République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et de Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

L'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'écorce et du jus de la grenade *Punica granatum* de Kabylie, variété Lahlou

Travail réalisé par :

M^{elle} : Iskounen Thinhinane

M^{elle} : Tadount Sonia

Devant le jury

President: Mme Bedouhene-Fenane S MCCB UMMTO

Examinateur : Mme Senoussi C MACA UMMTO

Examinateur : Mr Titouche Y MACA UMMTO

Promotrice : Mme SI Ahmed Zennia S MCCB UMMTO

Année Universitaire : 2017-2018

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donnés la santé, la volonté, la foi, et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont aidées et soutenues en particulier :

Notre promotrice : ***Mme ZENNIA S : Maitre de conférences classe B à l'UMMTO****, pour avoir accepté de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

Madame **BEDOUHENE-FENANE S :** ***Maitre de conférences classe B à l'UMMTO****, pour avoir accepté de présider le jury.*

Madame SENOUSSI C : maitre-assistante classe A à l'UMMTO*, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Monsieur TITOUCHE Y : maitre-assistant classe A à l'UMMTO, *pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Enfin, toutes notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- *À toute ma famille en particulier mon père et mes tatas ;*
- *A ma chère amie et sœur Amélia ;*
- *À toutes mes amies en particulier Lina et Sonia ;*
- *À moi-même.*

Thinhinane

Je dédie ce travail :

- *À mes chers parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour ;*
- *À mes frères et sœurs en particulier ma très chère sœur Nora qui a toujours été un exemple pour moi et qui s'est toujours comportée comme une deuxième maman ;*
- *À mes cousins et amis depuis l'enfance Numidia, Cherif, Larbi, Amel, Azzedine et en particulier ma très chère Tinhinane ;*
- *À ma chère voisine Fariza ;*
- *À toutes mes amies en particulier Lina, Saida, Sassia, Soraya ; Henou ;*
- *À ma chère amie et binôme Tina ;*
- *À moi-même.*

Sonia

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Le grenadier……2

1.1. Classification botanique…….....2

1.2. Description du grenadier…….3

1.2.1. La Feuille……..3

1.2.2. La Fleur……4

1.2.3. Le fruit……..4

1.3. Origine et répartition géographique……5

1.4. La culture du grenadier……...6

II. La grenade ……8

2.1. La situation économique de la grenade……..8

2.2. La composition biochimique et la valeur nutritionnelle……8

2.2.1. Le jus……9

2.2.2. Les pépins……....9

2.2.3. La peau……...10

2.3. Les variétés de grenade……11

2.4. Usage de la grenade en médecine traditionnelle……...12

2.5. Autres usages traditionnelles de la grenade……..13

2.5.1. utilisation en teintures ……...13

2.5.2. L'encre……...14

2.6. Utilisation de la grenade dans les produits cosmétiques……...14

III. Les polyphénols……15
3.1. Définition……..15
3.2. La classification des polyphénols……15
3.2.1. Les polyphénols simples……15
3.2.1.1. Les acides phénoliques……15
3.2.1.2. les flavonoïdes……16
3.2.2. Les polyphénols complexes (tanins)……..16
3.2.2.1. Tanins hydrolysables……...16
3.2.2.2 tanins condensés……...16
3.3. Modes d'action des polyphénols……...19
3.3.1. Piégeage des radicaux libres……..19
3.3.2. Chélation des ions métalliques……...20
3.3.3. Inhibition des enzymes……...20
3.3.4 L'action pro-oxydante des polyphénols……...21
3.4. Rôles des polyphénols……....22
IV. Les activités biologiques de la grenade……...22
4.1. L'activité anti-inflammatoire……22
4.2. L'activité anti-oxydante……23
4.3. Prévention des maladies cardiovasculaires……...24
4.4. L'activité antidiabétique……....25
4.5. Activité anti-cancéreuses et anti- tumorale……25
4.6. L'activité antimicrobienne……....26

Deuxième partie : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes……...28
1. Matériel……28
1.1. Matériel végétal……28
1.2. Matériel de laboratoire……...29
1.2.1. Les différents produits chimiques et milieux de culture utilisés……29
1.2.2. Le matériel biologique……29
1.2.3 Les antibiotiques utilisés……..30
1.2.4 L'appareillage……..30
2. Méthodes……...31

2.1. Préparation de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum* ……31
2.2. Détermination du poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus……32
2.3. Détermination du rendement d'extraction…… 32
2.4. Analyses quantitatives des échantillons…… 32
2.4.1. Dosage des polyphénols totaux……...32
2.4.2. Dosage des flavonoïdes……...33
2.4.3. Dosages des tanins condensés…….35
2.4.4. Dosage des tanins hydrolysables…….36
2.5. Analyse qualitative des polyphénols……..37
2.6. Tests des activités biologiques……...38
2.6.1. Test de l'activité antioxydante……... 38
2.6.2. Test de l'activité antimicrobienne……...39
2.6.3. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide…...41
II. résultats et discussion…….42
2.1. Détermination du poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus……42
2.2. Rendement d'extraction…… 42
2.3. L'étude quantitative des polyphénols……42
2.3.1. Dosage des polyphénols totaux……. 42
2.3.2. Dosage des flavonoïdes……. 43
2.3.3. Dosage des tanins condensés…….44
2.3.4. Dosage des tanins hydrolysables…….. .45
2.4. L'étude qualitative des polyphénols……..46
2.5. Tests des activités biologiques……..51
2.5.1. Test de l'activité antioxydante……51
2.5.2. Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne……....52
2.5.3. Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)……....56

Conclusion et perspectives

Annexes

Références bibliographiques

Résumé

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants et conservateurs synthétiques a conduit à la recherche des substances naturelles à partir des extraits végétaux dotés de ces activités. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dont le l'objectif est d'évaluer, *in vitro*, les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'écorce et du jus de la grenade de Kabylie.

Les résultats ont montré que l'extrait de l'écorce est beaucoup plus riche en composés phénoliques y compris les flavonoïdes, les tanins condensés et hydrolysables. En effet, la teneur des polyphénols totaux a été estimée de 281,25±1,69 mg EAG / g Ps pour l'extrait de l'écorce et de 31,45±0.88 mg EAG/ g Ps pour le jus. L'analyse des polyphénols de l'extrait de l'écorce par CCM a confirmée l'analyse quantitative précédente. L'extrait de l'écorce a également indiqué une activité antioxydante plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de DPPH de 82,87±2.4%. De plus notre étude a démontré que l'extrait de l'écorce inhibe la croissance de *pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, contrairement au jus de grenade qui n'a montré aucune efficacité sur ces dernières. La même CMI qui est de 0.01g/ml a été noté sur *pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Par conséquent, l'écorce de grenade de Kabylie peut être valorisée et utilisée afin de formuler de nouveaux conservateurs et antioxydants naturels à utiliser dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés

Punica granatum L., extrait de l'écorce, jus de grenade, polyphénols, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

The development of antibiotic-resistant bacteria, the toxicity of antioxidants and synthetic preservatives have conducted to the research of natural substances through vegetal extract endowed from antimicrobial and antioxidant activities. The purpose of this study is to evaluate *in vitro* the antioxidant and antimicrobial properties of pomegranate's bark and juice.

The results show that the bark extract is richer in phenolic compounds including flavonoids, condensed and hydrolyzable tannins. In fact, the total polyphenol content analyzed by the Folin-Ciocalteu method is estimated at 281.25 mg EAG / g Ps for the bark extract and 31.45 mg EAG / g Ps for the juice. A qualitative analysis by thin layer chromatography (TLC) of the polyphenols of the bark extract was performed to confirm the previous quantitative analysis. The bark extract also indicates a higher antioxidant activity with a percentage of inhibition of (DPPH) of 82.87% more, our study has demonstrated that the bark extract is effective against the growth of bacteria *Pseudomonas, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*. In contrast, to pomegranate juice that showed no efficacy on the bacterial strains tested.

Therefore, this study has indicated that pomegranate bark extract can be used to formulate new products for use in food and pharmaceutical industries as natural antioxidants through substituting them for synthetic antioxidants and also as natural preservatives.

Keywords

Punica granatum. Bark extract, pomegranate juice, polyphenols, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DO : Densité optique.

DPPH : 1.1- diphényl-2-picryl-hydrazyl.

E : Echantillon.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EAT : Equivalent d'acide tannique.

EQ : Equivalent de quercétine.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

HDL : lipoprotéines de petite densité, low-density lipoprotein.

HPLC : chromatographie en phase liquide de haute performance ; High-Performance Liquid Chromatography.

Kcal : Kilocalories.

KJ : Kilojoule.

LDL : lipoprotéine de haute densité, high density lipoprotein.

Ps : Poids sec.

pH : Potentiel hydrogène.

RF : Rapport frontal.

S : standards.

UV/ VIS : Ultraviolet- Visible.

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Page
Tableau I	Composition biochimique et valeur nutritionnelle de la grenade.	**10**
Tableau II	Caractéristiques des principales variétés de la grenade.	**12**
Tableau III	Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes.	**17**
Tableau IV	Produits chimiques et milieux de culture utilisés.	**29**
Tableau V	Souches bactériennes testées.	**30**
Tableau VI	Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs.	**30**
Tableau VII	Rapports frontaux des standards et échantillons calculés après séparation sur une 1ére CCM avec le mélange : butanol/acide acétique/eau (60:15:35).	**47**
Tableau VIII	Rapports frontaux des standards et échantillons calculés après séparation sur une 2éme CCM avec le mélange : butanol/acide acétique/eau (60:15:35).	**49**
Tableau IX	Résultats de l'essai de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce et du jus de grenade.	**53**

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Arbre du grenadier.	**02**
Figure 2	Feuilles du grenadier.	**03**
Figure 3	Fleur du grenadier.	**04**
Figure 4	Fruit du grenadier (grenade).	**05**
Figure 5	Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur VAVILOV.	**06**
Figure 6	Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol.	**19**
Figure 7	Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes.	**20**
Figure 8	Photographie de la grenade de la variété « LAHLOU ».	**28**
Figure 9	L'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de grenade.	**31**
Figure 10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	**33**
Figure 11	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	**34**
Figure 12	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	**36**
Figure 13	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	**37**
Figure 14	Schéma de transformation du DPPH de sa forme oxydée à celle réduite.	**38**
Figure 15	Profil 1 de séparation en CCM des standards et échantillons après révélation par le DPPH.	**48**
Figure 16	Profil 2 de séparation en CCM des standards et échantillons après révélation par le DPPH.	**50**
Figure 17	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de grenade sur les quatre souches testées (A : *Staphylococcus aureus,* B *: Bacillus cereus,* C *: Pseudomonas aeruginosa,* D *: Escherichia coli*).	**54**
Figure 18	Résultat de la CMI de l'extrait de l'écorce de grenade sur les trois souches testées (A, B : *Escherichia coli. C, D : Pseudomonas. E, F : Staphylococcus aureus*).	**57**

Introduction

Le grenadier est une espèce fruitière pérenne tolérante à la sécheresse et capable de valoriser les sols pauvres et salins. Il jouit de grandes capacités d'adaptation aux conditions de milieu caractérisées par une aridité climatique marquée.

Sur le plan environnemental, il joue un rôle très important dans la protection, la restauration et la fixation des sols. Ses plantations ont connu une grande extension dans de différentes régions du monde et ont conduit à une augmentation de la production. Cette dernière a stimulé le développement des industries de transformation de jus de grenades et la prolifération des compagnies pharmaceutiques qui opèrent dans l'extraction des composés bénéfiques des fruits.

L'importance économique du grenadier réside dans ses fruits qui ont une grande valeur nutritive. Cette dernière lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine agro-alimentaire. En effet des études ont confirmées que la grenade possède des propriétés antidiabétiques et anti-cancérigènes. D'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés antioxydante et antimicrobienne et lutte contre la détérioration des produits alimentaires.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'écorce ainsi que le jus du fruit de *Punica granatum*, sachant que récemment le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétique, a conduit à la recherche des substances naturelles à partir des plantes aromatiques dotées d'activités antimicrobienne et antioxydante.

Synthèse bibliographique

I. Le grenadier

1.1. Classification botanique

Le grenadier « *Punica granatum* » vient du latin « Malum granatum » qui signifie « Fruit à petits grains » **(CYR, 2017)**. Il a été décrit par Linné et introduit pour la première fois dans sa classification en 1753, qui a été révisée en 2003, par un groupe de botanistes, « Angiosperm Phylogeny Group » ou APG, donnant naissance à une nouvelle classification phylogénétique **(WALD, 2009)** :

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

Figure 1 : Arbre du grenadier.

1.2. Description du grenadier

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur à rameaux nombreux, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux **(WALD, 2009)**. Il est cultivé, depuis longtemps pour un but ornemental ainsi que pour ses fruits comestibles.

1.2.1. La Feuille

Les feuilles du grenadier sont brillantes, lancéolées, assez coriaces, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long, de sommet obtus ou allongé, munies d'un court pétiole rougeâtre **(ALHIJNA et BOURICH, 2017)**. Ces feuilles sont caduques, opposées et disposées sur les rejets comme ils peuvent être en touffes sur les pousses courtes, glabres sur les deux faces. Caractérisées par la couleur verte foncé de la face supérieure et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante **(AVREINOFF, 1957)**. Notons que les feuilles du grenadier ne possèdent pas de stipule.

