of the leaves of this medicinal plant "*Punica granatum*" from Ain Témouchent region, in order to identify its bioactive molecules with antioxidant properties. In this context, this investigation is based on a set of experiments carried out such as phytochemical tests, the determination of polyphenols and flavonoids, then the evaluation of the antioxidant power of the different crude extracts by two methods, namely the reducing power of iron. FRAP and the trapping of the DPPH radical.

Phytochemical screening was carried out using simple and standard methods and the results obtained indicated that the three extracts are rich in: tannins, flavonoids, alkaloids, free quinones and reducing compounds. The determination of polyphenols and flavonoids reveals that the crude aqueous extract showed the best content of polyphenols and flavonoids with rates estimated at 38.8 mgEAG / gMS and 1.84 mgEC / gMS respectively.

According to the DPPH free radical trapping method, the hydro-methanolic fraction exhibited excellent antioxidant activity compared to the two other extracts tested with an IC50 equal to 0.020 mg / ml. The same extract showed the best ability to reduce iron in the FRAP method.

Finally, at the end of this work we deduce that the leaves of "*Punica granatum*" make it a precious medicinal plant with many medicinal properties. This reveals biological evidence that encourages its use as a natural antioxidant.

Keywords: *Punica granatum*, Extracts, Antioxidant activity, DPPH, FRAP.

ملخص

شجرة الرمان *Punica granatum* هي شجيرة من عائلة Punicaceae والتي يمكن أن يصل ارتفاعها إلى 6 أمتار. وهي من أقدم أنواع الفاكهة المزروعة في العالم.. في العقود الأخيرة، أصبحت هذه الشجرة أكثر أهمية وانتقلت ثقافتها من الشخصية التقليدية إلى البساتين التجارية. شجرة الرمان تعتبر نباتاً طبيّاً لم يكشف بعد عن جميع أسرارها بسبب بمكوناتها لنشطة بيولوجياً مع الخصائص العلاجية التي تم الحصول عليها في خلاصاته. أظهرت الأجزاء المختلفة من هذا النبات ومستخلصاته (العصير و زيت البذور واللحاء والأوراق) أنشطة بيولوجية قوية.

الدراسة الحالية هي جزء من تطور أوراق هذا النبات الطبي « *Punica granatum* » من منطقة عين تموشنت، من أجل تحديد جزيئاتها لنشطة بيولوجيا بخصائص مضادة للأكسدة. في هذا السياق، يستند هذا البحث إلى مجموعة من التجار والتي تم إجراؤها مثلًا لاختبارات الكيمائية النباتية، وتحديد البوليفينول و الفلافونويد، ثم تقييم الطاقة المضادة للأكسدة من المستخلصات الخام المختلفة بطريقتين، وهما ارجاع الحديد FRAP وتثبيط الجذور الحرة DPPH

تم إجراء الفحص الكيمائي النباتي باستخدام طرق بسيطة ومعيارية وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلصات الثلاثة غنية بما يلي: التانينات والفلافونيدات و القلويدات والكينونات الحرة وتقليل المركبات. يكشف تحديد البوليفينول والفلافونيدات أن المستخلص المائي الخام أظهر أفضل محتوى من البوليفينول والفلافونويد بمعدلاً تقترب من 38.8 مغ/EG و 1.84 مغ/EC على التوالي.

وفقاً لطريقة اصطياد الجذور الحرة DPPH أظهر المستخلص الهيدروميثانولي نشاطاً مضاداً للأكسدة ممتازاً مقارنة بالمستخلصين الآخرين المختبر IC50 يساوي 0.020 مغ / مل. أظهر نفس المستخلص أفضل قدرة على تقليل

الرجاع الحديد FRAP

أخيراً، في نهاية هذا العمل نستنتج أن أوراق *Punica granatum* تجعلها نباتاً طبيّاً ثميناً له العديد من الخصائص الطبية. وهذا دليل بيولوجي يشجع استخدامه كمضاد طبيعي للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Punica granatum* نشاط مضاد للأكسدة، مستخلصات، ، FRAP، DPPH.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Introduction.....2

Partie1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les plantes médicinales5

1.1. Historique.....5

1.2. Généralités sur les plantes médicinales.....5

1.3. Principes actifs des plantes médicinales.....6

1.3.1. Les métabolites primaires6

1.3.2. Les métabolites secondaires.....6

1.3.2.1. Les alcaloïdes.....7

1.3.2.2. Les composés terpéniques.....8

1.3.2.3. Les polyphenols.....8

1.3.2.3.1. Classification.....9

1.3.2.3.1.1. Acide phénolique.....10

1.3.2.3.1.2. Flavonoïde.....10

1.3.2.3.1.3. Tanin.....11

1.3.2.3.1.3.1. Tanin hydrolysable.....12

1.3.2.3.1.3.2. Tanin condensé.....12

1.3.2.3.1.4. Coumarine.....12

Chapitre 2 : La plante « *Punica granatum* »13

2.1. Description botanique13

2.2. Nomenclature.....13

2.3. Classification botanique.....13

2.4. Répartition géographique.....14

2.5. Biologie du grenadier14

2.6. Usages de la grenade.....15

2.7. Propriétés biologique.....	15
Chapitre 3 : Stress oxydatif et antioxydants.....	17
3.1. Les radicaux libres.....	17
3.1.1. Origine	17
3.1.1.1. Source endogène	18
3.1.1.2. Source exogène.....	18
3.1.2. Rôle physiologique.....	19
3.2. Stress oxydant.....	19
3.2.1. Conséquence biologique.....	20
3.3. Les antioxydants.....	20
3.3.1. Les antioxydants synthétiques.....	21
3.3.2. Les antioxydants naturels.....	21

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	24
2. Méthodes.....	24
2.1. Préparation des différents extraits de <i>Punica granatum</i>	24
2.1.1. Extrait brut aqueux.....	24
2.1.2. Extraits bruts eau/méthanol et eau/acétone.....	25
2.1.3. Le rendement des extraits secs	25
2.2. Tests phytochimiques.....	26
2.3. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes totaux.....	27
2.3.1. Préparation de l'extrait pour les dosages.....	28
2.3.2. Dosage des polyphenols totaux	28
2.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
2.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	30
2.4.1 Réduction du fer FRAP.....	30
2.4.2. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	31

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Etude phytochimique.....	34
1.1. Dosage qualitatif	34
1.2. Dosage quantitatif	35

1.2.1. Dosage des polyphenols	36
1.2.2. Dosage des flavonoïdes	37
1.3. Le rendement en extrait sec	39
2. Activité antioxydante.....	40
2.1. Réduction du fer FRAP.....	40
2.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	42
Partie 4 : Conclusion générale.....	47
Références bibliographiques	49

Liste des tableaux

- Tableau N°01** : Résultats des principaux groupes chimiques recherchés dans les trois extraits des feuilles de *Punica granatum*..... 34
- Tableau N°02** : Les valeurs des IC50 des différents extraits des feuilles de *Punica granatum* et de l'acide ascorbique..... 44

Liste des figures

Figure N°01 :	Structure de la théobromine (alcaloïde).....	7
Figure N°02 :	Structure générale d'un di-terpène.....	8
Figure N°03 :	Structure générale de l'acide phénolique	10
Figure N°04 :	Structure de base de quelques flavonoïdes	11
Figure N°05 :	Bases structurales des deux types de tanins.....	12
Figure N°06 :	Structure générale des coumarines	12
Figure N°07 :	Répartition de la production mondiale de la grenade	14
Figure N°08 :	Représentation photographique de <i>Punica granatum</i>	15
Figure N°9 :	Les principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène	17
Figure N°10 :	Régulation de la production d'ERO par les systèmes de défense antioxydante	21
Figure N°11 :	La gamme d'antioxydants naturels	22
Figure N°12 :	Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de <i>Punica granatum</i>	24
Figure N°13 :	Schéma de l'extraction Eau/méthanol et Eau/acétone des feuilles de <i>Punica granatum</i>	25
Figure N°14 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	36
Figure N°15 :	La teneur en polyphenols totaux dans les différents extraits bruts des feuilles.	36
Figure N°16 :	Courbe d'étalonnage de la catéchine	38
Figure N°17 :	La teneur en flavonoïdes dans les différents extraits bruts des feuilles de <i>Punica granatum</i>	38
Figure N°18 :	Le rendement des trois extraits des feuilles du grenadier	39
Figure N°19 :	Variation du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de <i>Punica granatum</i> comparé à l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.....	41
Figure N°20 :	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits de feuilles de <i>Punica granatum</i>	43

Liste des photos

<u>Photo N°01</u> :	Représentation photographique du grenadier.....	13
<u>Photo N°02</u> :	Les feuilles sèches du grenadier.....	24

Liste des abréviations

%I : pourcentage d'inhibition

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

Ap1 : Activator-protein-1

C : Carbone

CO : Monoxyde de carbone

Cu : Cuivre

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent acide gallique

EC : équivalent catéchine

ERO : Espèce réactif de l'oxygène

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Capacité réductrice ferrique d'antioxydant

GPx's : Glutathion peroxydases

H₂O : Monoxyde dihydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolibdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

HCl : Chlorure d'hydrogène

HgCl₂ : Chlorure de mercure

HSF-1 : Heat shock-1

HSP : Heatshockprotein

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50

K₃Fe : Ferricyanure de potassium

KI : Iodure de potassium

MeOH : Méthanol

Mg : Magnésium

Mn-SOD : Super oxyde dismutase à manganèse

MS : Matière sèche

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaNO₂ : Nitrite de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Ammoniaque

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Monoxyde d'azote synthase

O₂ : Dioxygène

pH : Potentiel hydrogène

Rdt : Rendement

SO₂ : Dioxyde de soufre

SODs : Super oxyde dismutases

TCA : Acide trichloracétique

Zn-SOD : Zinc super oxyde dismutase

INTRODUCTION GÉNÉRALE

De nos jours, malgré le développement de la chimie de synthèse, l'utilisation des plantes médicinales a conservé une large place du fait de leur efficacité dans diverses procédures thérapeutiques ; elles constituent un groupe numérique vaste et contiennent des composants actifs présentant des activités biologiques puissantes. Outre leur utilisation comme remède direct, on les emploie aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. En effet, ses connaissances ancestrales sont transmises de générations en générations, permettant ainsi la conservation de ce savoir (**Lazli et al., 2019**).

Parmi les plantes médicinales ayant un intérêt thérapeutique important figurent le grenadier (*Punica granatum L.*). C'est un arbuste originaire de Perse qui a été très anciennement cultivé dans le monde. Dans la dernière décennie, le grenadier a été étudié pour une potentielle utilisation dans la médecine à partir de ses sous-produits connus par leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antibactériennes intéressantes (**Chebaibi et al., 2011**).

Ces dernières années, les scientifiques ne cessent d'affirmer qu'une consommation régulière de fruits et de légumes est un bon moyen de prévention de plusieurs maladies résultant d'un phénomène appelé « stress oxydant » (**Kaci-Meziane et al., 2017**) où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques (**Haleng et al., 2007**). De ce fait, les extraits de plantes font actuellement l'objet de nombreuses recherches visant à explorer et exploiter leurs propriétés biologiques (**Gacioui et al., 2013**).

Dans ce contexte et afin de mettre en valeur les feuilles du grenadier d'Ain Témouchent, nous avons opté pour la valorisation de ses feuilles par l'étude de leurs composition phytochimique et pouvoir antioxydant.