Figure 2 : Feuilles du grenadier.

1.2.2. La Fleur

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes (quand elles sont sous forme de boutons). Elles sont très ornementales, de couleur rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule **(MELGAREJO et SALAZAR, 2003)**.

Les fleurs axillaires, solitaires ou parfois disposées par deux, présentent un calice épais qui comprend entre 5 à 7 sépales, coriace, tubuleux et turbiné à 6 lobes triangulaires. La corolle est formée de 5 à 7 pétales obovales. Elles sont sans odeur, sèches, de saveur astringente et âpre et donnent à la salive une teinte violacée. Notons que ces fleurs sont actinomorphes et hermaphrodites et présentant un ovaire infère et d'innombrables étamines **(PLANCHON et COLLIN, 1875)**.

Figure 3: Fleur du grenadier.

1.2.3. Le fruit

Le fruit du grenadier nommé grenade (*Punica granatum*), est une baie ronde à écorce dur non comestible de saveur amère et astringente, sa taille est d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre. Ce fruit très coloré, généralement de couleur rouge vif, peut, selon les variétés, avoir une peau de teinte blanc jaunâtre ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé.

La baie est surmontée des restes du calice, formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable. Elle est divisée en neuf loges dont les cloisons membraneuses partent du réceptacle et renferment des semences entourées d'une pulpe succulente, ordinairement rougeâtre, représentant la partie comestible du fruit **(CYR, 2017)**.

Figure 4 : Fruit du grenadier (grenade).

1.3. Origine et répartition géographique

Selon les derniers travaux des botanistes et pomologues, le grenadier a pris naissance au centre du Moyen-Orient IV (Figure 5), qui comprend l'intérieur de l'Asie, l'Iran et le Turkménistan, puis il s'est acclimaté à la région méditerranéenne depuis des temps immémoriaux, où s'observe une multitude de formes spontanées et de variétés cultivées **(AVREINOFF, 1957)**. En raison de la propagation et la germination facile de ses graines, qui sont dispersées par l'homme, les oiseaux ou d'autres animaux **(SANCHEZ-MONGE, 1974)**.

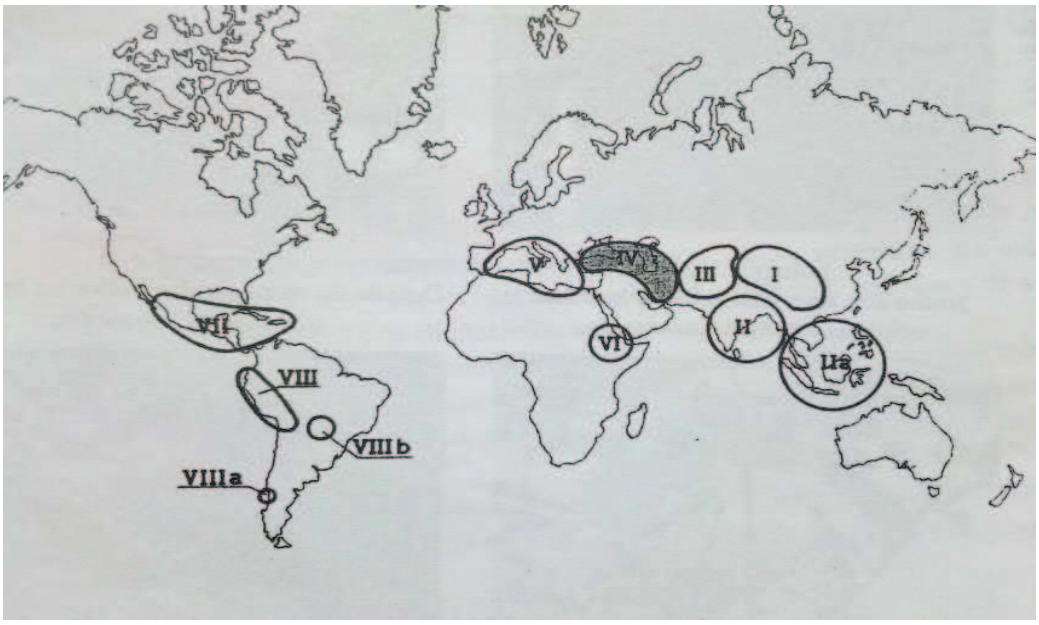


Figure 5 : Centres d'origines et de diversité des plantes cultivées selon le chercheur VAVILOV (SANCHEZ-MONGE, 1974).

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 ha, dont plus de 76 % sont repartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA). Cependant, l'Espagne, l'Egypte et l'Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 4000 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés **(QUIROZ, 2009)**.

Le grenadier est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc. Il est rarement rencontré dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée. De même en Amérique, la culture du grenadier reste très sporadique. Il est présent en Californie, dans l'Utah, en Alabama, Louisiane et Floride (**WALD, 2009**).

1.4. La culture du grenadier

Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes, il tolère une large gamme de sols, mais il est nécessaire que ses racines soient au frais et largement irriguées, afin d'obtenir des fruits de bonne qualité et en grande quantité **(AFAQ *et al*., 2005)**.

La multiplication du grenadier peut se réaliser soit en semant les semences contenues dans les arilles ou bien par bouturage en mettant des rameaux dans le sol. Cette multiplication nécessite l'ajout des engrais et plusieurs sarclages afin de maintenir les racines humides

(CAUCHARD, 2013). En général, un grenadier commence à produire à partir de 5 ans et rentre en pleine production à 7 ans.

La récolte se fait à partir du mois d'Août et peut s'étaler jusqu'au mois de Décembre. Les fruits sont récoltés quand l'écorce de la grenade perd sa chlorophylle et se colore en rougeâtre ou jaune clair (selon les variétés), par ailleurs plus le fruit est lourd, plus la pulpe sera juteuse. Pour ce qui est de La conservation de la grenade, elle est simple du fait qu'il s'agit d'un fruit non climactérique. Comme tous les fruits "exotiques", le fruit a besoin d'une température de conservation supérieure à 5°C pour éviter les maladies du froid et une humidité relative entre 80-85. Notons que ce fruit peut supporter jusqu'à 6 mois de stockage sans altération **(WALD, 2009)**.

II- La grenade

2.1. La situation économique de la grenade

En raison des avantages de la grenade pour la santé, le fruit devient de plus en plus populaire. De plus, sa disponibilité dans de nombreuses variétés le rend facilement cultivable dans différentes régions du monde.

Ainsi, au cours des cinq dernières années, les statistiques indiquent que l'importation de la grenade dans différentes parties du monde a plus que doublé. Notons qu'actuellement les pays les plus producteurs de la grenade sont les pays traditionnellement producteurs, c'est-à-dire sont des pays qui connaissent et cultivent la grenade depuis des centaines voire des milliers d'années. Dans cette catégorie on trouve l'Inde, L'Iran, l'Espagne, la Turquie, l'Israël et d'autres pays de la péninsule arabique et du Maghreb. En plus des pays traditionnellement producteurs il y'a d'autres pays comme les Etats-Unis ou la culture du grenadier s'est beaucoup développé durant ces dernières années. **(ANONYME 1)**.

En ce qui concerne l'Algérie, la culture de la grenade a considérablement changé suite à l'apparition du programme 2010-2014 visant à l'aide au relèvement agricole ainsi que l'apparition de plusieurs autres programmes, y compris le programme de développement agricole (PNDA). En effet la production est passée de 717,063t à 790,374t en 2012 et 2014 respectivement, tandis que le rendement a augmenté de 7,83t/ha à 8,42t/ha. **(KACI-MEZIANE *et al*., 2016)**.

2.2. La composition biochimique et la valeur nutritionnelle

De manière générale, la composition de la partie comestible de la grenade est bien décrite. En ce qui concerne la peau du fruit et les pépins, seules certaines classes de molécules ont été relativement bien étudiées. Chacun de ses compartiments possède des constituants spécifiques dont les teneurs dépendent de la variété, la saison, le stade de maturité, ainsi que du lieu géographique et des conditions de culture (**GIL *et al*., 2000 ; AL-MAIMAN et AHMAD, 2002 ; KULKARNI et ARADHYA, 2005 ; MIRDEHGHAN et RAHEMI, 2007 ; SCHWARTZ *et al*., 2009**).

2.2.1. Le jus

Le jus représente la partie la plus consommée de la grenade, c'est pour cette raison que sa composition est bien documentée. Avec une valeur énergétique comprise entre 62 et 83 Kcal pour 100g, il est composé de 85,4% d'eau, de 14 à 19% de sucres (≈50% de glucose et 50% de fructose dont sous forme de pectine : 1,4%), 1,7% de protéines (acides aminés majoritaires : proline, valine, méthionine) et 0,3 à 1,2% de lipides et d'acides organiques (acide citrique, malique, tartarique, fumarique et succinique notamment).Le jus de grenade est une source importante de micronutriments. En effet il a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont la vitamine C, B6, B9 et apporte également la vitamine E, B1, B2, B5. De plus il est naturellement riche en potassium, phosphore, calcium, magnésium, fer, zinc et cuivre **(PAUL et SHAHA, 2004 ; WAHEED *et al*., 2004 ; Madrigal-Carballo *et al*., 2009 ; VIUDA-MARTOS *et al*., 2010).**

D'autre part, il contient une part non négligeable de phyto-micronutriments de type polyphénolique (**AVIRAM *et al*., 2008**). Les polyphénols majeurs sont les anthocyanes, avec notamment la delphinidine, la cyanidine et la pelargonidine. Les tannins hydrolysables y sont également présents, notamment la punicalagine et la punicaline, les acides ellagique et gallagique. Les flavan-3-ols (catechine, epicatechine, quercetine, rutine), les acides hydroxycinnamiques (acide cafeique, chlorogenique, pcoumarique) et l'α-tocopherol sont présents en petites quantités.

2.2.2. Les pépins

Les pépins sont composés d'une matrice rigide dont la composition est bien moins décrite. Elle comporte en majorité des lignines (35,3%), des protéines (13,2%), des pectines (6%) et des sucres (4,7%) ainsi que des acides hydroxycinnamiques (**DALIMOV *et al*., 2003 ; WANG *et al*., 2004**).

L'huile obtenue à partir des graines de grenade, se compose à 80% d'acides gras insaturés, essentiellement représentée par l'acide punicique, mais également par les acides oléiques et linoléiques **(WANG *et al*., 2004**). Cette huile se compose aussi d'acides gras saturés, comme les acides palmitiques et stéariques (**LANSKY *et al*, 2007**). Elle contient aussi des composés mineurs tels que des tocophérols, stérols, stéroïdes et cérébrosides (**TSUYUKI *et al*., 1981**).

2.2.3. La peau

La peau de la grenade est composée d'eau (80%), de polysaccharides complexes (8%), dont des polysaccharides solubles (5%), représentés par des pectines et de l'hémicellulose. Elle contient aussi des minéraux, dont le potassium, calcium, magnésium, phosphore et sodium (**JAHFAR *et al*., 2003 ; VIUDA-MARTOS *et al*., 2010**).

Sa particularité réside en sa richesse en polyphénols (entre 3 et 7%). C'est cette classe de molécules de la peau qui est la mieux décrite. Celle-ci est majoritairement composée d'ellagitannins (75 à 90% des polyphénols), notamment la punicalagine et la punicaline, mais elle contient également d'autres tannins hydrolysables tels que les acides ellagique et gallagique, des anthocyanines (les mêmes que pour le jus), des flavan-3-ols et flavonoides (catechine, epicatechine, luteoline, kaempferol, quercetine, rutine), des acides hydroxycinnamiques (les mêmes que pour le jus) et des proanthocyanidines (**OZCAL et DINC, 1993 ; LANSKY et NEWMAN 2007; DELL'AGLI *et al*., 2010**).

Tableau I : Composition biochimique et valeur nutritionnelle de la grenade (WALD, 2009).

composants	Quantité
Energie	68 Kcal soit 284 KJ
Eau	80,97 g
Protéines	0,95 g
Lipides	0,30 g
Acides gras saturés	0,12 g
Glucides	17,17 g
Fibres alimentaires	0,6 g
calcium	3 mg
Fer	0,30 mg
Magnésium	3 mg
Phosphore	8 mg
Potassium	259 mg
Sodium	3 mg

Zinc	0,12 mg
Cuivre	0,070 mg
Manganèse	0,12 mg
Iode	0,9 µg
Sélénium	0,6 µg
Vitamine B1	0,030 mg
Vitamine B2	0,030 mg
Vitamine B5	0,596 mg
Vitamine B6	0,105 mg
Vitamine B9	38 µg
Vitamine C	6,1 mg
Vitamine E	1 mg
Vitamine K	4,6 µg
Carotène	50 µg
Carotène	40 µg

2.3. Les variétés de la grenade

La grande diversité de *Punica granatum* est évidente dans différents pays car c'est une plante facilement cultivable. En fait, l'Espagne abrite la banque de matériel génétique en Europe avec plus de 104 variétés. De grandes collections existent aussi dans d'autres pays comme l'Inde, le Turkménistan, l'Iran, etc... **(CAUCHARD, 2013**).

La collection indienne est constituée de 760 variétés alors que la plus riche est celle de Turkménistan, ou il y a la station expérimentale de ressources phylogénétiques, créée en 1934, avec 1 117 variétés **(WALD, 2009)**.

Il faut noter que face à cette multitude de variétés, sauf quelques-unes ont un rôle dans le commerce international. Pour le moment, aucune différence entre les variétés au niveau de la taille du fruit ou de caractéristiques agronomiques n'a été mise en évidence **(CAUCHARD, 2013)**. La différence visuelle entre chaque variété se situe au niveau :

- Couleur de peau : du rouge foncé au jaune pâle rosé
- Couleur des arilles : du rouge très foncé au rose transparent (peu commercialisé)
- Goût des arilles : acide ou doux

Les principales variétés sont référencées dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques des principales variétés de la grenade (CAUCHARD, 2013).

Variété	Couleur externe	Couleur des arilles	Gout des arilles
Wonderful	Rouge foncé	Rouge	Doux/Acide
Mollar d'Elche	Rose/jaune	Rouge clair	Doux
Herskowitz/Hershkovitz	Rouge foncé	Rouge clair	Acide
Acco	Rouge	Rouge foncé	Doux
Emek	Rouge foncé	Rouge	Doux/Léger Acide
Baghwa	Rouge clair	Rouge clair	Doux
Hicaz	Rouge	Rouge clair	Doux/acide
Shani	Rouge	Rouge foncé	Doux
Early Foothill	Rouge foncé	Rouge	Acide

Précisons que, les variétés Algériennes n'ont pas connues une classification systématique et donc elle possède seulement des noms communs comme : Lahlou, Leqares…etc.

2.4. Usage de la grenade en médecine traditionnelle

La grenade a une longue histoire d'utilisation en médecine naturelle et holistique. En effet, elle a été utilisée pendant des milliers d'années pour guérir un large éventail de maladies dans le monde entier **(WALD, 2009)**.

Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, attribué au grenadier de nombreuses propriétés. Il recommande le jus et l'écorce de la grenade contre plusieurs maladies liées aux femmes. De plus les médecines traditionnelles égyptiennes considéraient l'écorce comme anthelminthique et mettaient à profit l'effet astringent du tanin contenu dans la grenade. Ainsi, le tanin des fruits aigres était prescrit comme fébrifuge et antivomitif, celui des fruits sucrés comme adoucissant pour la toux **(WALD, 2009).**

De l'Afrique du Nord jusqu'en Inde, le jus de grenade, couramment utilisé dans les médecines indigènes, à la réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité. La pharmacopée et la médecine traditionnelle chinoise font aussi référence au grenadier pour guérir les maladies touchant les intestins **(GUILLAUME et MACH-CHIEU, 1987)**.

L'intérêt thérapeutique du grenadier et de ses racines, fleurs et fruits a été réellement reconnu au XVIIIème et XIXème siècle par le milieu médical français mais également espagnol et américain **(GARNIER *et al*., 1961)**. L'utilisation de la grenade est toujours marquée au XXI^{ème} siècle dans de nombreux pays comme le Guadeloupe afin de traiter de nombreuses maladies **(BOULLARD, 2001)**.

2.5. Autres usages traditionnelles de la grenade

2.5.1. Utilisation en teintures

Le grenadier fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaunes, des gris, bruns et noirs. Les parties utilisées de cet arbre sont essentiellement l'écorce des grenades, mais aussi l'écorce de la racine, des tiges et du tronc **(CARDON, 2003)**. Les substances colorantes issues du grenadier sont utilisées de façon traditionnelle pour teinter des tapis et des tentes de nomades.

L'industrie européenne de l'impression des tissus, au XIXème siècle, a intégré l'écorce de grenade et la racine de grenadier dans la vaste gamme des teintures naturelles.

Des tisserands perpétuent encore aujourd'hui la tradition des tisseurs à la main au Mexique, en employant des teintures immémoriales, dont notamment la grenade pour les verts tirant vers le jaune **(WALD, 2009)**.

L'écorce de grenade servait également au tannage et à la teinture des cuirs, avec mordançage à l'alun, pour donner leur belle couleur jaune aux cuirs utilisés par exemple pour la réalisation des babouches. Ainsi les écorces de fruits verts sont employées pour réaliser des jaunes pâles et les écorces de fruits bien mûrs pour les tons dorés **(CARDON, 2003)**.

Dans les années 1950, le grenadier fournissait, grâce à l'écorce de ses fruits, une matière tannante très utilisée dans le nord de l'Afrique pour la préparation des maroquins jaunes **(FOURNIER, 1948)**.

2.5.2 L'encre

L'écorce de la grenade fut quelquefois utilisée, pour remplacer la noix de galle, en effet l'écorce de la grenade servait a confectionné un pigment noir qui était utilisé pour fabriquer des encres **(FOURNIER, 1948)**.

2.6. Utilisation de la grenade dans les produits cosmétiques

Plusieurs tests démontrent la capacité des polyphénols et particulièrement de l'acide ellagique et de ses dérivés, composés présents dans le jus et la peau des grenades, à lutter contre la pollution urbaine **(JULIANO et MAGRINI, 2017)**

Il a ainsi été démontré que l'acide ellagique et ses dérivés, utilisés en application topique, protègent la peau et les matières kératinisées de façon à prévenir, atténuer et/ou supprimer les effets délétères des gaz toxiques tels que l'ozone, des métaux et des composés organiques présents dans la pollution urbaine. C'est pourquoi le groupe cosmétique l'Oréal a demandé le dépôt d'un brevet afin de développer une gamme cosmétique, contenant entre autre de l'acide ellagique, afin de réaliser des agents cosmétiques « anti-pollution » (**DUCH *et al*., 2004**).

Une étude a permis de montrer que l'application d'un extrait d'écorce de grenade, suite à une coloration capillaire, tend à optimiser son maintien au cours de lavages successifs. Il semble que la richesse de l'écorce de grenade en tanins, environ 60% de l'extrait, soit responsable de cette capacité à préserver les couleurs et ainsi d'éviter l'usage trop fréquent de colorants sur les cheveux **(WALD, 2009)**.

Une étude, réalisée par une équipe de chercheurs indiens, (**MURTHY *et al*., 2004)**, a étudié les effets d'extraits méthanoliques de peau de grenades sur la cicatrisation de plaies cutanées chez des rats de la variété *Wistar*. Cette étude a montré que la peau de grenade permet d'aider à la cicatrisation de blessures cutanées. Des examens plus complets, utilisant la technique de chromatographie liquide haute performance, CLHP, ont montré que ces extraits de grenade, aux propriétés cicatrisantes, sont riches en catéchine et acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique

III. les polyphénols

3.1. Définition des polyphénols

Les polyphénols dénommés aussi composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils se trouvent dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils proviennent du métabolisme secondaire et englobent approximativement 10000 composés naturels identifiés **(HYNES et O'COINCEANAINN, 2001 ; TORREGGIANI *et al*., 2005)**.

Les polyphénols, divisés en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun qui est la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside **(KAKHLON et CABANTCHIK, 2002 ; WELCH *et al*., 2002).**

3.2. La classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Ils sont distingués en deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes **(CLIFFORD, 1999 ; D'ARCHIVIO *et al*., 2007)**.

3.2.1. Les polyphénols simples

Ce sont les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches. Sauf exception, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole **(BENDJABEUR, 2012)**.

3.2.1.1. Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales principalement dans la grenade qui contient de l'acide gallique et l'acide ellagique **(PSOTOVA *et al*., 2003)**. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (**BRUNETON, 2008**).

3.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyranne, formant une structure C_6-C_3-C_6 **(GHEDIRA, 2005)**. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides **(HAKKINEN *et al*., 1999)**.

3.2.2. Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols qui se trouvent dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, grenade, datte, café, cacao…) localisés dans les vacuoles. Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation **(AGUILERA-CARBO, 2008)**.

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés :

3.2.2.1 Tanins hydrolysables

Sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique et sont des substances facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) **(COWAN, 1999 ; O'CONNELL et FOX, 2001)**.

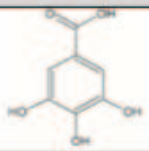
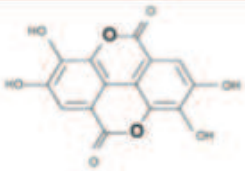
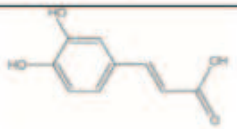
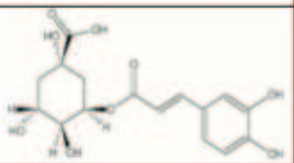
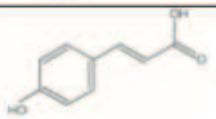
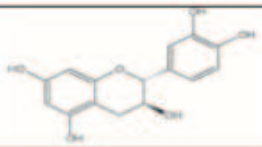
3.2.2.2 Tannins condensés

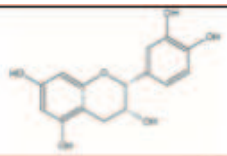
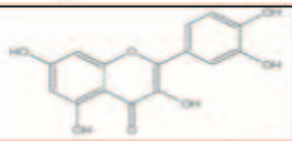
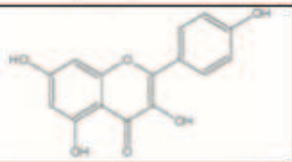
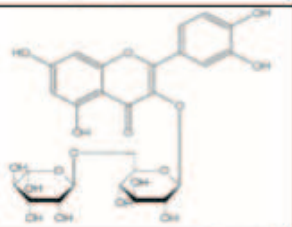
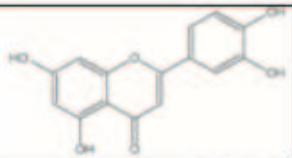
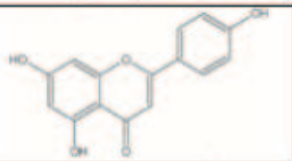
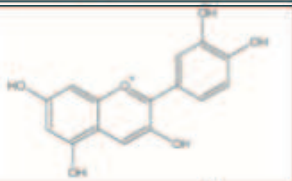
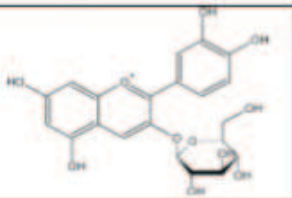
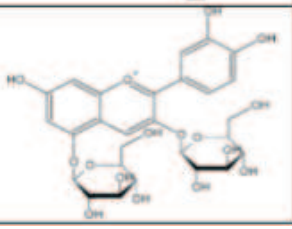
Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6

(O'CONNELL et FOX, 2001). En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité.

Les principaux composés phénoliques du grenadier sont représentés dans le tableau III :

Tableau III : Principaux composés phénoliques du grenadier avec leurs structures et leurs dispositions aux niveaux de différents organes (LANSKY et NEWMAN, 2007).

Classe chimique	Nom du composé	Structure chimique	Organes	Références
Acides Hydroxybenzoiques	Acide gallique		Jus - fleurs – feuilles	Amakura et al.(2000b) Huang et al. (2005b)
Acides Hydroxybenzoiques	Acide Ellagique		Jus - feuilles – Pépins	Amakura et al. (2000b) Wang et al. (2004)
AcideHydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide Caféique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide Chlorogénique		Jus – feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Acide Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)	Acide p-Coumarique		Jus- feuilles	Artik (1998) Amakura et al. (2000a)
Flavan-3-ols	Catéchine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa et al. (2000)

Flavan-3-ols	Epicatéchine		Jus- feuilles	De Pascual-Teresa et al.(2000)
Flavonols	Quercetine		Jus Feuilles	Artik (1998)
Flavonols	Kaempferol		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavonol glycosides	Rutine		Jus - feuilles	Artik (1998)
Flavones	Luteoline		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Flavones	Apigenine		Feuilles	van Elswijk et al. (2004)
Anthocyanidines	Cyanidin		Feuilles	Noda et al. (2002)
Anthocyanidines	Cyanidin 3-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)
Anthocyanines	Cyanidin 3.5-di-O-glucoside		Jus	Hernandez et al. (1999)

3.3. Modes d'action des polyphénols

L'oxydation se définit comme une perte d'électrons dans les dernières couches électroniques d'atomes ou de molécules, pour se transformer en ions. Les substances qui captent ces électrons se dénomment oxydantes, et en oxydant, elles se réduisent. Ces ions « oxydés » - transformés en ce que l'on appelle des radicaux libres s'ils ne sont pas neutralisés par un autre élément (réducteur) lui offrant ses propres électrons ou protons - continueront leur errance dans l'organisme jusqu'à ce qu'ils parviennent à s'emparer d'autres substrats qu'ils oxyderont à leur tour ; les substrats les plus affectés sont les membranes formant les cellules.