Notre travail est scindé en plusieurs parties :

- Une synthèse bibliographique comportant trois chapitres : dont le premier est consacré à la présentation générale des plantes médicinales, le deuxième présente le grenadier et un dernier chapitre qui porte sur l'activité antioxydante.
- Une partie expérimentale consacrée à la préparation des extraits (aqueux, hydro-méthanolique et hydro-acétonique), suivie d'une gamme de tests phytochimiques et de

dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux, ainsi que une évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits.

- Une dernière partie qui présente les résultats obtenus dans notre pratique ainsi qu'une discussion générale.
- Ce modeste travail se terminera par une conclusion.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Historique

Depuis l'antiquité l'homme utilise les ressources naturelles, notamment les plantes, comme : aliments, abris et matières principales pour le maintien de sa beauté et le soin de sa santé (**Hadj-Seyd et al., 2015**). De nos jours, et malgré les progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie reste un moyen de soin largement utilisé par l'homme où des études ont révélé que les médicaments à base de plantes seraient considérés comme peu toxiques par rapport aux médicaments de synthèse (**Hadj-Seyd et al., 2015 ; Nga, 2017**).

De ce fait, de nombreuses études s'intéressent de plus en plus aux effets thérapeutiques des antioxydants d'origine naturelle. Cependant, cette source semble inépuisable, puisque seule une petite partie des 250 000 espèces végétales connues a été investiguée sur les plans phytochimiques et pharmacologiques et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents. Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : alimentaire, en cosmétologie et en dermopharmacie (**El-Haci et al., 2012**).

1.2. Généralités sur les plantes médicinales

En botanique et en pharmacie, les plantes médicinales sont reconnues pour offrir, par leur administration, un effet bienfaisant sur l'organisme dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce possède des vertus curatives et qui sont la base de la phytothérapie (**Dauta, 2019**).

La phytothérapie vient du grec et signifie « soigner par les plantes ». Elle repose en partie sur une pratique traditionnelle fondée sur l'utilisation ancestrale et locale des plantes médicinales qui renferment de nombreux actifs qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces principes actifs ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments (**Yiesvlip, 2016**). En effet, la thérapie par les plantes utilise des plantes fraîches ou séchées à l'aide d'un procédé nommé «extraction». Les substances actives (ou principes actifs) ainsi extraites sont ensuite transformées en comprimés, gélules, crèmes et patchs (**Piguet, 2019**). La phytothérapie connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public face à un coût de la santé galopant

et insupportable aux budgets des pays développés ou en développement et face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques (Chemli, 1997 ; Mbaihougadobe et al., 2017).

L'organisation mondiale de la santé exhorte les pays en voie de développement à intégrer, dans leur système officiel de santé, les remèdes à base de plantes dont l'aspect : innocuité, efficacité et qualité sont garanties (Bouzabata, 2016). Cela est justifié par le fait que dans la pharmacopée locale, des recettes ont fait et continuent de faire leurs preuves d'efficacité (Bognan Ackah et al., 2016).

Les plantes médicinales constituent et restent le moyen le plus utilisé surtout en milieu rural pour résoudre les problèmes de santé humaine et animale (Koudoro et al., 2018).

1.3. Les principes actifs des plantes médicinales

Les principes actifs sont des composés naturels qui agissent comme des agents protecteurs contre le stress chez les plantes (Cheurfa et Allem, 2017) et qui sont connus pour leurs propriétés thérapeutiques (Koudoro et al., 2018). Les espèces végétales produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées nommées métabolites primaires et métabolites secondaires (Hopkins, 2003).

1.3.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont synthétisés par la cellule parce qu'elles sont indispensables pour leur accroissement (Tomislav-Meštrović, 2018) et qui sont des molécules de base telle que les acides nucléiques, les lipides, les protéines, les acides aminés et les glucides (Saadaoui et al., 2006)

1.3.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires illustrent les formidables capacités de synthèse des plantes qui collectivement synthétisent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes reflétant la diversité des espèces végétales, d'une part parce qu'ils dérivent des métabolites primaires mais aussi parce qu'ils ne sont pas nécessaires au fonctionnement de base de la cellule (Lassouane et al., 2005).

Ces différentes familles de composés manifestent des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, antioxydantes, antipyrétiques et diurétiques.

Ces métabolites secondaires comprennent plusieurs groupes variés (Togola *et al.*, 2019) tels que :

a. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote. La plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité de longue date un intérêt thérapeutique. Leur dénomination -de l'arabe al kali (qui a donné « alcali ») et du grec ἔϊδος (forme)- fait référence à leur caractère « alcalin » ou « basique ».

En fait, les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue tant de la structure et des propriétés chimiques que des effets biologiques. Ils ont joué un rôle important dans la découverte des médicaments chimiques (morphine, quinine, cocaïne, atropine...) et dans le développement de l'industrie pharmaceutique (Figure N°01). Cela ne les empêche pas d'être encore d'actualité en thérapeutique et de constituer d'importants réactifs biologiques (Poisson, 2019).

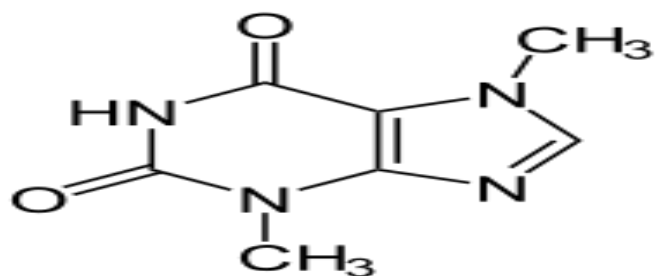


Figure N°01: Structure de la théobromine (Alcaloïde).

b. Les terpènes

Les terpènes sont des produits naturels prometteurs qui ont déjà démontré leurs efficacités dans le traitement de la douleur chronique, en particulier d'origine inflammatoire (**Carvalho et al., 2019**). Ce sont des molécules organiques constituées par un multiple de cinq atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)_n$. La molécule de base est l'isoprène.

Ils sont généralement absorbés par le corps via la voie orale, transdermale ou par inhalation et certains sont facilement métabolisés par oxydation, hydroxylation et la conversion en glucuronides ou en sulfates (**Bouyahya et al., 2016**)

Les terpénoïdes sont des analogues des terpènes contenant un oxygène. Selon le nombre de sous-unités de l'isoprène, il y a : les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30) et les poly-terpènes (**Cheurfa et Allem, 2017**) (**Figure N°02**).

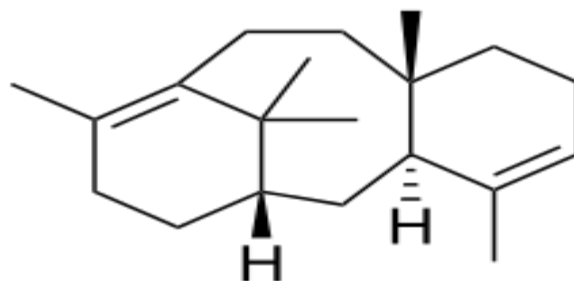


Figure N°02: Structure générale d'un di-terpène.

c. Les polyphenols

Les polyphenols constituent une famille de composés qui sont omniprésents dans le règne végétal. Les nombreuses propriétés de ces composés relatives à la santé, largement décrites dans des études épidémiologiques, sont principalement fondées sur leurs activités anti oxydantes : ils peuvent piéger les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et sont même des chélateurs de certains ions métalliques (**El-Haci et al., 2012**).

Leur définition était traditionnellement basée sur les caractéristiques structurales et la précipitation des protéines, mais ces dernières années, elle a nettement été révisé, en tenant compte des caractéristiques structurales et des voies de biosynthèse (**Beščak-Cvitanović et al 2018**).

Les effets bénéfiques des polyphénols végétaux naturels sur le corps humain ont été évalués dans un certain nombre de projets de recherche scientifique. Les polyphénols réduisent la morbidité et/ou ralentissent le développement des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives ainsi que du cancer. Ils ont tendance à réduire le pool d'espèces réactives de l'oxygène. Des études scientifiques présentent la capacité des polyphénols à moduler le système immunitaire humain en affectant la prolifération des globules blancs, ainsi que la production de cytokines ou d'autres facteurs qui participent à la défense immunologique (**Gorzynik, 2018**). Cela dépend largement de leur biodisponibilité, absorption et métabolisme (**Bureau, 2017**).

➤ Classification

Les composés phénoliques constituent l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires présents dans les plantes. Les polyphénols ne comprennent pas seulement une grande variété de molécules qui ont une structure polyphénols (c'est-à-dire plusieurs groupes hydroxyle sur des cycles aromatiques) mais aussi des molécules avec un cycle phénol, comme les acides phénoliques et les alcools phénoliques. Leur diversité et leur large distribution dans les plantes ont conduit à différents façons de catégoriser ces composés naturels (**Gorzynik-Debicka et al., 2018**). Les polyphénols ont été classés selon leur source d'origine, leur distribution naturelle, leur fonction biologique et leur structure chimique.

- **Acide phénolique**

Les acides phénoliques sont divisés en acides hydroxyles benzoïques et hydroxyles cinnamiques. Les acides phénoliques contribuent à un tiers des polyphénols alimentaires et sont présents dans toutes les plantes ; cependant, on les retrouve en abondance dans les fruits acides. Les principaux exemples de ces composés sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide férulique (**Kesavan et al., 2018**) (**Figure N°03**).

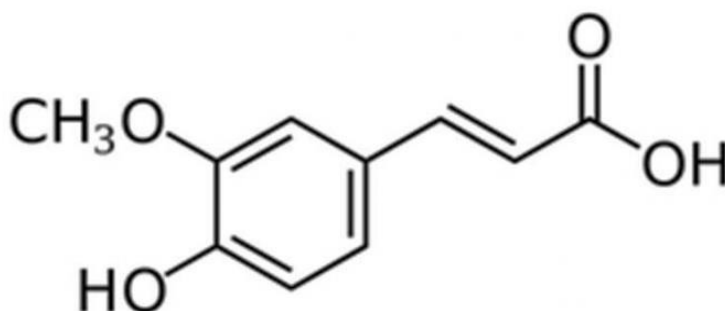


Figure N°03: Structure générale de l'acide phénolique.

- **Flavonoïde**

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont consommés quotidiennement sous forme de fruits, de légumes et de boissons telles que le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, notamment des propriétés anti-oxydantes, vasculo-protectrices, anti hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti-tumorales significatives.

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (**Ghedira, 2005**) (**Figure N°04**).

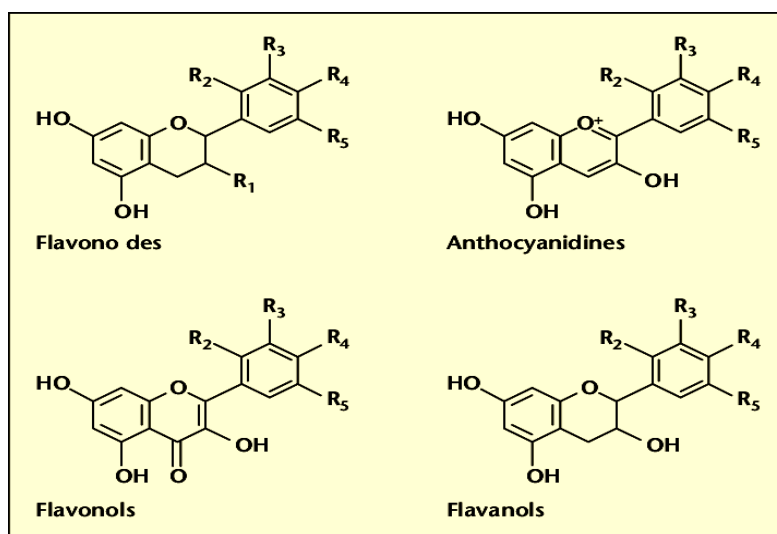


Figure N°04: Structures de bases de quelques flavonoïdes.