Les antioxydants d'origine alimentaire contribuent vraisemblablement à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences. A ce titre, les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important en exerçant une activité antioxydante via plusieurs mécanismes :

3.3.1. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox **(JOVANOVIC *et al.*, 1994)**, les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxyles (ROO•), les alkoxyles (RO•) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène **(JOVANOVIC *et al.*, 1994)** :

$$\text{Ar-OH} + \text{X}\bullet \longrightarrow \text{Ar-O}\bullet + \text{XH}$$

Où X• : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

Ar-O• : radical aryloxyle qui, s'il s'agit d'un noyau catéchol, peut réagir avec un autre radical pour former une o-quinone plus stable (Fig. 6).

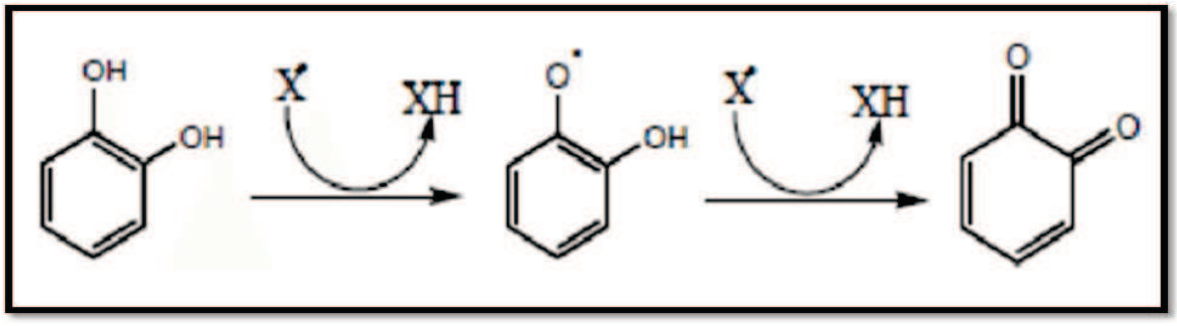


Figure 6 : Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol (JOVANOVIC *et al.*, 1994).

3.3.2. La chélation des ions métalliques

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{+}), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe^{2+} pour la catalase et Cu^{+} pour le superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical OH• par l'oxydation de H_2O_2 lors de la réaction de Fenton **(PIETTA, 2000 ; HEIM *et al.*, 2002)**.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} + (Cu^{+}) \longrightarrow OH\bullet + OH^{-} + Fe^{3+} + (Cu^{+2})$$

En outre, l'auto-oxydation des ions Fe^{2+} et Cu^{+2} est une source de O_2•-et de H_2O_2. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action anti-oxydante. Les polyphénols abondants dans l'alimentation, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites (Fig. 7).

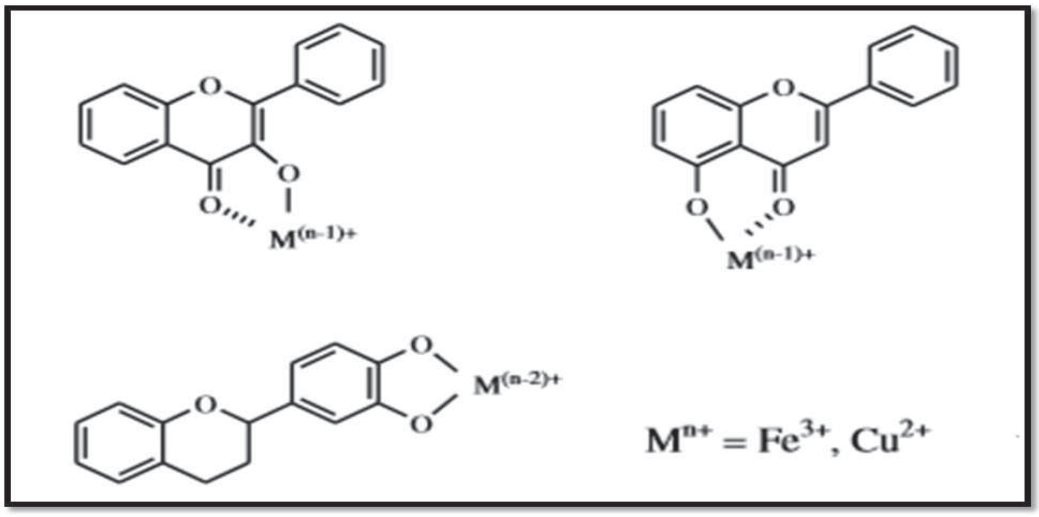


Figure 7 : Sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (HEIM *et al.*, 2002).

3.3.3. L'inhibition des enzymes

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines **(HAVSTEEN, 2002 ; DANGLES et DUFOUR, 2008)**, via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux

tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs **(DANGLES, 2012)**.

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet, par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO **(NAGAO, 1999 ; LIN *et al*., 2002)**

3.3.4 L'action pro-oxydante des polyphénols :

Les polyphénols corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité pro-oxydante de ces composés *in vitro* **(FUKUMOTO et MAZZA, 2000)**.

Il a été trouvé que les antioxydants phénoliques se comportent comme des pro-oxydants dans les conditions qui favorisent leur auto-oxydation, par exemple à pH élevé avec des concentrations élevées en ions métalliques de transition et en présence des molécules d'oxygènes les polyphénols les plus réducteurs peuvent manifester cet effet en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ERO.

C'est l'exemple de l'acide gallique qui est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+}, ou Cu^{2+}en Cu^{+}, et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton (réaction d'oxydation avancée) avec formation du radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par auto-oxydation des ions de basse valence.

Certains polyphénols par cet effet pro-oxydant peuvent endommager l'ADN, les lipides et d'autres biomolécules **(KOBAYASHI *et al*., 2004)**.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux définir la frontière entre effets pro-oxydants et effets antioxydants. Quoi qu'il en soit, les nombreux effets positifs sur la santé attribuée aux composés phénoliques ne mettent pas uniquement en jeu les propriétés anti-oxydantes mais aussi des propriétés plus spécifiques impliquant leur interaction avec diverses protéines au sein de la cellule.

3.4. Rôles des polyphénols

D'après **BENDJABEUR. (2012)**, le rôle des polyphénols est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites…) ;

- dans les interactions de la plante avec leur environnement biologique et physique, soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;

- dans les critères de qualité qui orientent le choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux et des produits qui en dérivent par transformation ;

- dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini ; dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec nombreuses enzymes et leurs propriétés anti-oxydantes.

IV. les activités biologiques de la grenade

L'intérêt considérable qui existe actuellement sur les vertus médicinales et nutritionnelles de la grenade a commencé en l'an 2000 ; dès lors, plus de 200 références ont été publiées à ce sujet, décrivant les bienfaits de la grenade et de ses produits dérivés sur la santé. En effet, les propriétés potentiellement thérapeutiques de la grenade sont très vastes, comprenant traitements et prévention contre plusieurs maladies, notons également que ces propriétés thérapeutiques sont dues aux activités biologiques de la grenade.

Voici à présent, de manière détaillé, les principaux résultats d'une révision bibliographique concernant la littérature scientifique, ou sont décrites les diverses activités biologiques de la grenade qui ont été énoncées ci-dessus.

4.1. L'activité anti-inflammatoire

L'inflammation, la première défense physiologique du corps humain, peut nous protéger des lésions causées par les blessures ou les empoisonnements. Ce système de défense

peut anéantir les micro-organismes infectieux, éliminer les irritations et maintenir les fonctions physiologiques dans leur état normal. Cependant, une surexposition aux inflammations peut causer certaines dysfonctions physiologiques, telles l'asthme et l'arthrite **(LEE *et al*., 2010)**.

Il y a de nombreuses preuves scientifiques qui démontrent clairement la propriété anti-inflammatoire de la grenade et de ses produits dérivés. Certains extraits de la grenade, notamment les pépins pressés à froid, inhibent l'action des enzymes cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases *in vitro*. La cyclo-oxygénases est une enzyme très importante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui sont des médiateurs importants de l'inflammation. La lipo-oxygénase conduit à la transformation de l'acide arachidonique en leucotriénes. **(TOMAS-BARBERAN, 2010)**.

LEE *et al*. (2010) ont analysé quatre tanins hydrosolubles, dont la punicalagine et la punicaline, toutes isolées de la grenade. Chacun de ces composés, à différentes doses, produit une inhibition spécifique de la production de monoxyde d'azote. De plus, **LARROSA *et al*. (2010)** ont démontré que l'activité anti- inflammatoire de la grenade et due également à la présence d'acide ellagique qui contribue à la diminution des niveaux de prostaglandines.

4.2. L'activité antioxydante

L'oxydation « incontrôlée » qui se produit dans les tissus de notre organisme provoque le vieillissement, la dégénération et bien entendu la maladie. Cependant, notre organisme possède des antioxydants qui ont la capacité de le protéger contre les radicaux libres, tels les radicaux de l'oxygène et de l'azote ainsi que les radicaux lipidiques.

Les composés responsables du grand pouvoir antioxydant de la grenade et de ses produits dérivés ont été étudiés par de nombreux auteurs, aussi bien dans des modèles *in vitro* que dans des modèles *in vivo*.

L'activité anti-oxydante *in vitro* de la grenade et de ses produits dérivés a été évaluée par plusieurs auteurs (**TEZCAN *et al*., 2009 ; JACOB *et al*., 2018**). **TZULKER *et al*. (2007)** ont déterminé que la haute capacité anti-oxydante de la grenade et de ses produits dérivés est due à la présence des punicalagines dans sa composition, et non pas aux anthocyanosides.

Les mécanismes de l'activité anti-oxydante *in vivo* ne sont pas clairs, mais les scientifiques savaient que ces mécanismes agissent sur les matrices biologiques d'une manière très complexe.

MADRIGAL-CARBALLO *et al.* (2009), ont suggéré que les composés phénoliques de la grenade éprouvent une réaction redox étant donné que les groupes hydroxyles des molécules phénoliques fournissent de l'hydrogène aux agents réducteurs. D'autres auteurs **(AMARROWICZ *et al.*, 2004)** affirment que l'activité anti-oxydante des composés phénoliques est due à son habileté pour attraper les radicaux libres et les cations métalliques chélates.

4.3. Prévention des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine. Ainsi, lorsque le taux de cholestérol LDL (low-density lipoprotein) est trop élevé, le risque de ces maladies augmente. Il semblerait que l'oxydation du LDL contribue à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires **(HEINECKE, 2006)**.

Plusieurs études ont été réalisées sur des animaux et sur des êtres humains avec divers produits en rapports avec la grenade pour déterminer son rôle dans la prévention et l'atténuation de l'athérosclérose et de l'oxydation du LDL.

AVIRAM *et al.* (2000), en utilisant des sujets masculins en bonne santé, ont analysé l'effet de la consommation du jus de grenade sur l'oxydation du LDL ; l'étude a déterminé que le LDL baisse et que l'activité du HDL (high density lipoprotein) augmente. Ce même auteur a réalisé de nombreuses expériences sur des patients hypertendus, auxquels il a administré du jus de grenade. Ces études ont montré que la pression artérielle s'est vue diminuée et cette diminution a été attribuée au pouvoir antioxydant élevé des polyphénols de la grenade **(AVIRAM et DORNFELD, 2001 ; AVIRAM *et al.*, 2004).**

ESMAILLZADEH *et al.* (2006), ont administré du jus concentré de grenade à des patients hyperlipidémiques (niveau élevé de cholestérol et de triglycérides). A la fin de l'étude une diminution s'était produite sur le niveau de cholestérol total, sur le LDL, sur le quotient cholestérol total/HDL et sur le quotient LDL/HDL.

SEZER *et al.* (2007), ont comparé la teneur totale en polyphénols et l'activité anti-oxydante du vin de grenade et du vin rouge. Aussi bien la teneur en polyphénols que l'activité anti-oxydante étaient supérieur dans le vin de grenade que dans le vin rouge et grâce à cette

capacité anti-oxydante plus puissante du vin de grenade, la diminution du niveau du LDL produite par ce dernier été supérieure à celle du vin rouge.

4.4. L'activité antidiabétique

Le diabète est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie menant à une hyperglycémie ou une hypoglycémie.

KATZ *et al*. (2007) ont montré que l'extrait aqueux de peau de grenade était significativement hypoglycémique, en augmentant le taux d'insuline et le nombre de cellules β pancréatiques chez les rats diabétiques induits par l'alloxane. Cette étude suggère une application possible d'extrait de pelure de grenade pour le type 1 ainsi que le type 2 de la maladie du diabète.

En plus de l'effet de l'écorce de grenade sur le diabète, les fleurs du grenadier sont, depuis longtemps, reconnues par les médecines traditionnelles, pour leur action sur le diabète. C'est pourquoi, depuis quelques années, des études sont réalisées sur ces fleurs, afin de déterminer scientifiquement si elles possèdent de réels pouvoirs hypoglycémiants.

En effet **JAFRI *et al*. (2000)** ont déterminé que l'extrait éthanolique de fleurs de grenadier a une réelle aptitude à faire baisser la glycémie en agissant sur la glycémie post-prandial par un mécanisme similaire à l'acarbose (inhibiteur d'alphaglucosidases) et d'après la composition chimique des fleurs de grenadier, ils pensent que les principes actifs de ces extraits sont l'acide gallique et/ou l'acide asiatique.

4.5. Activité anti-cancéreuses et anti- tumorale

Un cancer (ou tumeur maligne) est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire (tumeur) anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, de telle manière que la survie de ce dernier est menacée. Il faut noter que d'après plusieurs recherches les extraits de grenade peuvent lutter contre plusieurs types de cancers à savoir le cancer de la prostate, du sein et du colon ainsi que d'autres **(WALD, 2009).**

HONG *et al*. (2008) ont démontré que le jus et les extraits provenant de la grenade constituent de puissants inhibiteurs de la croissance cellulaire et ils sont même plus puissants que certains polyphénols considérés de manière isolée ; cela suggère un effet synergique des phyto-chimiques présents dans la grenade et dans ses extraits. En effet, un extrait de grenade appliquée comme prétraitement topique diminue l'incidence d'une tumeur chez la souris de

100 à 30, augmentant en outre la latence dans le développement de la tumeur de 9 à 14 semaines **(AFAQ *et al*., 2005)**.

ALBRETCH *et al*. (2004) ont étudié l'effet de l'huile de grenade, des polyphénols de l'écorce, des membranes et du jus fermenté sur le cancer de la prostate. Tous ces agents, de manière séparée, ont inhibés la prolifération *in vitro* des cellules cancéreuses. De plus, **HONG *et al*. (2008)** ont prouvé que le jus et les extraits de grenade ont une grande capacité de stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate.

Suite à ce qui a été exposé ci-dessus, nous pouvons conclure que la grenade et ses produits dérivés ont un effet bénéfique sur les maladies cancéreuses et tumorales dû à leur teneur élevée en composés phénoliques, tels les anthocyanosides, l'acide ellagique et les punicalagines. Il est important savoir que ces polyphénols sont question de prévention et de traitement, mais non pas de guérison du cancer ou des tumeurs. La grenade et ses produits dérivés, dû à leur composition phyto-chimique, sont des produits très recommandables pour la prévention et le traitement du cancer.

4.6. L'activité antimicrobienne

Un antimicrobien est une famille de substances qui tuent ou ralentissent la croissance des microbes. Ces derniers sont de plus en plus résistants aux actuels traitements antibactériens, antifongiques et antiviraux, ce qui pousse les chercheurs à découvrir de nouveaux principes actifs. En effet, l'activité antimicrobienne de la grenade et de ses dérivés a été démontrée dans de nombreuses études qui ont constaté l'inhibition de l'activité de nombreux microorganismes.

BRAGA *et al*. (2005) ont tenté de montrer l'intérêt de l'association de substances végétales aux traitements antibiotiques afin de réduire ces résistances. Les résultats de cette étude montrent clairement que des extraits végétaux, comme l'extrait de grenade, peuvent permettre d'améliorer l'action antibactérienne de certains antibiotiques et lutter contre l'apparition de souches bactériennes résistantes aux traitements.

REDDY *et al*. (2007) ont démontré que différents extraits de grenade dans différents solvants présentent une activité antimicrobienne significative contre *E. coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans, Cryptococcus neoformans et S. aureus*. De plus **Al-ZOREKY. (2009)** a démontré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogène, S. aureus, E. coli et Yersinia enterocolitica.*

Une étude, réalisée par **VASCONCELOS et SAMPAIO. (2006)** compare l'utilisation d'un gel à base de miconazole, antifongique imidazolé, à celle d'un gel contenant de la poudre de péricarpe de grenades, sur l'adhésion de microorganismes responsables d'infections bucco-dentaires. Trois types de bactéries, *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis et Streptococcus mitis*, ainsi qu'un type de levure, *Candida albicans*, sont soumis, seuls ou en associations, à l'action de ces gels. Ils mesurent alors la concentration minimum en principe actif qui permet d'inhiber l'adhésion de ces microorganismes à un support en verre, en présence de 5% de saccharose.

Les résultats de cette étude ont montré que le gel à base de péricarpe de grenade est plus efficace que celui à base de miconazole sur chacun de ces microorganismes analysés grâce à la présence de punicalagine et ils ont noté également que la peau de grenade se montre très efficace contre *Candida albicans* **(WALD, 2009)**.

NEURATH *et al.* (2004) ont analysés l'action de différents jus de fruits, et plus particulièrement celle du jus de grenade, sur la reconnaissance et l'entrée dans la cellule hôte, de différents sous-types de VIH-1. Les résultats de cette étude montrent que, *in vitro*, le jus de grenade adsorbé sur de l'amidon de maïs permet de bloquer la fixation du virus sur ses cellules cibles.

En effet, il semble que le complexe jus de grenade/amidon de maïs, se fixe sur la protéine gp120 du virus, empêchant ainsi l'adhésion aux lymphocytes et aux corécepteurs et donc la pénétration à l'intérieur de la cellule hôte. Le spectre d'action de la grenade contre les virus ne semble pas se limiter au virus du SIDA.

En effet, plusieurs études ont montré des résultats encourageants sur d'autres virus ; citons, l'action des extraits de péricarpe de grenade qui se montrent actifs contre les trois variants du virus de l'herpès simplex de type 1 ainsi que l'action des extraits alcooliques de grenades entières qui présentent une forte activité antivirale contre le virus de l'influenza, en cause dans tous les types de grippes, notamment dans la grippe aviaire **(SEERAM et SCHULMAN, 2006)**.

En général l'action inhibitrice élevée de la grenade et de ses produits dérivés est attribuée à la présence de composés polyphénoliques à savoir les tanins et les anthocyanosides.

Partie expérimentale

La partie expérimentale a été réalisée dans les laboratoires pédagogiques de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

I. Matériel et méthodes

1. matériel

1.1. Matériel végétal

Les fruits de grenade, de la variété appelée communément « Lahlou » sont récoltés dans la région de kabylie (Tizi Ouzou), précisément à Tigzirt. Les grenades, de couleur rouge, sont issues du même arbre et cueillies de façon aléatoire vers la fin du mois d'octobre.

Figure 8 : Photographie de la grenade de la variété « Lahlou »

1.2. Matériel de laboratoire

1.2.1. Les différents produits chimiques et milieux de culture utilisés

Tableau IV : Produits chimiques et milieux de culture utilisés.

Produits	Noms	Utilisations
solvants	Ethanol	Préparation de l'extrait de l'écorce
	méthanol	Dosage des flavonoïdes
Réactifs	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Activité antioxydante
	Folin-Ciocalteu	Dosage des polyphénols totaux et tannins condensés
	Acide ascorbique	Antioxydant standard
	Acide gallique	Polyphénol standard
	Quercétine	Polyphénol standard
	Acide tannique	Polyphénol standard
Sels	Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	Dosage des polyphénols totaux et des tannins condensés
	Acétate de potassium ($C_2H_3KO_2$)	Dosage des flavonoïdes
	Chlorure de sodium (NaCl)	Préparation de l'eau physiologique
Milieu de culture	Mueller-Hinton (MH)	Activité antimicrobienne

1.2.2. Le matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence appartenant à l'American Culture Collection (ATCC) qui proviennent de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques (FSBSA) de Tizi Ouzou. Les souches utilisées sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau V : Souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Gram
Escherichia coli ATCC 25922	$Gram^-$
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	$Gram^-$
Staphylococcus aureus ATCC 43300	$Gram^+$
Bacillus cereus ATCC 10876	$Gram^+$

1.2.3. Les antibiotiques utilisés

Tableau VI : Les antibiotiques utilisés comme témoins positifs.

	Nom	**Abréviation**	**Dose**
Antibiotiques	Vancomycine	VA	30 µg/disque
	Fosfomycine	FOS	50 µg/disque
	céfoxitine	FOX	30 µg/disque

1.3. L'appareillage

Le matériel utilisé pour réaliser nos manipulations est :

- Une étuve ;
- Un réfrigérateur à 4°C ;
- Un broyeur électrique ;
- Une centrifugeuse ;
- Un spectrophotomètre ;
- Un dessiccateur infrarouge ;
- Un autoclave.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait de l'écorce de *Punica granatum L*

Après la récolte**,** les écorces de la grenade ont été isolées et séchées à l'étuve pendant une semaine, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique, la poudre obtenue a été conservée dans un flacon en verre et maintenue à l'abri de la lumière et de l'humidité pour des analyses ultérieures.

Un extrait hydro-éthanolique a été préparé selon la méthode de **MALVIYA *et al*. (2014)**. 20g de poudre d'écorce ont été macérée dans un mélange de 100ml contenant 50% d'eau distillée et 50% d'éthanol, à une température ambiante et à l'abri de la lumière sous agitation douce pendant24h. Le mélange a été ensuite filtré à l'aide d'une passoire pour avoir un filtrat, ce dernier a été centrifugé deux fois à une vitesse de 4000 g pendant 20 min et à une température de 4°C. Le surnageant est conservé à 4°C au réfrigérateur.

Figure 9 : Photographie de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de grenade.

2.2. Détermination du poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus

Le poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus a été déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge en déposant 3 ml de chaque échantillon (l'extrait de l'écorce et le jus).

2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule suivante :

$$R\% = (PES / PE) \times 100$$

R% : rendement en pourcentage

PES : poids de l'extrait sec (g)

PE : poids de l'échantillon poudre (g)

2.4. Analyses quantitatives des échantillons

2.4.1. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

La méthode de dosage des polyphénols totaux repose sur l'oxydation des cycles phénoliques **(LHUILLERY, 2006)**. Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et tungstate de sodium de couleur jaune, qui est réduit lors de l'oxydation de ces composés phénoliques en milieu alcalin en un chromogène de couleur bleu.

La coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols totaux, qui est estimée par un spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'onde de 760nm **(GHAZI et SAHRAOUI, 2005)**.

- **Mode opératoire**

La teneur en polyphénols totaux de nos échantillons a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu **(SINGLETON *et al.*, 1965)**. Des dilutions convenables de nos échantillons ont été préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation des solutions**

- Le réactif de Folin (10 fois dilué) ;
- Solution de carbonate de soduim 7.5%.

➢ **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. A partir de la solution mère (SM) 0.1mg/ml, on prépare des dilutions allant de 10 à 100µg/ml selon le tableau figuré dans l'annexe 1a.

Chaque dilution (dilution d'acide gallique et de l'échantillon) est traitée selon le protocole décrit par la figure de l'annexe 1b.

➢ **Expression des résultats**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (AG). Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de matière sèche).

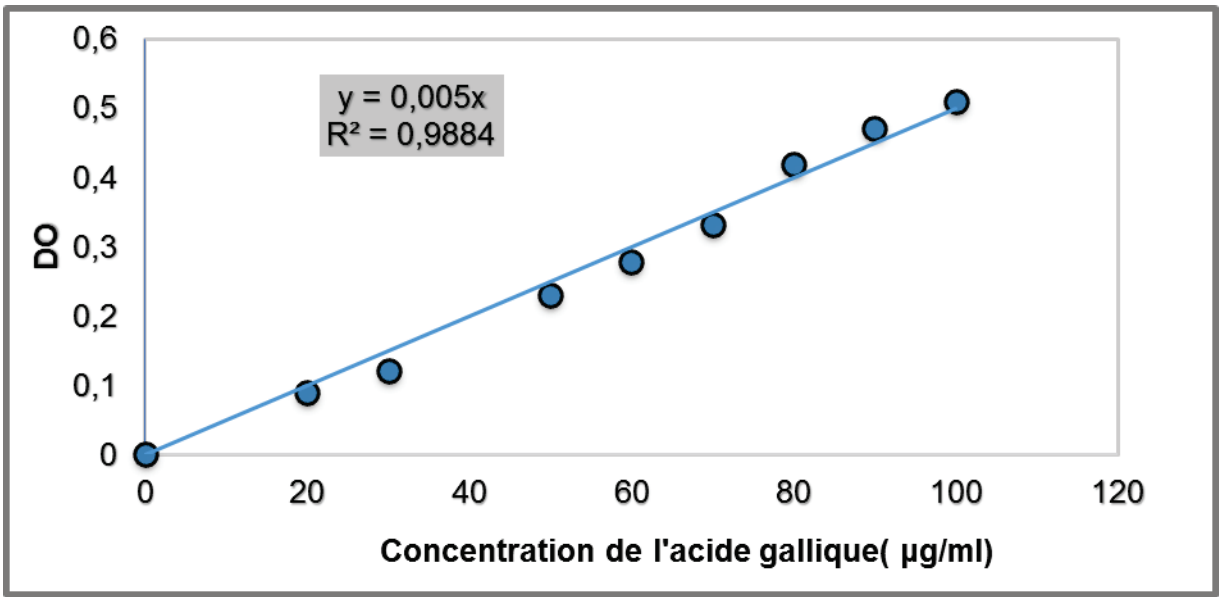


Figure 10 : Courbe étalonnage de l'acide gallique.

2.4.2. Dosage des flavonoïdes

➢ **Principe**

Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune, dont l'intensité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis **(MBYE DIENG, 2007)**.