- **Tanin**

Les tanins sont des polyphénols végétaux hydrosolubles qui précipitent les protéines. Selon leur structure chimique, ils peuvent être divisés en tanins condensés et tanins hydrolysables (**Figure N°05**). Au total, les tanins auraient divers effets physiologiques comme des effets anti-irritants, antisécrétoïques, antiphlogistiques, antimicrobiens et antiparasitaires (**Westendarp, 2006**).

Ils représentent un groupe diversifié de composés phytochimiques avec de nombreux effets bénéfiques pour la santé. Ils se trouvent principalement dans les vacuoles des végétaux souvent associés à des protéines, à des alcaloïdes ou à des oses sous forme de tannoïde. Ils ont une masse molaire allant jusqu'à 20000 D et leur chimie varie en fonction de leur source. Leur distribution et leur concentration sont très différentes dans les différentes parties d'une plante. Les tanins ont attiré l'attention des scientifiques pour leurs effets bénéfiques en raison de leur capacité antioxydante car elle peut réduire les dommages oxydatifs qui sont une caractéristique majeure de presque toutes les maladies (**Hussain et al., 2019**).

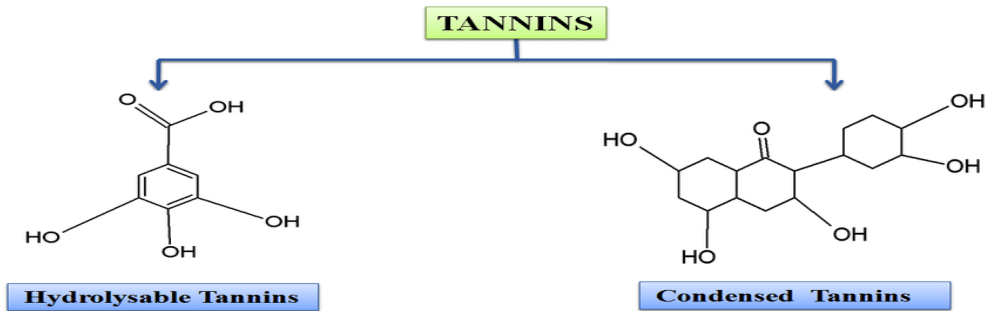


Figure N°05: Base structurale des deux types de tanins.

❖ Tanin hydrolysable

Dites pyrogalliques donnent après hydrolyse à chaud à l'aide de solutions acides étendues, une fraction glucidique (glucose) et une fraction poly phénolique (acide gallique, acide di gallique ou ellagique) (Doat, 1978).

❖ Tanin condensé

Dites non hydrolysable qui rougissent par oxydation et donnent du pyrocatechol (Bouchet, 2019). Au lieu de conduire à des produits plus simples, il donne au contraire des composés encore plus condensés (Doat, 1978).

• Coumarine

Les coumarines représentent un groupe de substances phénoliques polymères qui se trouvent dans presque chaque partie de la plante (Cheurfa et Allem, 2017). Une coumarine est un solide cristallin blanc avec une odeur de foin neuf. Sa structure chimique se compose de neuf atomes de carbones organisés sous forme d'un anneau aromatique fusionné à une lactone cyclique insaturée (Ford et al., 2001) (Figure N°06). Ils se rencontrent à l'état libre ou à l'état de combinaison hétérosidique dans un certain nombre de familles botaniques (Duquenois, 1967).



Figure N°06: Structure générale des coumarines.

2.1. Description botanique

Le grenadier ou le *Punica granatum* fait partie des espèces médicinales. Il appartient à la famille de *Punicaceae*. C'est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 6 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée. Le fruit de grenadine (feuille, écorce et graine) est riche en composés phénoliques (Lairini et al., 2014) (Photo N°01).



Photo N°01: Représentation photographique du grenadier.

2.2. Nomenclature

La grenade « *Punica granatum L* » porte aussi l'appellation en français de : grenade, pomme grenade, grenadier (nom de l'arbuste, la grenade étant le fruit du grenadier), grenadier commun, en anglais pomegranate et en arabe romane (Gruffat 2017)

2.3. Classification botanique

La classification systématique de la grenade est la suivante :

Règne	: plantae
Embranchement	: spermatophyta
Sous embranchement	: magnoliophyta
Classe	: magnoliopsida
Ordre	: myrtales
Famille	: punicaceae (actuellement lythracée) (Vincent et al., 2019)
Genre	: <i>Punica</i>
Espèce	: <i>granatum</i> (Douaouri, 2018).

2.4. Répartition géographique

Le grenadier est originaire de l'Asie Mineure et de l'Europe du Sud-Est. Il est connu depuis fort longtemps. À preuve, il était considéré comme un arbuste sacré dans l'ancienne Égypte et en Palestine. Aux États-Unis, il pousse très bien dans les chauds déserts de la Californie. Dans les contrées plus froides, il peut se développer, mais ses fruits n'atteindront la maturité que s'il jouit d'une longue période de chaleur et d'un arrosage abondant (Philippe 2015) (Figure N°07).

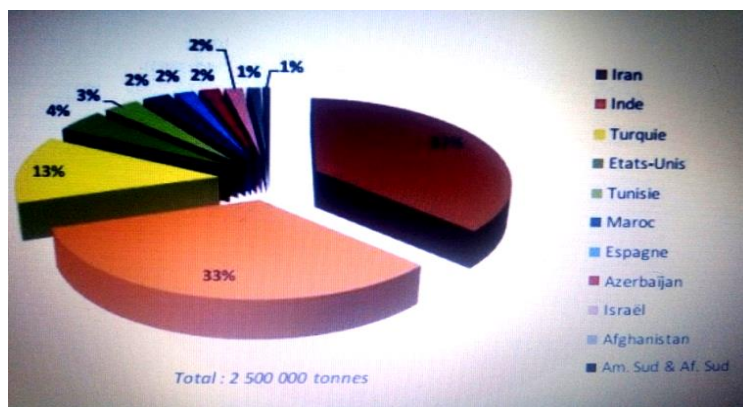


Figure N°07: Répartition de la production mondiale de grenade (Estimation, 2012).

2.5. Biologie du grenadier

Le grenadier (*Punica granatum* L) est un arbre fruitier de la famille des *Punicaceae*. C'est un arbuste des régions méditerranéennes cultivé dans la plupart des régions chaudes ou à hiver doux qui peut atteindre 6 m de haut. Son écorce dure est de couleur rouge ou jaune-beige. Ses feuilles sont caduques, ovales, luisantes, sans poils ni dents et sont opposées par deux. Elles mesurent 3 à 7 cm de long sur 1 à 2 cm de large. Il possède des fleurs rouge pourpre ou grenat d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupes de deux ou de trois au sommet des branches. Le fruit, dénommé la grenade, est une grosse baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'un pamplemousse. Ce fruit renferme de nombreuses graines de couleur rose à rouge (Chebaïbi et al., 2011 ; Bidri et Choay, 2016) (Figure N°08).



Figure N°08: Représentation photographique de *Punica granatum*.

a- Fruit, b-grain et c- fleur.

2.6. Usage du grenadier

Le grenadier est un arbre qui comporte des composants destinés à des usages divers comme :

- Le fruit qui est consommé et était autrefois pressé pour obtenir la grenadine.
- Les feuilles qui sont employées comme hémostatique alors que l'écorce du tronc et de la racine, ont des propriétés vermifuges.
- Les fleurs macérées dans du lait de chamelle, guériraient des dartres du visage mais à condition que les fleurs soient tombées rouges d'un arbre ne portant pas de fruit. Alors que les fleurs sèches seraient, en thérapeutique traditionnelle, employées à usage interne en infusion ou en décoction comme astringent et à usage externe en application comme collutoires.
- La poudre de fleurs et d'écorce s'emploie comme dentifrice pour fortifier les dents et guérir les saignements des gencives. Cette même poudre additionnée de charbon de bois et de « noix de galle » sert pour sécher et cicatrifier les plaies purulentes (**Chauvet, 2013**).

2.7. Propriétés biologiques

La grenade, fruit consommé depuis des millénaires, connaît un regain auprès des scientifiques et des consommateurs. En effet, ce fruit, en plus de sa grande valeur nutritionnelle, constitue une source importante de minéraux, de vitamines et de polyphénols composés essentiellement de tanins, d'anthocyanes et de flavonoïdes. L'utilisation médicinale de la grenade est très ancienne, mais ces deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été réalisés sur ce fruit,

qui tendent à démontrer que les polyphénols de grenade posséderaient des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antibactériennes intéressantes. De ce fait, la grenade est maintenant proposée comme adjuvant dans la prise en charge de certaines pathologies comme les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Chez les diabétiques souffrant de maladies coronariennes, les polyphénols pourraient améliorer l'irrigation du myocarde et aider à réduire les dépôts artérioscléreux dans la carotide ainsi qu'ils inhibent *in vitro* et *in vivo* la prolifération de nombreuses lignées tumorales (**Bidri et Choay, 2017**).

Par le biais des activités anti-inflammatoires du grenadier, ce dernier permet de réduire le processus inflammatoire et de stimuler les processus de défense de l'organisme ainsi qu'il permet de combattre les vers intestinaux (le ténia, l'ascaris, le bothriocéphale) ; Comme il peut avec ses propriétés astringentes resserrer les tissus et les muqueuses, tout en réduisant les saignements et les sécrétions hémostatique en arrêtant l'écoulement du sang et favorisant la coagulation. Il est également réputé pour son efficacité contre les diarrhées banales et infectieuses, les ulcères gastriques, les coliques intestinales, les maux et les irritations au niveau de l'estomac, la dysenterie. Il est utilisé pour le traitement des toux persistantes, de l'arthrite, de la polyarthrite rhumatoïde, des leucorrhées et des métrorragies. Le grenadier est caractérisé par des actions antioxydantes qui retardent le vieillissement des cellules, en offrant, par ailleurs, une protection contre le vieillissement cutané prématuré (**Percheron, 2018**).

Aujourd'hui, les scientifiques s'y intéressent de plus près. Ses arilles, riches en vitamine C, contiennent aussi les vitamines A, E, B1, B2, B6 et B9, des sels minéraux et des oligoéléments. Mais ce qui retient surtout l'attention est sa grande richesse en polyphénols, qui sont des molécules antioxydantes dont le type anthocyane donne en l'occurrence sa couleur rouge rubis à la grenade (**Danko, 2018**).

3.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ce sont des espèces chimiques instables, très réactives, et possèdent un temps de demi-vie extrêmement courte (10^{-9} – 10^{-6} S) (Tessier et Marconnet, 1995).

3.1.1. Origine

Le dioxygène de l'air est un élément indispensable à la respiration des organismes dits aérobie dont l'homme fait partie. C'est une molécule très pro-oxydante qui conduit à la production de dérivés très nocifs : les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (Figure N°09). Plusieurs mécanismes peuvent former ces espèces : la peroxydation lipidique, l'activité du système immunitaire et d'autre. Mais la principale cause de formation reste la respiration cellulaire, la chaîne de réactions qui a pour but de produire de l'énergie à partir du glucose et des acides gras (Rondini, 2018).

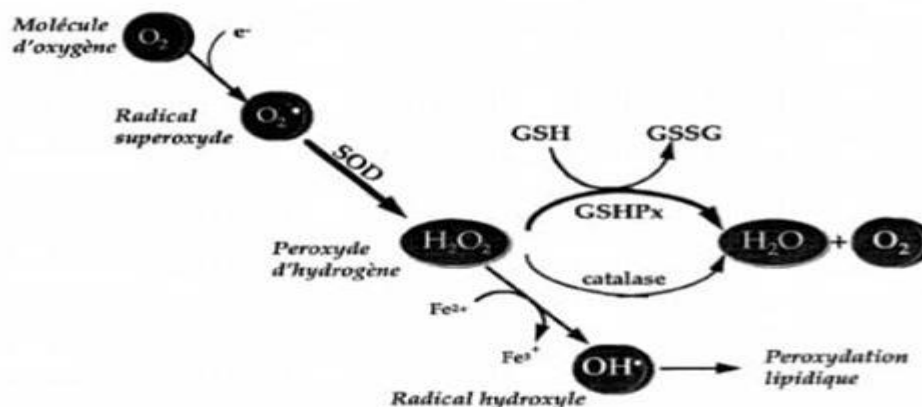


Figure N°09: Les principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.

(Goudable & Favier, 1997).

a. Source endogène

Ils sont produits naturellement de façon interne par le métabolisme de notre organisme. La mitochondrie est la source de production majeure d'O^{2•} dans la cellule intacte. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par la même à l'intensité d'oxygénation.

Plusieurs autres systèmes enzymatiques produisent des radicaux libres au cours de réaction biochimiques (xanthine oxydase, hème oxygénase, cytochrome P450...). Une autre espèce radicalaire le monoxyde d'azote (ou NO•) est elle aussi produite par des systèmes enzymatiques que sont les différentes NO Synthases (ou NOS) à des fins de médiation cellulaires.

Une autre source importante de radicaux est les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones.

Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) des radicaux hydroxyles très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées telles que l'amiante et ou la silice sont aussi des sources de radicaux par la phagocytose exacerbée qu'elles déclenchent et aussi car elles sont recouvertes de sels de fer en surface (Dubé, 2016)

b. Source exogène

Sous l'action du rayonnement solaire et des rayons cosmiques, des radicaux libres sont formés dans l'air que nous respirons. Ils sont également impliqués dans ce phénomène : l'ozone atmosphérique, les polluants de toutes sortes y compris les fumées et gaz d'échappement des voitures (SO₂, NO₂, CO), la fumée de cigarette (même celle des autres), les métaux lourds, l'alcool, les aliments frits, les barbecues, les anesthésiques, les vaccins, certains médicaments allopathiques, les solvants, les formaldéhydes, les herbicides, les pesticides, les crèmes et produits rances, les maladies infectieuses et inflammatoires aiguës, les traitements chimiques (chimiothérapies), les déchets radioactifs, et même de simples fluorescents ainsi que les rayons X (Daudier, 1994).

3.1.2. Rôle physiologique

Les EOR de par leur réactivité participent à de nombreuses fonctions telles que la phagocytose et la signalisation cellulaire. Par exemple, au niveau musculaire l'exposition de fibres musculaires au H_2O_2 augmente toutes les caractéristiques de la contraction musculaire. Les EOR participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose, et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire. Enfin, les EOR régulent un nombre de facteurs de transcription tels que l'activator-protein-1(AP-1) et l'heatshock factor-1(HSF-1) qui activent des gènes dits «protecteurs» pour la cellule. En effet, ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou les *heat shock protein* (HSP) contribuant aux processus de réparation et régénération cellulaire.

Cependant, les effets physiologiques des EOR ne s'observent que lorsqu'il existe un équilibre entre ces substances et les antioxydants qui représentent un système de protection cellulaire face à la réactivité des espèces oxygénées (**Koehler-Ramonatxo, 2006**).

Par exemple, les globules blancs utilisent des radicaux libres pour se débarrasser des bactéries et des virus. Notre système de défense se sert du radical superoxyde pour éliminer ces imposteurs. Ils sont chargés d'éliminer les vieilles cellules pour laisser la place à une nouvelle génération de cellules. Au niveau cellulaire, ces radicaux libres semblent être impliqués dans la croissance, la différenciation mais aussi la communication entre les cellules (**par la nutrition.fr 2017**).

3.2. Stress oxydant

«Le stress oxydant» provoque des anomalies métaboliques aux conséquences importantes. Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koehler-Ramonatxo, 2006**).

3.2.1. Conséquences biologiques

L'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant des anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, une prolifération ou mort cellulaire, des troubles immunitaires, une mutagenèse, des dépôts de protéines ou de lipofuschine dans les tissus **(Favier, 2006)**.

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses anti oxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux. Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies. C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées **(Bidie et al., 2011)**.

3.2.2. Les antioxydants

Autour de cette ambiguïté entre danger et nécessité de l'oxygène et des radicaux libres, la nature a développé de puissants systèmes de défenses antioxydants permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme **(Leverve, 2009)**.

Selon les études menées par **Berger en 2006**, un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient. Ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO **(Pincemail et al., 2002) (Figure N°10)**.

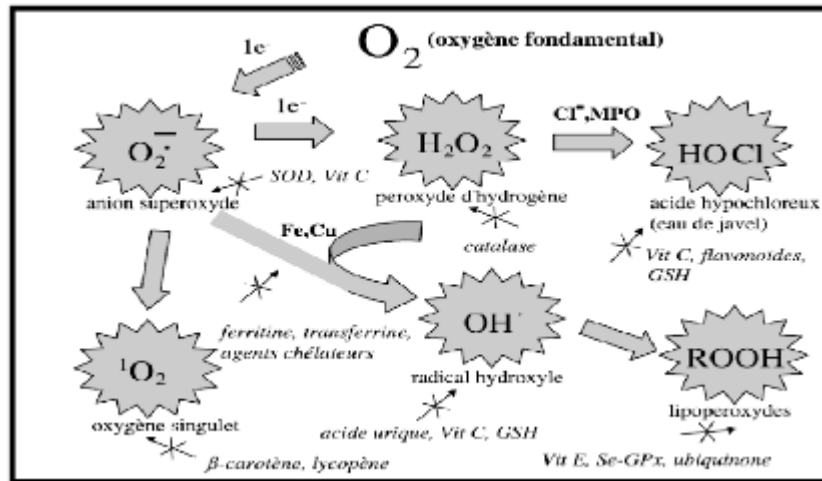


Figure N°10: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses anti oxydantes.

a. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants d'origine alimentaire participent soit directement, soit comme constituants ou précurseurs de défenses endogènes au contrôle du stress oxydant.

Les constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium, agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium). La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en aminoacides tels que la cystéine, le glutamate, la glycine, ou la méthionine. Enfin, le coenzyme Q10, synthétisé par l'organisme à partir du mévalonate, peut également être apporté par l'alimentation (Roussel, 2009).

a. Les antioxydants naturels

Cette production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (super oxyde dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx's), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules

antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'ERO. Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, MnSOD, SeGPx) (Pincemail *et al.*, 2002) (Figure N°11).

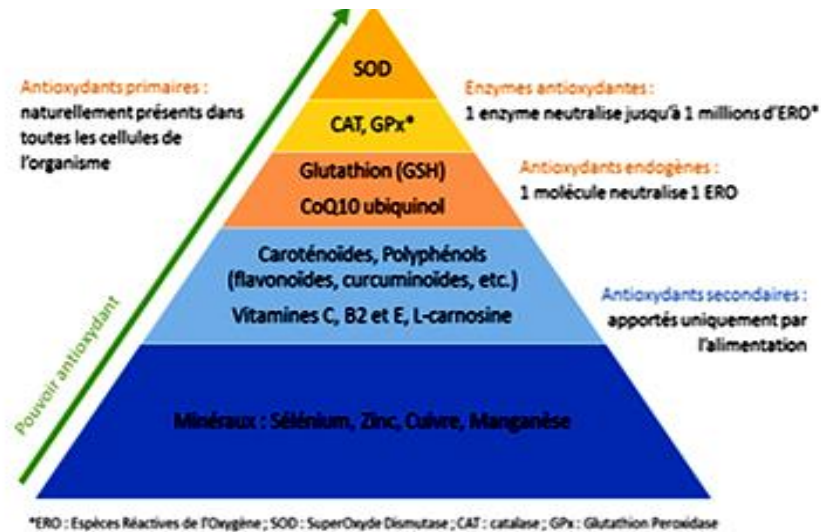


Figure N°11: La gamme d'antioxydants naturels.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par des feuilles de *Punica granatum* (**Photo N°02**) qui sont récoltées dans la Wilaya d'Ain Témouchent, située dans l'ouest d'Algérie. Ces feuilles 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.



Photo N°02 : Les feuilles sèches du grenadier

2. Méthodes

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

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles, des extraits bruts sont préparés.

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°12**).

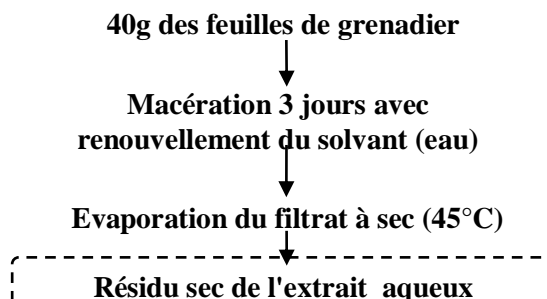


Figure N°12: Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de *Punica granatum*

2.1.2. Extraits bruts eau/Méthanol et eau /Acétone

Selon la méthode d'Upson et coll. (1999), 5 g de la matière végétale séchée sont placées dans un récipient en verre couvert de 100 mL de méthanol aqueux 70% ou 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 3 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°13**).

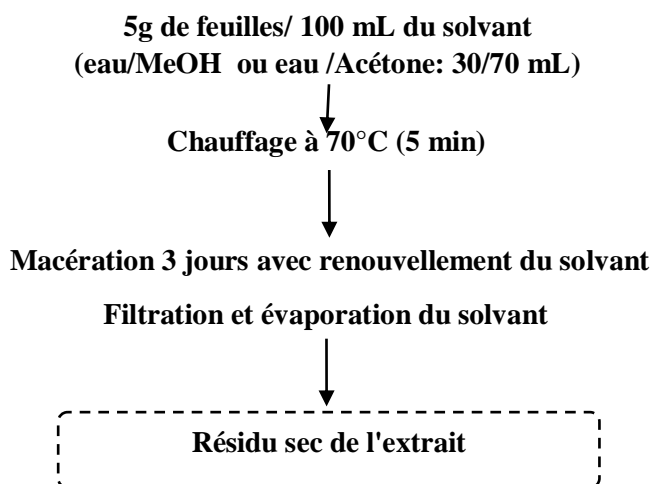


Figure N°13: Schéma de l'extraction eau/méthanol et eau/acétone des feuilles de *Punica granatum*

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 vide avant évaporation ;

P3: poids de la matière végétale initial.

2.2. Tests phytochimiques

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

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

On ajoute 3 gouttes de FeCl_3 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_2SO_4 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 stérols: réaction de Libermann-Burchard**

On traite 1 mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d' H_2SO_4 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 NH_4OH 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'HgCl₂ dans 60 mL d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100mL.

Réactif de Wagner: Dans 75mL d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. 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 polyphénols et des flavonoïdes totaux

2.3.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

Les trois extraits bruts : aqueux, hydrométhanoliques et hydroactéoniques des feuilles 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 polyphénols.

2.3.2. Dosage des polyphénols 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 polyphénols présentes dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

b- Mode opératoire

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

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

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

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

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

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

f : Facteur de dilution (x50)

b : Concentration initiale de l'extrait (1.25 mg/mL)

2.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

a- Principe

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

b- Mode opératoire

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

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0.0045, 0.018, 0.037, 0.075, 0.15, 0.31, 0.625, 1.25 mg/mL).

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

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

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

f : Facteur de dilution (x10)

b : Concentration initiale de l'extrait (1.25 mg/mL).