- **Mode opératoire**

La teneur en flavonoïdes de nos échantillons a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium **(YUN *et al*., 2009)**. Des dilutions convenables de nos échantillons ont été préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant la quercétine comme standard de calibration. A partir de la solution mère (SM) 0.2mg/ml de méthanol, on prépare des dilutions allant de 0.02 à 0.12 mg/ml selon le tableau figuré dans l'annexe 2a.

Chaque dilution (dilution de la quercétine et de l'échantillon) est traitée selon le protocole décrit par la figure de l'annexe 2b.

- **Expression des résultats**

La concentration des flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine. Elle est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de matière sèche).

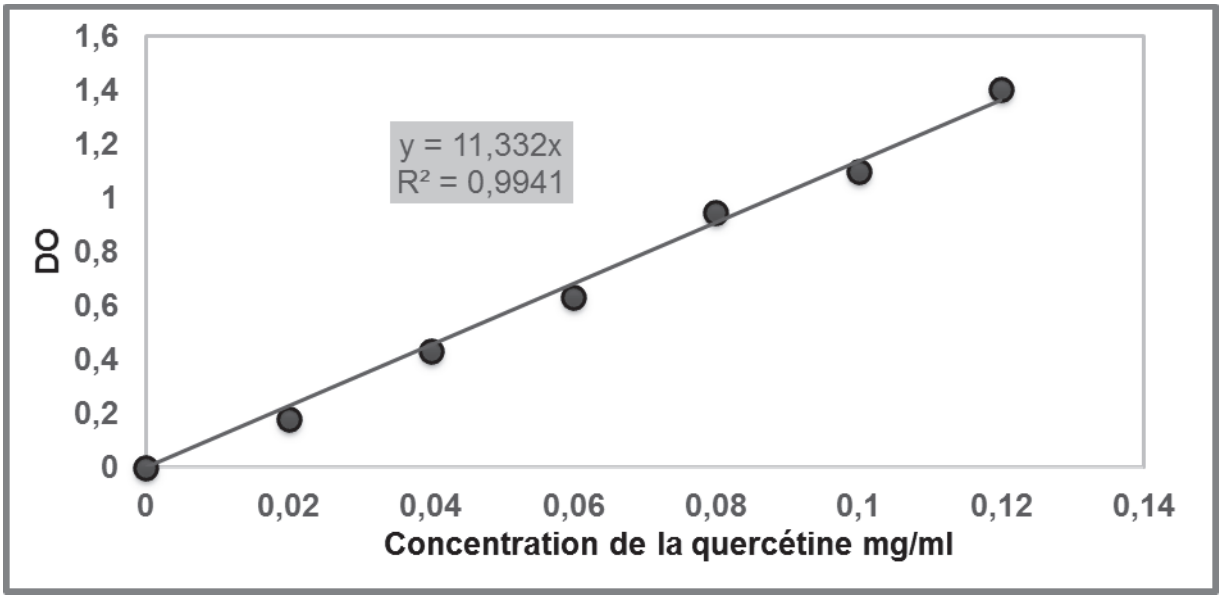


Figure 11 : Courbe étalonnage de la quercétine.

2.4.3. Dosages des tanins condensés

- **Principe**

La technique de dosage des tanins condensés est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm.

- **Mode opératoire**

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin Denis décrite par **JOSLYN. (1970)** modifiée. Des dilutions convenables de nos échantillons sont préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation des différentes solutions :**

-la solution saturée de carbonate de sodium Na_2CO_3.

- **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide tannique comme standard de calibration. A partir de la solution mère (SM) 1mg/ml d'eau distillée, on prépare des dilutions allant de 0.5 à 1 mg/ml selon le tableau figuré dans l'annexe 3a.

Chaque dilution (dilution de l'acide tannique et de l'échantillon) est traitée selon le protocole décrit par la figure de l'annexe 3b.

- **Expression des résultats**

La concentration des tannins condensés est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide tannique. Elle est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/ g de matière sèche).

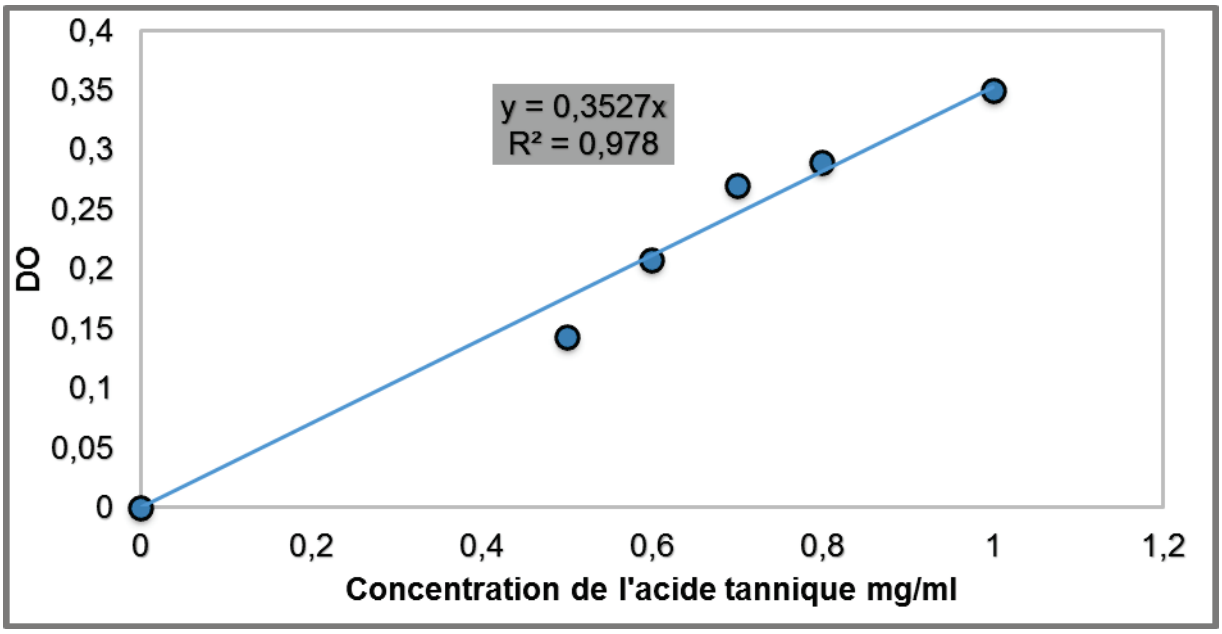


Figure 12 : Courbe étalonnage de l'acide tannique.

2.4.4. Dosage des tanins hydrolysables

- **Principe**

Cette méthode est basée sur une réaction avec l'iodate de potassium (KIO_3), le mélange des tanins hydrolysables avec ce réactif provoque la formation des ions d'où la coloration rouge du complexe. L'intensité de la couleur est mesurée à 550 nm.

- **Mode opératoire**

Les tanins hydrolysables sont dosés selon la méthode colorimétrique de **Willis et Allen (1998)** modifiée, Des dilutions convenables de nos échantillons sont préparées, ainsi qu'une gamme d'étalon.

- **Préparation des différentes solutions**

-La solution d'iodate de potassium à 2.5%.

- **Préparation de la gamme étalon**

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide tannique comme standard de calibration. A partir de la solution mère (SM) 1000 µg/ml d'eau distillée, on prépare des dilutions allant de 200 à 1000 µg/ml selon le tableau figuré dans l'annexe 4a.

Chaque dilution (dilution de l'acide tannique et de l'échantillon) est traitée selon le protocole décrit par la figure de l'annexe 4b.

- **Expression des résultats**

La concentration des tannins condensés est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide tannique. Elle est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/ g de matière sèche).

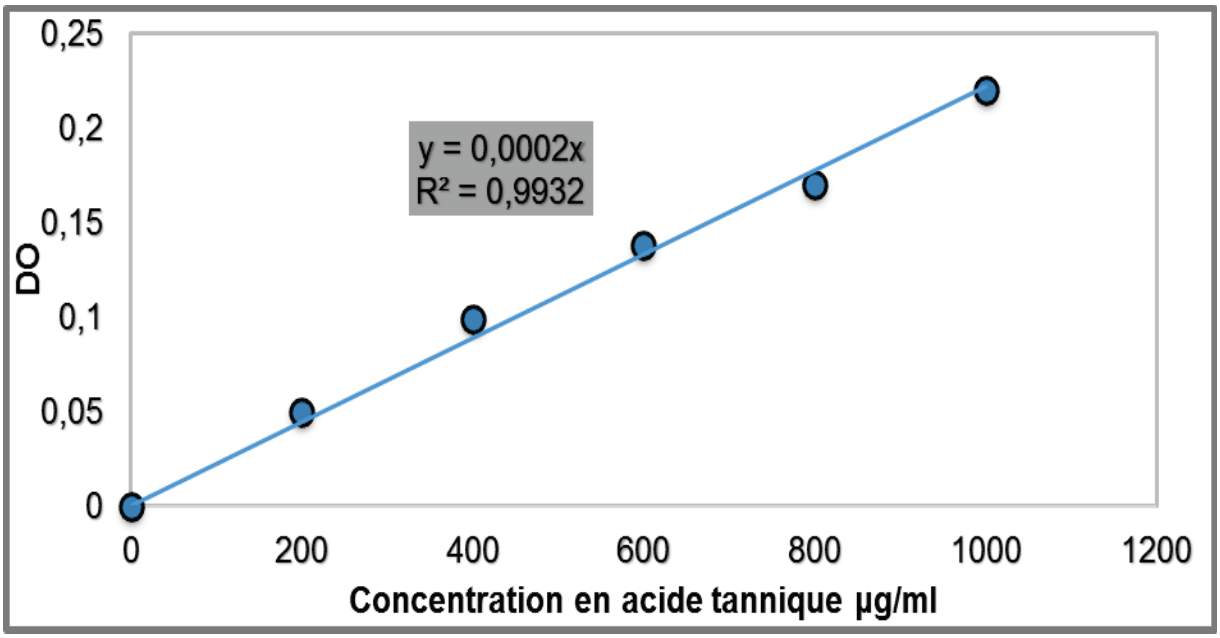


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

2.5. Analyse qualitative des polyphénols

L'extrait de l'écorce est analysé par chromatographie sur couche mince (CCM). Des plaques de dimensions 20 cm × 20 cm sont recouvertes avec du gel de silice et prêtes à l'emploi sont utilisées.

L'éluant de migration utilisé correspond à un mélange de solvant formé par le butanol : acide acétique : eau (60 :15 :35, V / V / V) **(LAIRINI *et al.*, 2014)**. L'élution a été réalisée dans une cuve en verre contenant 100 ml d'éluant, la cuve est laissée pour saturation la nuit précédant l'analyse. A l'aide d'une seringue, des dépôts de 10 µl de solutions standards phénoliques (acide tannique, acide gallique et la quercétine) et des différentes dilutions de

l'extrait de l'écorce ont été appliquées. Les différents dépôts sont espacés de 1.5 cm afin de prévenir la superposition des spots. Après migration, la plaque est séchée à l'air libre puis révélé à l'aide d'une solution du DPPH. Les spots apparents ont été encerclés à l'aide d'un crayon et des rapports frontaux (distance parcourue par le soluté/distance parcourue par le solvant) ont été calculés.

2.6. Tests des activités biologiques :

2.6.1. Test de l'activité anti-oxydante :

- **Mise en évidence de l'activité anti-oxydante**

Le pouvoir antioxydant de nos échantillons a été testé en employant le test de piégeage du radical libre DPPH. Le principe de ce test est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piégeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétiques ou naturels (dans notre cas c'est nos échantillons), le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (**MAATAOUI *et al*., 2006**). On peut résumer la réaction par le schéma représenté dans la figure suivante :

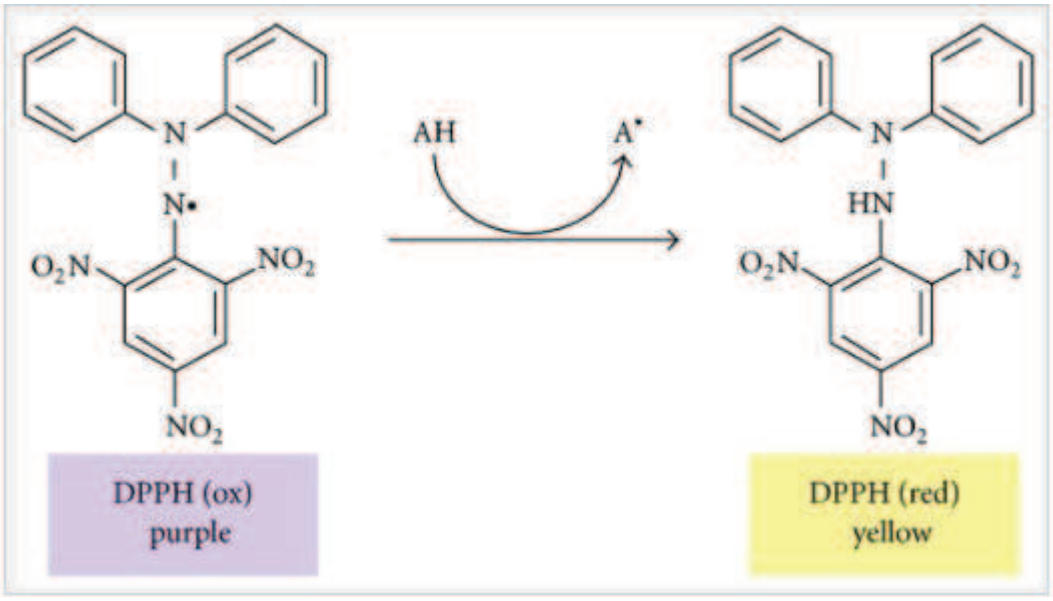


Figure 14 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme oxydée à celle réduite (TEIXEIRA *et al*., 2013).