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

2.4.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

2.4.1.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

2.4.1.2. Mise en œuvre pratique

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözleret al., 2008**.

1mL de l'échantillon à différentes concentrations (0.075, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5 et 10 mg/mL) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%, puis on incube les tubes à 50°C pendant 20 minutes.

- Après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 2.5mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes.

- Prélever 2.5mL du surnageant et ajouter 2.5mL d'eau distillée.
- On ajoute au mélange 500 μ L d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$) à 0.1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme un contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.

2.4.1.3. Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions de feuilles de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

2.4.2. Test de piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl)

2.4.2.1. Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-1picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH \cdot est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH., qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Parejoet coll., 2003**).

2.4.2.2. Mise en œuvre pratique

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al., 1998**.

Un volume de 50 µL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/L) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µL du méthanol avec 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 µL de chaque concentration de l'extrait et 1,95 mL du méthanol.

2.4.2.3. Expression des résultats

□ *Calcul des pourcentages d'inhibitions*

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test effectué

□ *Calcul des concentrations 50 " IC50 "*

IC50 (aussi appelée EC50 pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées en utilisant le logiciel de statistique AAT Bioquest. [(Bertonceljet *al.*, 2007) ; (Marxenet *al.*, 2007) ; (Scherer et Godoy, 2009) ; (Fabriet *al.*, 2009)].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Etude phytochimique

1.1. Dosage qualitatif

Le screening phytochimique est une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides et les composés réducteurs présents dans une drogue donnée (**Bammou et al., 2015**).

Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant des réactions de précipitation, ou sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (**EL-Haoud et al., 2018**).

Chaque extrait des feuilles de *Punica granatum L* de notre étude a été testé pour confirmer la présence de familles de composés phytochimiques en utilisant des réactifs et des produits chimiques. Les résultats du criblage phytochimique sont reportés dans le **Tableau N°01**.

Tableau N°01: Résultats des principaux groupes chimiques recherchés dans les trois extraits des feuilles de *Punica granatum*.

	Aqueux	Eau/acétone	Eau/méthanol
Tanins	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++
Terpénoides	-	-	-
Stérols	-	-	-
Coumarines	-	-	-
Alcaloïdes	+	+	+
Quinones libres	++	++	++
Saponosides	-	-	-
Composés réducteurs	+	+	+

- : absence total

++ : présence en quantité moyenne

+ : présence en quantité faible

+++ : présence en quantité abondante

Notre étude phytochimique des feuilles du grenadier a mis en évidence la présence de plusieurs composés chimiques mentionnés dans le **tableau N°01**. Nous observons que tous les extraits sont très riches en tanins et en flavonoïdes ; tandis qu'une moyenne quantité de quinones libres et une faible quantité de composés réducteurs et d'alkaloïdes ont été enregistrées. Cependant, les tests se sont révélés négatifs pour les terpénoïdes, les stérols, les coumarines et les saponosides.

Punica granatum est une plante médicinale très exploitée pour sa richesse en composés bioactifs et contient une variété de métabolites secondaires (**Belkacem et al., 2014**). Nos résultats sont en accord avec ceux **d'Elfalleh et ses collaborateurs (2012)** qui ont enregistré la présence des tanins et des flavonoïdes dans les deux extraits aqueux et hydrométhanolique. Par contre la révélation des saponosides est contradictoire avec nos résultats obtenus.

La différence des résultats trouvés comparée à d'autres recherches peut être due à plusieurs facteurs tels 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 (**Kallo et al., 2018**).

Les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes et les tanins, sont le principal groupe de composés phytochimiques doués d'activité antioxydante et aux propriétés intéressantes. Ils ont une grande valeur en raison de leurs activités biologiques diverses et leur capacité à éliminer les radicaux libres (**Elfalleh et al., 2012**).

1.2. Dosage quantitatif

Les composés phénoliques sont les antioxydants les plus actifs dans les plantes. Ils sont connus pour agir comme antioxydants non seulement en raison de leur capacité à donner de l'hydrogène ou des électrons, mais aussi parce qu'ils sont également des intermédiaires radicalaires stables (**Kaneria et al., 2011**).

Le choix de quantifier les polyphénols et les flavonoïdes est lié à l'importance de ces substances dans la composition chimique des plantes particulièrement relatée dans les travaux antérieurs chez la plante *Punica granatum* (**Yaici et al., 2019**).

1.2.1. Dosage des polyphenols :

Les polyphenols sont importants et confèrent beaucoup de bienfaits à la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite l'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies. Le dosage des polyphenols totaux est réalisé par la méthode colorimétrique basée sur leurs réactions avec le Folin-Ciocalteu. C'est une quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans les extraits. La formation d'un complexe bleu après incubation confirme la présence des polyphenols qui ont réduit le réactif et qui sont stabilisés par l'addition de carbonate de sodium (NaCO₃). L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphenols (Ali-Rachedi et al., 2018 ; Didi, 2020).

La teneur en polyphenols 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 ($y = 0,6566x + 0,0001$) et un coefficient de corrélation $R^2 = 0,996$ et qui sont représentés sur la figure N°14.

Les résultats de la teneur en polyphenols 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°15).

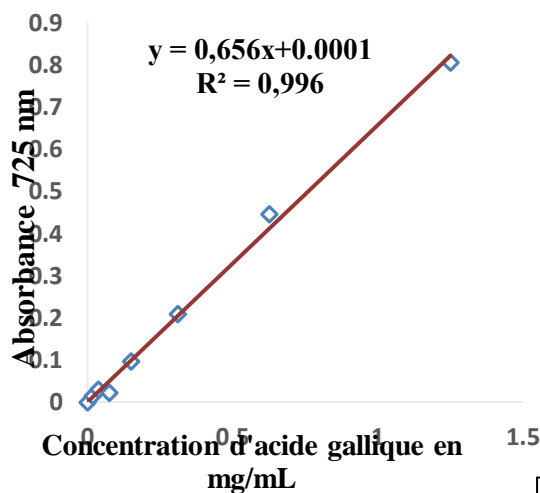


Figure N°14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

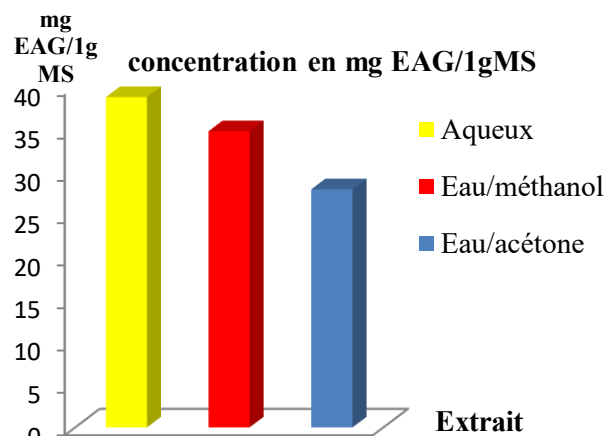


Figure N° 15: La teneur en polyphenols totaux dans les différents extraits bruts des feuilles de *Punica granatum*

Selon les résultats illustrés dans **la figure N°15**, nous remarquons que la teneur en polyphénols dépend de la polarité des solvants utilisés. L'extrait brut aqueux contient la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux estimée à 38.8 mgEAG/g suivi de l'extrait hydrométhanolique avec un taux égale à 34.8 mgEAG/1gMS. Tandis que la teneur la plus faible a été enregistrée dans l'extrait hydro-acétonique (28 mgEAG/g).

Nos résultats obtenus sont contradictoires avec ceux de l'étude effectuée par **Kaneria et ses collaborateurs en 2011** où l'extrait acétonique présentait la teneur la plus élevée en polyphénols totaux. Par contre, la teneur en polyphénols de l'extrait hydrométhanolique déterminée dans notre étude est inférieure à celle rapporté par **Bekir et ses collaborateurs en 2013** qui ont trouvé un taux égale à 127.3 mgEAG/g.

De telles différences peuvent être dues au moment de la récolte, le stade de développement et l'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase (**Bekir et al., 2013**) (**Feng et al., 2019**). Il a été rapporté dans l'étude de **Bammou et ses collaborateurs en 2020**, que le contenu phénolique d'une plante peut aussi dépendre d'un certain nombre de facteurs intrinsèques tels que la partie de la plante utilisée en plus de facteurs extrinsèques.

1.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe prédominante des polyphénols présents dans les aliments, puisqu'ils représentent non seulement près des deux tiers des polyphénols consommés dans le cadre de l'alimentation humaine, mais aussi une source importante d'antioxydants (**Portillo et al., 2012**).

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe brunâtre très stable, entre le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Ali-Rachedi et al., 2018**).

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 ($y = 1,030x + 0,027$) et un coefficient de corrélation de ($R^2 = 0,991$) qui sont reportés sur la **figure N°16**.

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**).

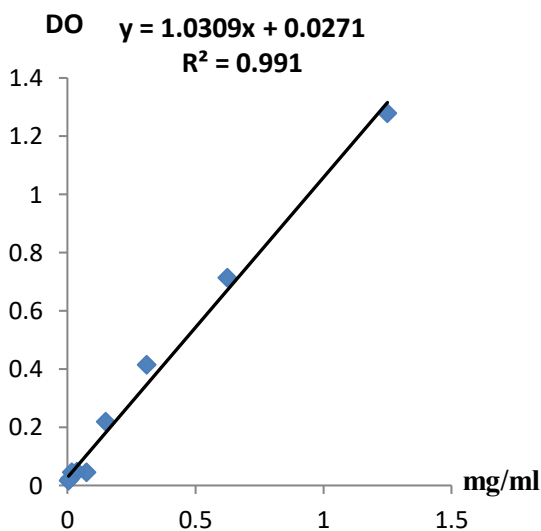


Figure N°16: Courbe d'étalonnage de la catéchine

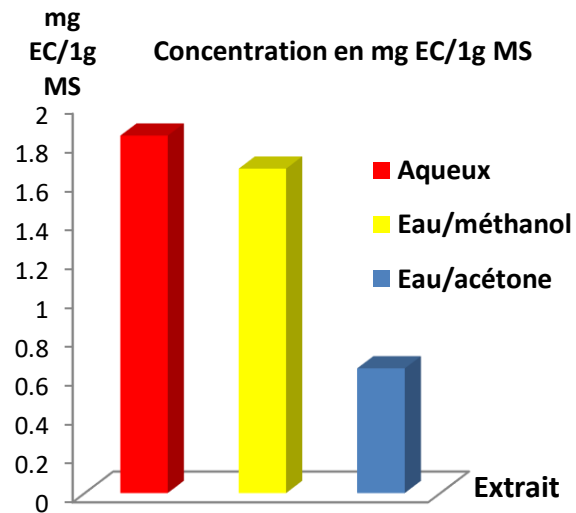


Figure N°17: la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits bruts des feuilles de *Punica granatum*

Les résultats obtenus dans la **figure N°17** montrent clairement que la meilleure teneur en flavonoïdes était obtenue dans l'extrait aqueux avec un taux estimé à 1.84 mg EC/g, suivi par l'extrait hydro méthanolique avec une teneur de l'ordre de 1.67 mg EC /g. Tandis que l'extrait hydro-acétonique présente la plus faible teneur qui est de l'ordre de 0.64 mgEC/g.

L'étude réalisée par **Belkacem et ses collaborateurs (2014)** sur l'écorce de grenade, a montré des teneurs en flavonoïdes estimées à 12.8 ± 2.2 mg EC/g et 30.9 ± 1.6 mg EC/g dans les

extraits hydro-méthanolique et hydro-acétonique respectivement. Ces teneurs restent supérieures à ceux obtenus dans notre étude.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Zhang et ses collaborateurs** en **2010**, qui ont trouvé que les extraits riches des flavonoïdes étaient similaires à ceux des polyphénols totaux. La teneur en flavonoïdes enregistrée dans le jus de *Punica granatum* rapportée par **El-Kar et al.**, (**2011**) dépasse celle des feuilles estimée à 301 mgEQ/g

La variation de la composition chimique des extraits des plantes médicinales peut être due à l'origine, les conditions environnementales, la partie de la plante utilisée et le stade de développement des matières végétales collectées (**EBrahimi et al.**, **2008**).

1.3. Le rendement en extrait sec

La méthode d'extraction utilisée doit permettre une extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (**Turkmen et al.**, **2007**).

Les trois extraits préparés durant l'expérience étaient récoltés sous forme de pâte de couleur verte foncée avec une odeur spécifique caractéristique de la plante.

Le rendement désigne la masse de l'extrait séché exprimé en pourcentage par rapport à 40g de poudre sèche des feuilles de grenadier. Les résultats obtenus sont mentionnés dans la **Figure N°18**.

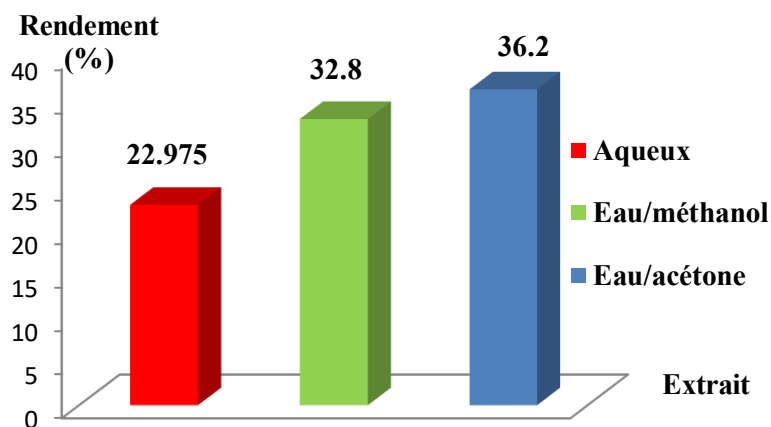


Figure N°18: Le rendement des trois extraits des feuilles du grenadier.

Les rendements des extraits des feuilles de *Punica granatum* obtenus dans **la figure N°18** confirment les résultats du screening phytochimique. Les résultats des extraits bruts des feuilles de grenadier montrent que les rendements les plus élevés sont ceux de l'extrait hydro-acétonique et l'extrait hydro-méthanolique soit 36.2% et 32.8% respectivement, suivis de l'extrait brut aqueux avec un taux égale à 22.97%.

Notre macération a abouti à des rendements différents selon le solvant, la solubilité et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Cela est approuvé par l'étude de **Bekir et son équipe en 2013** et **Koné et ses collaborateurs en 2017**. Cette variabilité peut être influencée par la durée de séchage du matériel végétal, la granulométrie du broyat, le ratio volume de solvant sur masse de broyat, la durée de macération et la vitesse d'agitation (**Koné et al., 2017**).

2. Activité antioxydante

Un antioxydant à faible concentration comparé à un substrat oxydable peut éliminer des radicaux libres réactifs et empêcher ou retarder l'oxydation de d'autres molécules et peuvent donc avoir des effets bénéfiques sur la santé et la prévention des maladies liées au stress oxydatif (**El Kar et al., 2011 ; Agbodan et al., 2014**).

Dans le cadre de l'étude prospective de sources intéressantes d'antioxydants d'origine naturelle, nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles de *Punica granatum*. Donc, il est nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes pour connaître la capacité antioxydante des extraits étudiés dont la mesure du pouvoir réducteur du fer et le test de piégeage du radical DPPH.

2.1. Réduction du fer « FRAP » (*Ferric reducing-antioxydant power*)

C'est une méthode colorimétrique simple et rapide liée à l'oxydoréduction pour l'évaluation de l'activité antioxydante. La détermination de cette dernière est basée sur la capacité des polyphenols à réduire le complexe fer ferrique Fe³⁺/ferricyanide de couleur jaune à la forme fer ferreux Fe²⁺/ferricyanide de couleur bleu-vert, qui pourrait être surveillé à 700 nm (**Didi 2020**).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles de grenadier par la méthode de FRAP. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait comparé à l'acide ascorbique et qui sont représentés dans **la figure N°19**.

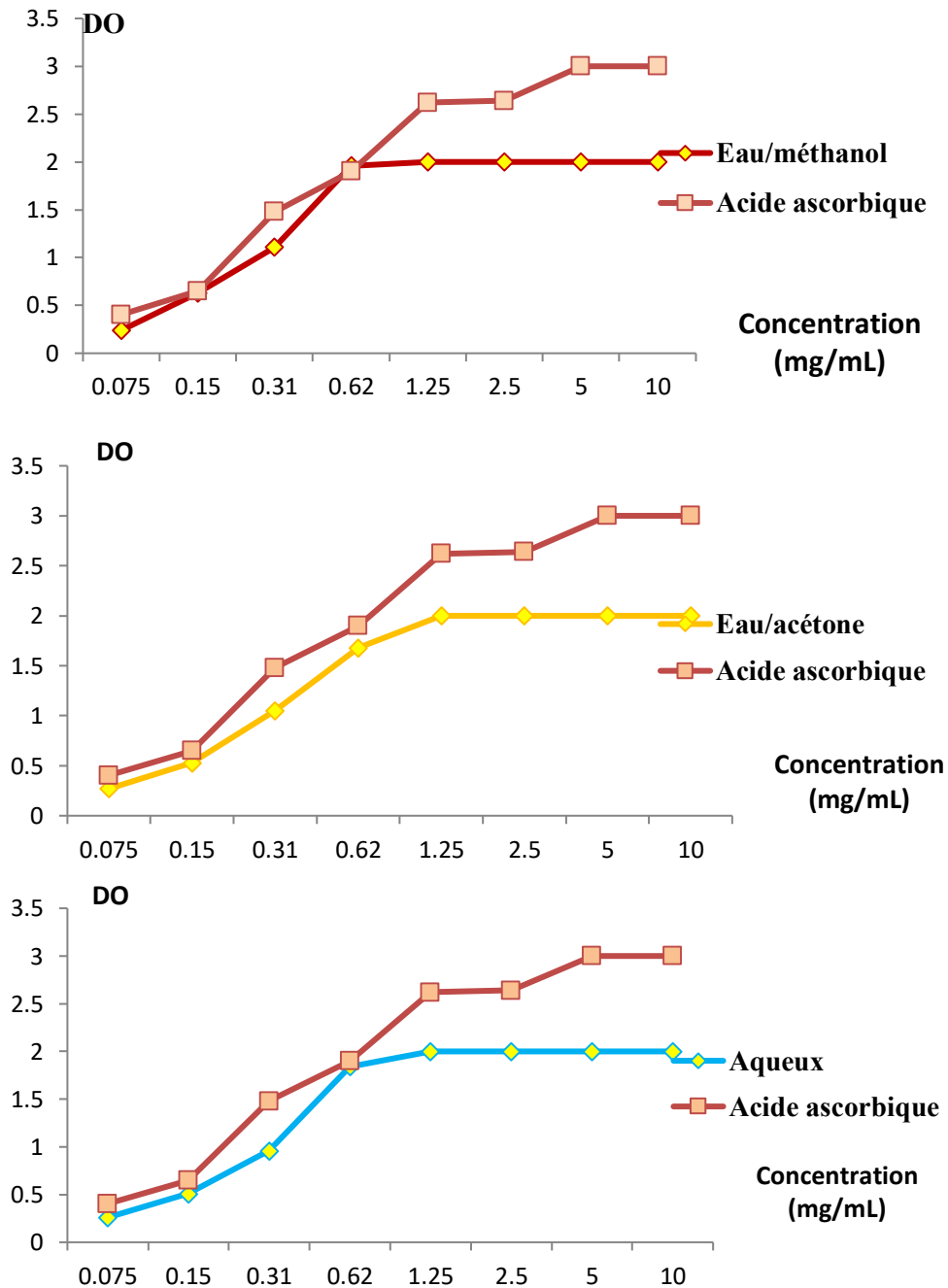


Figure N° 19: Variation du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Punica granatum* comparé à l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

D'après les résultats représentés dans **la figure N°19**, nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation des concentrations des trois extraits ou de l'antioxydant standard à savoir l'acide ascorbique.

Les résultats de l'activité antioxydante des trois extraits restent relativement inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. Nous observons aussi que les trois extraits présentent une réduction totale de fer (DO=2) dès la concentration 1.25mg/mL.

Nous pouvons donc classer les différents extraits par ordre décroissant de leur pouvoir réducteur de fer à une concentration de 0.31mg/mL comme suit : l'acide ascorbique > extrait hydro-méthanolique>extrait hydro-acétonique>extrait aqueux.

D'après nos essais, l'acide ascorbique présente une meilleure réduction du fer par rapport à l'extrait aqueux cela est approuvé par l'étude de **Dassprakash et ses collaborateurs (2012)**.

Selon l'étude menée par **l'équipe de Zhang en 2010**, l'activité antioxydante des feuilles de grenadier était significativement corrélée avec le taux de phénols et de flavonoïdes totaux.

La purification des extraits bruts contenant un grand nombre de composés différents contribue de manière plus efficace à l'augmentation de l'activité antioxydante (**Yaici et al., 2019**).

L'activité antioxydante dépend généralement du nombre et de la position des groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels. La structure des composés phénoliques est un facteur déterminant du piégeage des radicaux libres qui sont considérés comme des agents pathogènes dans de nombreuses maladies. Certains de ces composés sont capables de chélater le fer, et donc de réduire son excès (**Oouldyarou et al., 2018 ; Bammou et al., 2020**).

2.2. Piégeage du radical libre « DPPH »

La méthode de piégeage du radical libre DPPH est une procédure commune et efficace utilisée pour déterminer l'activité antiradicalaire dans laquelle l'activité antioxydante de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH. Sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction. Ce chromogène est facile à utiliser, a une grande sensibilité, et permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (**Oouldyarou et al.,**

2018). Les trois extraits des feuilles du grenadier étudiés ont été testés par rapport à un control positif à savoir l'acide ascorbique. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir des valeurs de DO obtenus et nous ont permis de tracer les courbes représentés dans la **figure N°20**.