- **Mode opératoire**

Pour l'étude de l'activité anti-radicalaire de nos échantillons (jus pur, la dilution 1/100 de l'extrait de l'écorce) nous avons suivi la méthode de **SANTOS *et al.* (2010)**.Après avoir solubilisé 15.77 mg de DPPH dans 50 ml d'éthanol absolue, trois tubes ont été préparés séparément :

- Echantillon : 250 µl DPPH + 3.75 ml de chaque échantillon ;
- Contrôle négatif : 250 µl DPPH + 3.75 ml d'éthanol ;
- Contrôle blanc : 250 µl d'éthanol + 3.75 ml de chaque échantillon.

Après agitation, les tubes ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. L'intensité de la couleur observée est inversement proportionnelle au potentiel antioxydant des échantillons étudiés **(SACHEZ-MORENO, 2002)**. Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti- radicalaire, selon la formule suivante :

% d'activité anti-radicalaire = [(Abs C-Abs éch) /Abs C] ×100

Où : **Abs éch** : absorbance de l'échantillon.

Abs C : absorbance du contrôle.

2.6.2. Test de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé décrite par **BENJELALI *et al.* (1986)**. Il s'agit de mesurer les zones d'inhibitions issues de l'effet de nos échantillons vis-à-vis les souches pathogènes testées.

- **Stérilisation du matériel**

L'eau physiologique, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 3h.

- **Revivification des souches**

Pour permettre aux bactéries stressées de récupérer leurs potentialités ; 1 ml de la suspension bactérienne a été prélevée et additionnée à 9 ml de BHIB. Les tubes ont été incubés pendant 24h à 37°C.

- **Repiquage des souches**

Les bactéries ont été ensemencées à l'aide d'une anse sur gélose nutritive en réalisant des stries serrées, puis incubés à 37°C.

- **Standardisation**

On prélève à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, d'opacité 0.5 Me Farland équivalente à une DO de 0.08 à 0.10 à 625nm.

- **Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement des souches testées a été réalisé par écouvillonnage. Les disques imprégnés de nos échantillons ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose pré-inoculée à l'aide d'une pince stérile. De même les disques contenants les antibiotiques (témoins positifs) appropriés et les disques imprégnés d'éthanol (témoins négatifs) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des échantillons testés. Les boites de pétri ont été incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture des résultats**

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de nos échantillons **(PONCE *et al*., 2003).**

- Souche non sensible (-) ou résistante : diamètre≤ à 8 mm ;
- Souche sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm ;
- Souche très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm ;
- Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre à ≥ 20 mm ;

2.6.3. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide :

- **Principe**

Les concentrations minimales inhibitrices sont définies comme la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après 24h d'incubation pour les bactéries.

- **Protocole expérimentale**

Après avoir standardisé les souches bactériennes, des dilutions allant de 1/2 à 1/256 ont été préparées à partir d'une concentration de 0.16 g/ml. Ensuite un ensemencement des souches testées a été réalisé par écouvillonnage sur la surface des milieux de culture par la technique des stries. Les disques imprégnés de nos dilutions ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose pré-inoculée à l'aide d'une pince stérile. Les boites de pétri ont été incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

- **Lecture des résultats**

La lecture se fait à l'œil nue, la CMI sera là où la zone d'inhibition commence à apparaitre pour une souche donnée.

II. résultats et discussion

2.1. Détermination du poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus

Le poids sec de l'extrait de l'écorce et du jus a été déterminé à l'aide d'un dessiccateur infrarouge. Les résultats sont de 0,16 ± 0,005 g et de 0,11 ± 0,003 g respectivement pour 1 ml d'échantillon.

2.2. Rendement d'extraction

Le choix du solvant est une étape importante pour obtenir des extraits avec des rendements acceptables ainsi que de fortes teneurs en polyphénols. En effet le choix du mélange (50% éthanol, 50% eau) a été effectué selon l'étude menée par (**MALVIYA *et al*., 2014**) qui ont comparé l'effet de différents solvants sur le rendement de l'extraction. Le rendement d'extraction (en moyenne ± écart type) obtenu en pourcentage (%).

Nous avons obtenu un rendement d'extraction de 0,8 ± 0,0003 %. Ce rendement est considéré comme faible par rapport au rendement trouvé par **MALIYA *et al*. (2014)** qui est de 16,3%.

2.3. L'étude quantitative

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 760 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux montre une corrélation positive entre la variation de ces polyphénols (0 à 100 mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation R^2= 0,98.

La quantité es polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de l'échantillon (mg EAG/g Ps).

A partir de la courbe étalonnage, la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de l'écorce est :

$$\mathbf{T_{pt}= 281, 25 \pm 1, 69\ mg\ EAG/g\ Ps}$$

La teneur en polyphénols totaux dans le jus est :

$$\mathbf{T_{pt} = 31, 45 \pm 0, 88 \text{ mg EAG/g Ps}}$$

$\mathbf{T_{pt}}$: Teneur en polyphénols totaux.

En comparant ces deux résultats, on peut constater que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de l'écorce est beaucoup plus élevée que celle du jus.

La teneur en polyphénols totaux de notre extrait est de 281,25 mg EAG/g Ps pour une concentration de 0,16g /ml et une dilution de 1/1000. Cette teneur est presque similaire à celles rapportées par **ÇAM et HISIL. (2009)** : 258,2 et 264,3mg EAG/g Ps pour l'extrait méthanolique et hydro-éthanolique respectivement à une concentration de 0,04 g/ml diluée 100 fois.

Une étude rapportée par **ELFALLEH *et al*. (2012)** a montré que la teneur en polyphénols totaux de l'extrait de l'écorce est de 85,60 mg EAG/g Ps pour une concentration inconnue, ce résultat est relativement inférieur à celui de notre extrait. Cependant d'autres études (**MALVIYA *et al* .2014 ; BENDJABEUR, 2012 ; TEHRANIFAR *et al*, 2011)** ont obtenus des teneurs de 435 mg EAT/g Ps, 448,4 mg EAG/g Ps et 423,5 mg EAG/g Ps, pour un extrait aqueux, un mélange de solvants (méthanol, acétone et acétate d'éthyle) et un extrait méthanolique respectivement.

Le résultat retrouvé pour le jus de la grenade est de 31,45 mg EAG/g Ps pour une concentration de 0,11g/ml. Ce résultat est considéré comme important par rapport à ceux rapportés par **KONSOULA. (2016)**. En effet, pour une concentration de 0,25g/ml, ce dernier a trouvé des valeurs de 34,2 et 26,8 mg EAG/g Ps pour un extrait méthanolique et éthanolique respectivement. Tandis que pour une autre étude menée par **ALOQBI *et al*. (2016)**, la teneur des polyphénols était de 118,56 mg EAG/g Ps pour une concentration de 0,04 g/ml, cette teneur supérieure est à la nôtre.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la quercétine a été utilisé comment étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 420 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre une corrélation positive entre la variation de ces flavonoïdes (0 à 0,12 mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation R^2=0,99.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids secs de nos échantillons (mg EQ/g Ps).

A partir de la courbe d'étalonnage, la teneur des flavonoïdes dans l'extrait de l'écorce est de :

T_f = 12,07 ± 0,23 mg EQ/g Ps

La teneur des flavonoïdes du jus est :

T_f = 0,90 ± 0,03 mg EQ/g Ps

T_f : teneur en flavonoïdes (mg EQ/g Ps).

En comparant ces deux résultats, on peut constater que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de l'écorce est beaucoup plus élevée que celle du jus.

ÇAM et HISIL. (2010) ont mesuré la teneur des flavonoïdes pour trois extraits de l'écorce de grenade à une concentration de 0.16 g/ml pour une dilution de 1/25 : la teneur de l'extrait hydro-éthanolique (13 mg EQ/g Ps) est similaire au résultat trouvé avec notre extrait, par contre la teneur de l'extrait aqueux (6,2 mg EQ/g Ps) est inférieur à la nôtre et l'extrait méthanolique (18,1 mg EQ/g Ps) est légèrement supérieur comparé à une autre étude **(ELFALLEH *et al*.,2012)** qui a obtenue 51,52 mg EQ/g Ps pour le même type d'extrait et pour une concentration inconnue.

La teneur des flavonoïdes du jus de la grenade est de 0,90 mg EQ/g Ps pour une concentration de 0,11 g/ml. Ce résultat est en concordance avec ceux rapportés par **KONSOULA. (2016)**. En effet, pour une concentration 0,25g/ml, les teneurs étaient de 4,3 et 3,4 mg EQ/g Ps pour un extrait méthanolique et éthanolique respectivement. Tandis que pour une autre étude menée par **ALOQBI *et al*. (2016)**, la teneur des flavonoïdes est de 31,5mg EQ/g Ps pour une concentration de 0,06 g/ml, cette teneur est supérieure à la nôtre.

2.3.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin Denis. L'acide tannique a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur

d'onde de 760 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

L'évaluation quantitative des tanins condensés montre une corrélation positive entre la variation de ces tanins (0 à 1mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation R^2=0,97.

La quantité des tanins condensés a été rapportée en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de poids secs de nos échantillons (mg EAT/g Ps).

A partir de la courbe d'étalonnage, la teneur des tanins condensés dans l'extrait de l'écorce est de :

$$\mathbf{T_{tc} = 53, 27 \pm 0, 25\ mg\ EAT/g\ Ps}$$

La teneur des tanins condensés du jus est :

$$\mathbf{T_{tc} = 8, 67 \pm 0, 08\ mg\ EAT/g\ Ps}$$

$\mathbf{T_{tc}}$: teneur en tannins condensés (mg EAT/g Ps).

En comparant ces deux résultats, on peut constater que la teneur en tanins condensés dans l'extrait de l'écorce est beaucoup plus élevée que celle du jus.

REGUIEG YSAAD et HAMMADI. (2017) ont mesuré la teneur des tanins condensés de trois extraits de l'écorce de grenade (extrait aqueux, méthanolique et éthanolique) et ont obtenus des valeurs allant de 81,86 à 153mg EAT/g Ps. Cependant, une autre étude réalisée par **ÇAM et HISIL. (2010)** a obtenu un résultat de 9,5 mg EAT/g Ps pour un extrait de même type que le nôtre (extrait hydro-éthanolique) et pour une concentration de 0,04g/ml diluée 10 fois. Soulignons que, cette valeur est inférieure à celle que nous avons obtenue sachant que nous avons utilisé une concentration de 0,16g/ml et une dilution de 1/10.

2.3.4. Dosage des tanins hydrolysables

Le dosage des tanins hydrolysables a été réalisé selon la méthode colorimétrique d'iodate de potassium (KIO_3). L'acide tannique a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 550 nm. Les résultats sont obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

L'évaluation quantitative des tanins hydrolysables montre une corrélation positive entre la variation de ces tanins (0 à 1mg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation

R^2=0,99. La quantité des tanins hydrolysables a été rapportée en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de poids secs de nos échantillons (mg EAT/g Ps).

A partir de la courbe d'étalonnage, la teneur des tanins hydrolysables dans l'extrait de l'écorce est de :

T_{th}= 62, 5 ± 0, 1 mg EAT/g Ps

La teneur des tanins condensés du jus est :

T_{th}= 7, 72 ± 0, 1 mg EAT/g Ps

T_{th}: teneur en tannins hydrolysables (mg EAT/g Ps).

En comparant ces deux résultats, on peut constater que la teneur en tanins hydrolysables de l'extrait de l'écorce est beaucoup plus élevée que celle du jus.

La teneur en tanins hydrolysables de notre extrait d'écorce de grenade (62,5 mg EAT/g Ps) est similaire à celle rapportée par **ELFALLEH *et al.* (2012)** : 62,71mg EAT/g Ps pour l'extrait hydrolique et pour une concentration non mentionnée. Cependant, la même étude et une autre étude (**ÇAM et HISIL, 2010)** ont obtenus des valeurs de 139,63mg EAT/g Ps et de 262,7mg EAT/g Ps pour un extrait méthanolique et hydro-éthanolique respectivement. Ces dernières sont considérées supérieures comparées à notre résultat sachant que ces résultats ont été obtenus pour une concentration de 0,04 g/ml et à une dilution de 1/10.

Précisons que peu d'études ont été réalisées sur l'analyse quantitative des tanins hydrolysables et condensés du jus de la grenade.