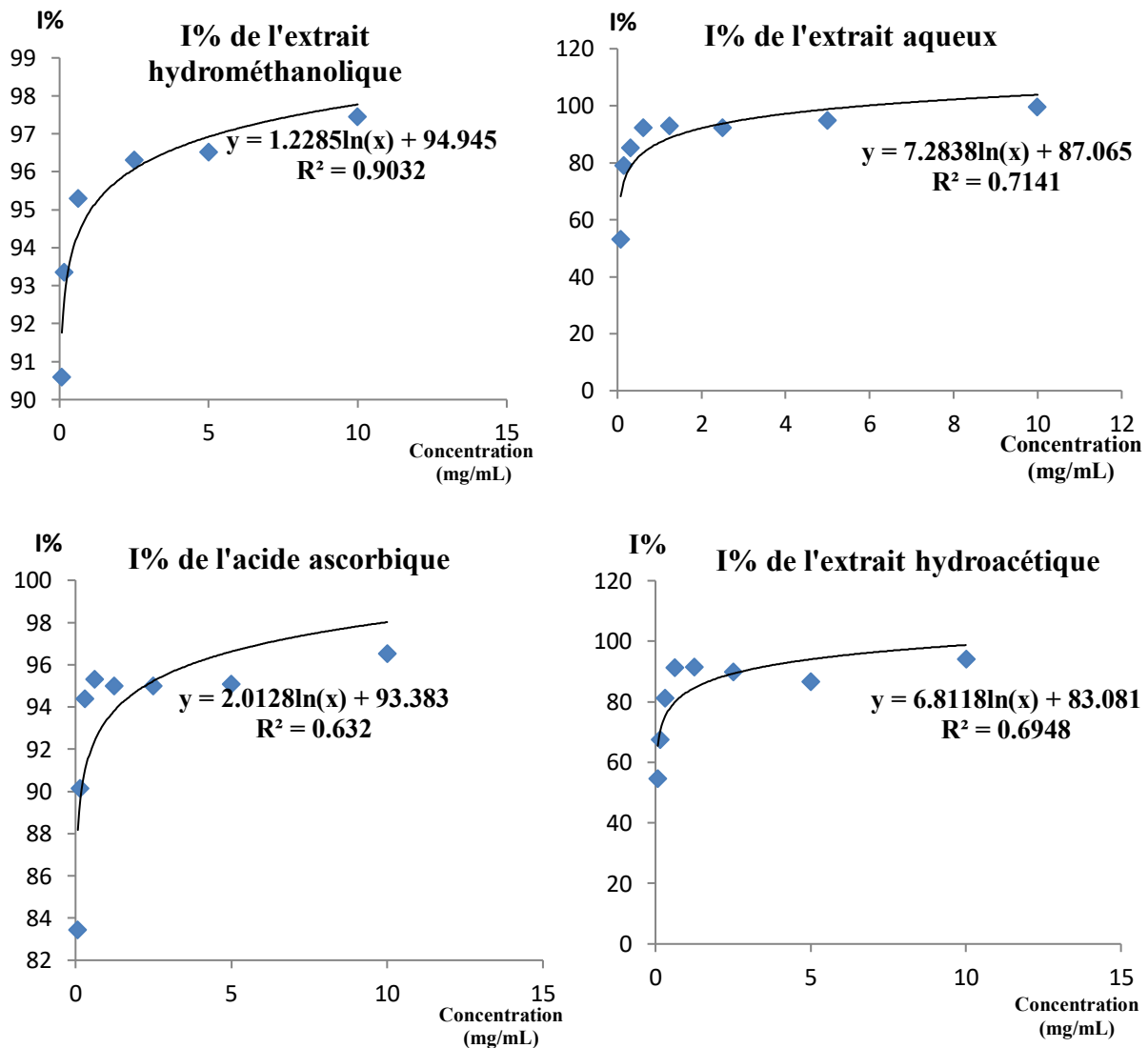


Figure N°20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH· en fonction des concentrations des extraits de feuilles de *Punica granatum*.

D'après les résultats représentés dans la **figure N°21**, il apparaît que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres augmente avec l'augmentation de la concentration du standard l'acide ascorbique, et des différents extraits de la plante. Ceci prouve que tous les extraits sont capables de décolorer le DPPH.

A la concentration de 10mg/mL, le pourcentage d'inhibition des radicaux libres des deux extraits aqueux et hydrométhanolique est supérieur à celui de l'acide ascorbique et de l'extrait hydro-acétonique. A cette concentration, les pourcentages d'inhibition du DPPH sont estimés à 99.48%, 97.44% , 96.52 et 94.17 pour l'extrait aqueux, l'extrait hydrométhanolique, l'acide ascorbique et l'extrait hydro-acétonique respectivement.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC50. Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH (Couleur). Ces IC50 sont déterminés à partir des graphes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en utilisant le logiciel de statistique AAT Bioquest.. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau N°02**.

Tableau N°02 : Les valeurs des IC50 des différents extraits des feuilles de *Punica granatum* et de l'acide ascorbique

Extraits	IC50
Eau/méthanol	0.020
Aqueux	0.021
Acide ascorbique	0.120
Eau/acétone	0.158

L'analyse des données obtenues a indiqué que l'extrait hydrométhanolique à la valeur d'IC50 (0.020 mg/mL) la plus importante par rapport aux autres extraits suivi par l'extrait aqueux avec un IC50 estimé à 0.021 mg/mL. Cependant l'acide ascorbique et l'extrait hydro-acétonique restent largement inférieurs aux deux extraits précédents avec des IC50 égales à 0.120 mg/mL et 0.158 mg/mL respectivement.

Sachant qu'une faible concentration d'IC50, entraîne une forte activité antioxydante. L'extrait hydrométhanolique s'est avéré contenir une grande quantité de polyphénols et présente une énorme capacité de réduction de fer ainsi qu'une puissante capacité antioxydante dans le système de piégeage du radical DPPH. Ce résultat semble confirmer celui de **Bekir et ses collaborateurs (2013)** dont l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique est supérieure à tous les extraits testés avec la plus faible valeur d'IC50.

Nos résultats concordent avec l'étude menée par **Elfalleh et son équipe (2012)** sur les feuilles du grenadier, dont l'extrait hydro-méthanolique a présenté une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait aqueux.

Kaneria et ses collaborateurs en 2011 ont trouvé dans leur étude des résultats semblables aux notre et qui montrent que l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux est plus intéressante que celle de l'extrait acétonique malgré la différence des méthodes d'extraction et des solvants utilisés.

Enfin, la capacité de balayage du DPPH des différents extraits pourrait être attribuée à la présence des composés phénoliques (**Bammou et al., 2020**). L'influence de la nature du solvant sur l'activité antioxydante a été déjà mise en lumière dans la littérature. En outre, la variation des IC50 peut s'expliquer par la quantité et le type de phytoconstitués présents dans les extraits (**Koffi-Tanoh et al., 2018**).

CONCLUSION GÉNÉRALE

De nos jours, les herbes sont largement utilisées à des fins de recherche et possèdent plus d'une entité chimique. Ces plantes utilisées en médecine traditionnelle représentent une source importante de composés bioactifs secondaires responsables de plusieurs propriétés biologiques.

Punica granatum communément appelée grenadier, est un arbre domestiqué utilisé depuis l'Antiquité pour ses nombreux bienfaits pour la santé. Toutes les parties de cet arbre sont utilisées dans la médecine populaire.

Les feuilles du grenadier sont une source importante de composés bioactifs potentiellement sains qui ont été étudiées pour leur composition chimique. Elles peuvent être considérées bénéfiques pour une enquête plus approfondie. Une recherche typique et un travail de développement doivent être effectués pour toute utilisation thérapeutique et commerciale.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail qui a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts préparés par macération des feuilles du grenadier de la wilaya d'Ain Témouchent. Il a été noté que ces extraits sont riches en métabolites secondaires tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les quinones libres et les composés réducteurs. Les dosages colorimétriques ont montré de fortes concentrations en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait aqueux. Le potentiel antiradicalaire des extraits a été déterminé par les méthodes de FRAP et de DPPH, dont les résultats montrent que les extraits possèdent une bonne activité antioxydante. Cependant, l'extrait hydro-méthanolique présente la plus importante activité de réduction de fer et de piégeage du radical libre DPPH avec un IC₅₀ égale à 0.020 mg/mL. L'activité antioxydante des feuilles du grenadier était significativement corrélée avec le niveau de phénols et de flavonoïdes totaux.

La qualité des résultats obtenus nous mènent à penser à mieux valoriser et exploiter ses polyphénols dans plusieurs domaines. La présence de bioactifs indique que l'extrait des feuilles du grenadier peut être utilisé de multiples façons pour le traitement d'une population.

Au vue des effets obtenus *in vitro*, les perspectives médicinales des extraits des feuilles de *Punica granatum* sont donc très prometteuses mais les essais *in vivo* et d'autres tests cliniques manquent. Cette étude pourrait être complétée par d'autres essais afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Agbodan Kokou Agbékonyi, Dotse Kokouvi et Kossi Honoré Koumaglo. (2014).** Activités antioxydantes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques acclimatées au Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8(3): 1103-1110, June 2014. . Available online at <http://ajol.info/index.php/ijbcs>.
- **Ali-Rachedi Fahima, Meraghni Souad, Nourhène Touaibia & Sabrina Mesbah. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *ScabiosaAtropurpureasub. Maritima L.* Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège Volume 87.
- **Auguste Jacques Alfred BognanAckah ,Kouamé Raphael Oussou, Djédoux Maxime Angaman, Bini KouaméDongui , Allico Joseph Djaman, Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie (2016).** Activité antimycosique et screening phytochimique des différents extraits de *Terminaliacatappalinne* un antifongique de source naturelle.
- **Bammou M. Bouhlali • E.D.T. Sellam K. • L. El-Rhaffari • J. Ibijbjen • L. Nassiri. (2020).** Evaluation of the Antioxidant and Antibacterial Activity of the Aqueous Extract of Leaves and Flowers of *Bituminaria bituminosa (L.)Stirton.* © Lavoisier SAS 2020. *Phytothérapie* DOI 10.3166/phyto-2020-0226.
- **Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E., Ibijbjen, J., &Nassiri, L. (2015).**Valorisation du lentisque «*Pistacialentiscus L*»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences*, 86(1), 7966. doi:10.4314/jab.v86i1.4.
- **Bekir Jalila, Mars Mohamed, Jean Pierre Souchard , Jalloul Bouajila . (2013).** Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punicagranatum*) leaves.*Food and ChemicalToxicology* 55 (2013) 470–475.
- **Belkacem, N., Djaziri, R., Lahfa, F., El-Haci, I. A., &Boucherit, Z. (2014).** Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of various *Punica granatum* l. Peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie*, 12(6), 372–379. doi:10.1007/s10298-014-0850-x.

- **Belščak-Cvitanović Ana Ana, Ksenija Durgo, Ana Huđek, Višnja Bačun-Družina, Draženka Komes. (2018).** Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications.
- **Berger, M. M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition Clinique et Métabolisme, 20(1), 48–53. doi:10.1016/j.nupar.2005.12.005.
- **Bidie Alain Philippe. Banga B. N’guessan, Adou F. YAPO, Jean David N’guessan. Allico Joseph Djaman. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature Vol. 8 N°1: 1 – 11.
- **Bidri, M., & Choay, P. (2016).** Regain d’intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. Phytothérapie.
- **Bouchet . Philippe (2019).** TANINS ou TANNINS. Encyclopædia Universalis.
- **Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2016).** Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d’action. Phytothérapie.
- **Bouzabata, A. (2016).** Les médicaments à base de plantes en Algérie : réglementation et enregistrement. Phytothérapie.
- **Bureau, L. (2017).** Microbiote et plantes (partie 2) : interactions métaboliques, polyphénols et santé. Phytothérapie.
- **Carvalho Alexandra ; Heimfarth Luana; Klécia Anjos; Adriana Gibara ; Laurent Picot ; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ; Jullyana de Souza Siqueira Quintans ; Lucindo José Quintans Junior. (2019).** Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms - a systematic review.
- **Chauvet. Michel (2013).** *Punica granatum* L. Punicacées (Le Floc'h, 1983). II/sans n°; p:552] PUNICACÉES.
- **Chebaibi A, F. Rhazi Filali, A. Amine, M. Zerhouni. (2011).** Effet et bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum L.*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. phytothérapie.
- **Chemli R. (1997).** Plan tes médicinales et aromatiques de la flore de Tunisie. In : Heywood V.H. (ed.), Skoula M. (ed.). Identification of wild food and non-food plants

- of the Mediterranean region. Chania:CIHEAM, p. 119-125 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 23).
- **Cheurfa, M., &Allem, R. (2017).** Effet des extraits de quelques plantes sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. *Phytothérapie*.
 - **Daudier. Paule (1994).** Source : "Les radicaux libres", Editions JOUVENCE, GENEVE.
 - **Dauta. Jacques (2019).** Plantes médicinales. Encyclopedie universalis. plante médicinale institut européen des substances végétales 2015 2016.page 3.
 - **Diana Danko. (2018).**Alimentarium Magazine : Histoire : La grenade de l'antiquité à aujourd'hui.
 - **Didi. Mohamed (2020).**EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE COFFEE PARCHMENT.ScientificStudy and Research, In press. fhal-02513965f.
 - **Doat. Jacqueline (1978).** LES TANINS DANS LES BOIS TROPICAUX. *Revue Bois et Forêts des Tropiques*, N*182. Page 39.
 - **Douaouri.N. (2018).** Contribution à une étude phytothérapeutique, anti-inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punicagranatum L.*)- Etude in vivo. (Thèse).
 - **Dubé. Jean-Baptiste (2016).** Le Stress oxydant. I.Hininger-Favier, Maître des Conférences des Universités. Docplayer.
 - **Duquénois, P. (1967).** Coumarines et Dérivés: Réparation Dans le Règne Végétal et Biosynthèse. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 7 (4), 1107–<http://www.tandfonline.com/loi/iphb17>.
 - **Ebrahimi, Nejad S., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., &Yousefzadi, M. (2008).**Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, 110(4), 927–931. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.083.
 - **El Kar Chiraz, Ferchichi Ali, Faouzi Attia, and JalloulBouajila. (2011).** Pomegranate (*Punica granatum*) Juices: Chemical Composition, Micronutrient Cations, and AntioxidantCapacity. *Journal of Food Science* Vol. 76, Nr. 6, 2011.

- **Elfalleh Walid, Hannachi Hédia, Nizar Tlili, Yassine Yahia, Nizar Nasri, Ali Ferchichi. (2012).** Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(xx), pp. 4724-4730, Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR>. DOI: 10.5897/JMPR11.995. ISSN 1996-0875 ©2012 AcademicJournals.
- **El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M., & Didi, M. A. (2012).** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*.
- **EL-Haoud Hamid, Boufellous Moncef ; Assia Berrani, Hind Tazougart, Rachid Bengueddour. (2018).** SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MED.
- **Favier, A. (2006).** *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Vol 64, N° 6. Stress oxydant et pathologies humaines.
- **Feng, L., Yin, Y., Yang, X., Tang, H., & Jiao, Q. (2019).** Dynamic Variations in Punicalagin and Related Metabolic Substances in Pomegranate Fruit and Leaves During Development Periods. *The Horticulture Journal*. doi:10.2503/hortj.utt-088.
- **Ford, R. ., Hawkins, D. ., Mayo, B. ., & Api, A. . (2001).** The in vivo dermal absorption and metabolism of [4-14C]coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39(2), 153–162. doi:10.1016/s0278-6915(00)00123-x.
- **Gacioui Fatima, Hadj amar Zinab, Saliha Oussaid. (2013).** Extraction, optimisation et pouvoir antioxydant des polyphénols des feuilles d'oléastre. *Journal de Nutrition & Santé*. Vol 2. num1. <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/2328>.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*.
- **Ghulam Hussain, Jia Huang, Azhar Rasul, Haseeb Anwar, Ali Imran, Javeria Maqbool, Aroona Razzaq, Nimra Aziz, Ehtishamul Haq Makhdoom, Muhsin Konuk and Tao Sun (2019).** Putative Roles of Plant-Derived Tannins in Neurodegenerative and Neuropsychiatry Disorders: An Updated Review.

- **Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Marino Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M.(2018).**Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols.
- **Gruffat. Xavier (2017).** Se soigner par les plantes médicinales. Grenade. CREAPHARMA.
- **Hadj-Seyd, A., Kemassi, A., Hadj Kouider, Y., et Harma, A. (2015).**Traitement de l'infertilité: plantesspontanées du Sahara septentrional. Phytothérapie.
- **Haleng .J, Pincemail .J, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle. (2007).** Le stress oxydant, Rev Med Liège 2007;62; 10.
- **Hopkins W.G., (2003).** Physiologie végétale. De Boeck, Paris, 532p.
- **Kaci-meziane Zoubida, Boutekrabt Linda, Laidoudi Djamila, Moussaoui Tarek, Melahi Nawel, AIT OUARAB Dahbia, Djeghboub Meryam, Meguetoui Asma.(2017).** Évaluation phytochimique, et potentiel antioxydant ,antibactérien de trois cultivars de fruit de grenadier "*Punica granatum l*" DU NORD EST D'ALGÉRIE.
- **Kallo, Souley M., Adamou, R., Sawadogo, J., Ayouba Mahamane, A., Maman Maarouhi, I., &Ikhiri, K. (2018).** Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 12(2), 867.doi:10.4314/ijbcs.v12i2.20.
- **Kaneria, MJ, Bapodara, MB, et Chanda, SV (2011).** Effet des techniques d'extraction et des solvants sur l'activité antioxydante des feuilles et de la tige de la grenade (*Punicagranatum L.*). Méthodes d'analyse des aliments, 5 (3), 396–404. doi: 10.1007 / s12161-011-9257-6.
- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition Clinique et Métabolisme, 20(4), 165–177. doi:10.1016/j.nupar.2006.10.178.
- **Koffi Tanoh V, Christelle Chantal N'GAMAN-KOUASSI, David BOA, JanatAkhanovna MAMYRBEKOVA-BÉKRO, Yves-Alain BÉKRO. (2018).**

- Activité antioxydante des extraits bruts hydroéthanoliques et hydroacétoniques des organes de quatre plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Nature et Technologie.
- **KoudoroYaya Alain, Agbangnan D. Pascal Cokou, Bothon Diane, Bogninou Sophie Reine, Alitonou Guy Alain, AvlessiFelicien, and SohounhloueCodjo Koko Dominique. (2018).** Métabolites secondaires et activités biologiques des extraits de l'écorce de tronc de *Khayasenegalensis*, une plante à usage vétérinaire récoltée au Bénin.
 - **Kouwelton Patrick Franck Olivier Koné, Yaya Soro et SorhoSiaka. (2017).** Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchorneacordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridaxprocumbenslinn* (Asteraceae) Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie . J. Soc. Ouest-Afr. Chim. (2017) 044; 15- 22.
 - **Lairini, S. R. Bouslamti. F. Zerrouq. A. Farah. (2014).** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punicagranatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. Jmat.
 - **Lanutrition.fr Publié le 22/09/2006 Mis à jour le 21/11/2017.** La famille des radicaux libres. la nutrition.
 - **Lassouane N. Belkebir A el Aid F.(2005).**REGULATION DU METABOLISME DES SUBSTANCES PHENOQUES CHEZ LE SOJA.
 - **Lazli Amel, Beldi Moncef, Leila Ghouri &Nour El Houda Nouri. (2019).** «Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous», Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège [En ligne], Volume 88 - Année 2019, Articles, 22 – 43.
 - **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44(5), 219–224. doi:10.1016/j.cnd.2009.09.001.
 - **Linta Vincent, P. L. Anushma, C. Vasugi, A. Rekha, and Banoth Shiva (2019).**Genetic Resources of Tropical Fruits.Division of Fruit Crops, ICAR-Indian Institute of Horticultural Research.
 - **Louis-Philippe(2015).** FICHE TECHNIQUE – GRENADIER NAIN. Société de Bonsai et Penjing de Montréal.

- **Ludovic Rondini. (2018).** LA VÉRITABLE ORIGINE DES RADICAUX LIBRES. BEBOODA.
- **Nga, E. N., KidikPouka, C., Ngo Boumsong, P. C., Dibong, S. D., & Mpondo Mpondo, E. (2017).** Inventaire et caractérisation des plantes médicinales utilisées en thérapeutique dans le département de la Sanaga Maritime: Ndom, Ngambe et Pouma. *Journal of Applied Biosciences*.
- **Ouldyerou k, Righi S, Meddah B et Tir touilB ,Bouhadi D et Hariri A. (2018).** Eude phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes antidiabétique au niveau de la wilaya de mascara. *Journal of Advanced Research in Science and Technology* ISSN: 2352-9989 670 © 2018 JARST.
- **Pallavi Kesavan, Antara Banerjee, Anushka Banerjee, Ramachandran Murugesan, Francesco Marotta, Surajit Pathak. (2018).**An Overview of Dietary Polyphenols and Their Therapeutic Effects. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*.
- **Percheron Marie (2018).** Se soigner avec le Grenadier (*Punicagranatum*)- Renseigner-point com.
- **Piguet Valérie (2019).** Phytothérapie : sous quelles formes ?.Hopitaux universitaires Genève.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., &Defraigne, J.-O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233–239. doi:10.1016/s0985-0562(02)00166-8.
- **Poisson, Jacques E (2019).** Alcaloïdes, *Encyclopædia Universalis*.
- **Portillo, Elvis Grazziani, L. Cros, Emile Assemat, Sophie et al.(2012).** Evolution de la teneur en flavonoïdes du cacao criollo du Vénézuéla en fonction du traitement post-récolte.
- **Roussel, A.-M. (2009).** Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 230–236. doi:10.1016/j.cnd.2009.05.001.
- **Saadaoui Bisma, Jalila Bekir, Josiane Akrou, Salah Ammar, Mehjoub Ali et Mohamed MARS (2006).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Revue des*

- Régions Arides-Numéro spécial- Actes du séminaire international « les plantes à parfums, Aromatiques et Médicinales ».
- **Séverin Mbaihougadobe, Adolphe Christian Ngakegni-limbili, Tsibagouollaly , Paul Ngaïssona, Jean Noel KOANE, Loumpangou Célestine Nkounkou, Yaya Mahmoud, Jean Maurille ouamba.(2017).**Inventaire et essais phytochimiques sur quelques plantes du Tchad utilisées dans le traitement de la goutte.
 - **Tessier, F., & Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. Science & Sports.
 - **Togola Issiaka; Mamadou Abdoulaye Konaré ; Méminata Diakité ; Nouhoum Diarra ; Fatoumata Tounkara ; RokiaSanogo ; and Doulaye Dembélé (2019).**Evaluation of the content of total alkaloids at different stages of development of *Datura innoxia Mill.*, A PLANT USED IN TRADITIONAL MEDICINE IN MALI .American Journal of Innovative Research and Applied Sciences.
 - **Tomislav Meštrović, MD, Ph.D. (2018).**Quelles sont des métabolites ?. NEWS MEDICAL LIFE SCIENCES.
 - **Turkmen, N., Velioglu, Y., Sari, F., &Polat, G. (2007).**Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea.Molecules, 12(3), 484–496. doi:10.3390/12030484.
 - **Velayutham Dassprakash. M. Renganathan Arun. Kumpati Premkumar. Kumpati Premkumar. (2012).** In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of Punicagranatum leaf extract.Journal Pharmaceutical Biology.
 - **Westendarp H. (2006).**Effets des tanins dans la nutrition animale. Europe PMC .
 - **Yaici K. , Dahamna S. • I. Moualek • H. Belhadj • K. Houali. (2019).** Evaluation of the Content of Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Erica arborea L.* (Ericaceae) in Traditional Medicine of Setifian Tell in the East Algerian © Lavoisier SAS 2019 Phytothérapie DOI 10.3166/phyto-2019-0210.
 - **YIESVLIP-RV04 - Mars 2015 – les plantes médicinales .** Institut européen des substances végétales.

- **Zhang Lihua, Yujiao Gao, Yuanhu Zhang, Jing Liu, JunweiYu. (2010).** Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves. *Scientia Horticulturae* 123 (2010) 543–546.