2.4. L'analyse qualitative des polyphénols

Le résultat de la première CCM a été obtenu après 6h de migration des standards, de l'extrait et de ses dilutions sur la plaque de silice, les spots formés par l'acide gallique et la quercétine ont montré le même niveau de migration que ceux formés par l'extrait pur, quant à l'acide tannique, il n'a montré aucune migration. Les rapports frontaux (RF) des standards et des échantillons sont représentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Rapports frontaux(RF) des standards phénoliques et des échantillons calculés après séparation sur CCM avec le mélange : butanol/acide acétique/eau (60:15:35).

Standards et échantillons	Symbole	RF
Acide tannique	S1	0
Acide gallique	S2	0,8
Quercétine	S3	0,9
Extrait pur	E1	0,8 et 0,9

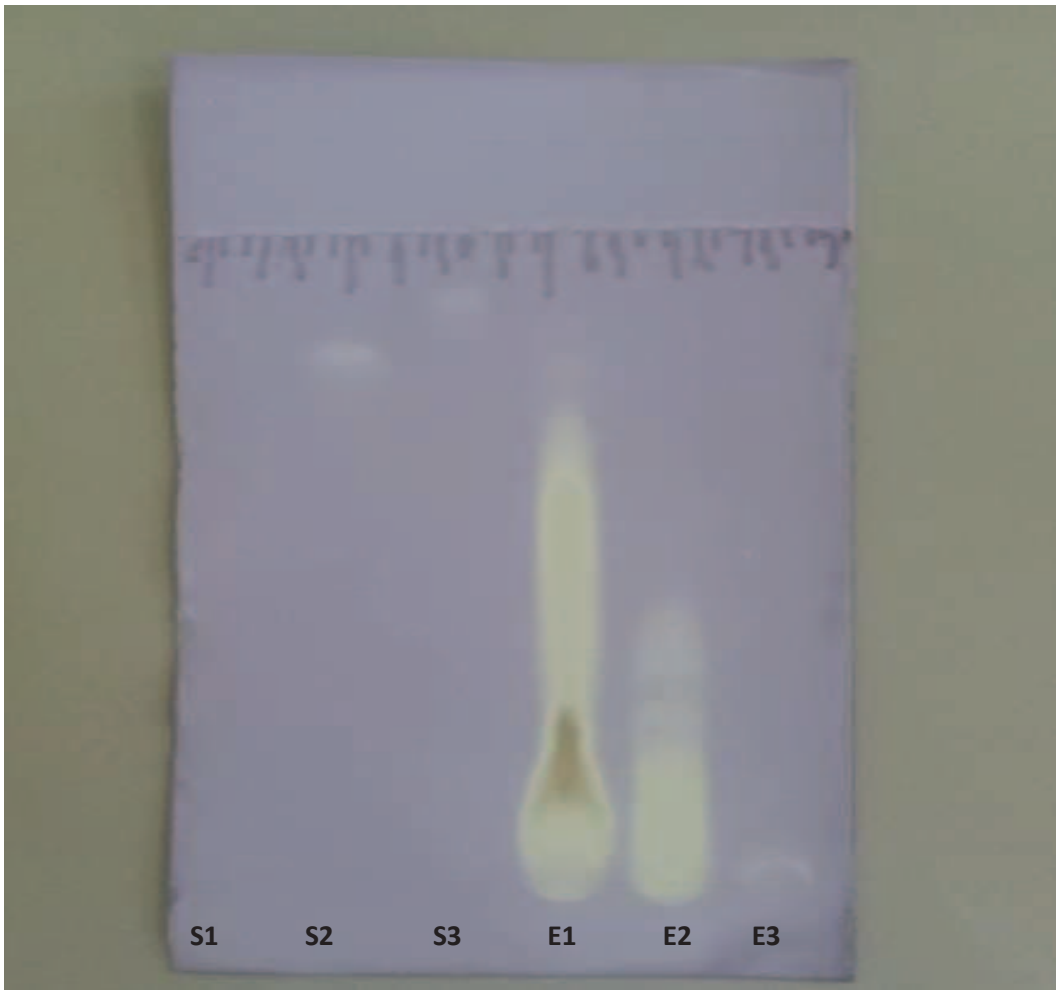


Figure 15 : Profil 1 de séparation en CCM des standards et échantillons après révélation par le DPPH.

S1 : acide tannique à une concentration de 0,2 mg/ml, **S2 :** acide gallique à une concentration de 0,2 mg/ml, **S3 :** quercétine à une concentration de 0,2 mg/ml, **E1 :** extrait pur, **E2 :** dilution 1/10, **E3 :** dilution 1/100.

L'absence de migration de l'acide tannique peut être expliquée par la faible concentration de ce dernier. Pour cette raison, nous avons réalisé une deuxième CCM avec des concentrations plus élevées.

Le résultat de la deuxième CCM a été obtenu après 6h de migration de l'extrait sur la plaque de silice, les spots formés par l'acide gallique et la quercétine ont montré le même niveau de migration que ceux formés par l'extrait pur, quant à l'acide tannique, il a montré des spots du même niveau de migration que ceux formés par les dilutions 1/4, 1/8 et 1/16.Précisons que l'apparition de deux spots pour un même standard (acide tannique) peut

s'expliquer par l'impureté de ce dernier. Les résultats de la migration suggèrent la présence des polyphénols y compris les tanins, l'acide gallique et la quercétine dans l'écorce de la grenade. Les rapports frontaux (RF) des standards et des échantillons sont représentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Rapports frontaux(RF) des standards phénoliques et des échantillons calculés après séparation sur CCM avec le mélange : butanol/acide acétique/eau (60:15:35).

Standards et échantillons	symbole	RF
Acide tannique	S1 et S2	0,44 et 0,60
Acide gallique	S3	0,8
Quercétine	S4 et S5	0,89
Extrait pur	E1	0,8 et 0,9
Dilution 1/4	E3	0,59
Dilution 1/8	E4	0,45
Dilution 1/16	E6	0,41

La figure 16 présente le profil de séparation en CCM des extraits phénoliques après révélation par le DPPH.

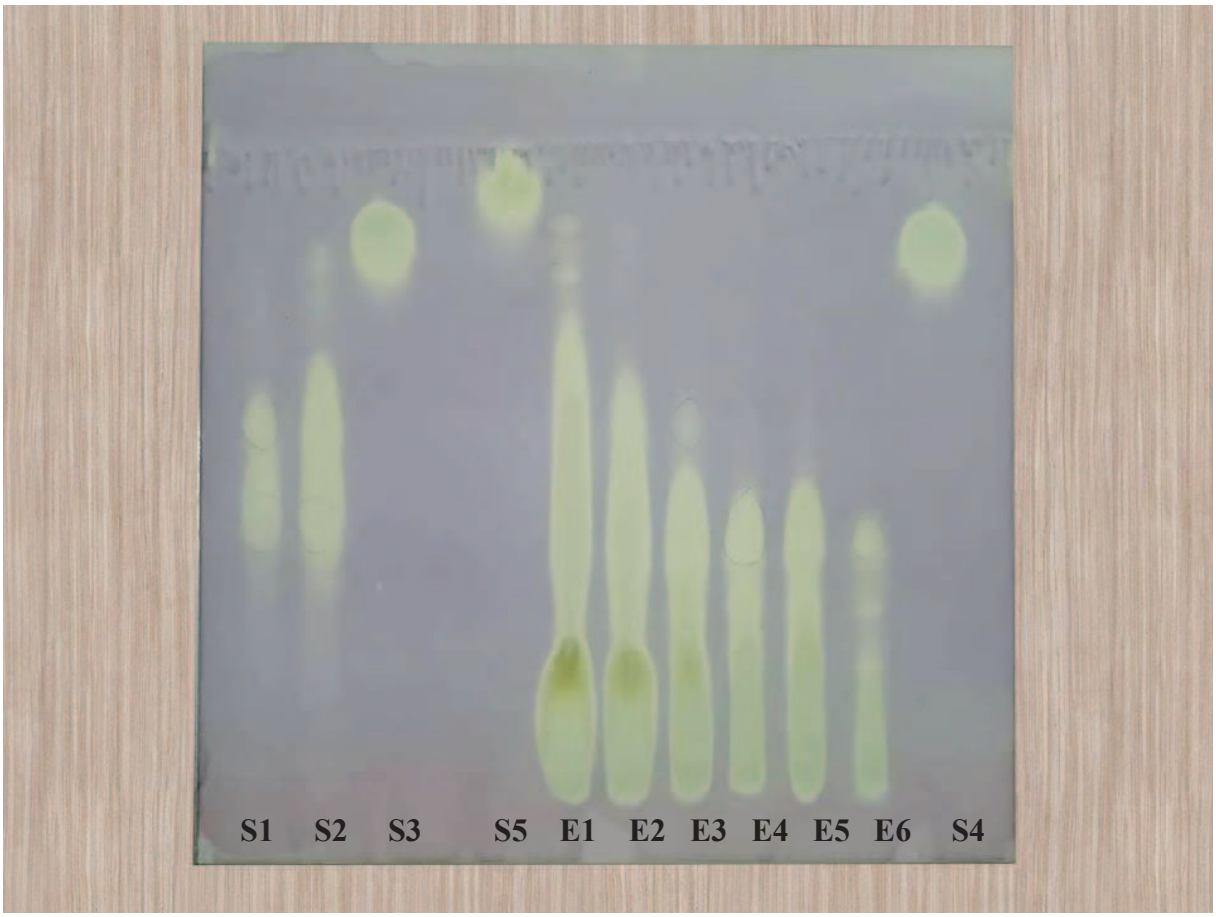


Figure 16 : Profil 2 de séparation en CCM des standards et échantillons après révélation par le DPPH.

S1 : acide tannique a une concentration de 1mg/ml, **S2** : acide tannique à une concentration de 2mg/ml, **S3** et **S4** : acide gallique à une concentration de 1mg/ml, **S5** : quercétine à une concentration de 1mg/ml, **E1** : extrait pur, **E2** : dilution 1/2, **E3** : dilution 1/4, **E4** : dilution 1/8, **E5** : dilution 1/10, **E6** : dilution 1/16.

Ces résultats corroborent ceux de l'analyse quantitative.

Généralement, toutes les plantes de la famille des punicaceae sont connues pour leur richesse en composés phénoliques (**WALD, 2009**). Ceci est en accord avec nos résultats. Soulignons que, les échantillons testés (l'extrait de l'écorce et le jus de la grenade) sont des mélanges de plusieurs composés, avec des groupements fonctionnels, des polarités et des comportements chimiques différents, cette complexité chimique pourrait conduire à des résultats dispersés selon le test utilisé **(OZTURK *et al.*, 2007)**.

D'après la littérature scientifique, le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs : les facteurs climatiques et environnementaux :

l'aire géographique, la sécheresse, le sol, etc. **(EBRAHIMI *et al*., 2008)**. La composition génétique, la période de récolte, la méthode de stockage et le stade de développement du fruit (**MILIAUSKAS *et al*., 2004 ; STRATIL *et al*., 2007**). D'ailleurs, il a été démontré que les teneurs en polyphénols totaux sont élevées lorsque l'environnement végétal est insuffisant, auquel cas la plante favorise la synthèse de métabolites secondaires pour s'adapter et survivre (**MAKOI et NDAKIDEMI, 2007 ; PIQUEMAL, 2004)**. La méthode d'extraction y compris la nature des solvants utilisés peut également influencer l'estimation de la teneur totale en polyphénols **(LEE *et al*., 2003)**.

2.5. Tests des activités biologiques

2.5.1. Test de l'activité anti-oxydante

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité anti-oxydante de nos échantillons, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical (**BOZIN *et al*., 2008**).

L'activité anti-radicalaire à une dilution de 1/100 de l'extrait de l'écorce a donné un pourcentage d'inhibition de 82,87 ± 2,4 %, pour le même poids sec et pour la même dilution, l'antioxydant standard (acide ascorbique) à un pourcentage d'inhibition de 50,92 ± 0,09 %. On constate donc que l'activité anti-radicalaire de notre extrait de l'écorce est beaucoup plus importante que celle du standard.

Le résultat obtenu est en accord avec ceux rapportés par **MALVIYA *et al*. (2014)**. En effet, il se situe entre 79,5% et 94,6%, qui représentent la capacité d'inhibition du radical libre (DPPH) de l'extrait méthanolique et hydro-éthanolique respectivement pour une même concentration de notre extrait (0,2g/ml). Cependant, une autre étude de **ZAHIN *et al*. (2010)** a trouvé des pourcentages d'inhibition de 90,53%, 84,4% et 83,2% pour les fractions de méthanol, d'acétone et d'éthanol respectivement à une concentration de 80µg/ml. Ces résultats sont considérés comme supérieurs à celui de notre échantillon étant donné que la concentration de notre extrait d'écorce qui est de 1600µg/ml (calculée à partir du poids sec de l'extrait de l'écorce) est supérieure à 80µg/ml.

Pour ce qui est de l'activité anti-radicalaire du jus de grenade (pur), nous avons eu un pourcentage d'inhibition de 63,21 ± 0,1 %, pour le même poids sec, l'antioxydant standard (acide ascorbique) à un pourcentage d'inhibition de 96,81 ± 0,6 %. On remarque que l'activité anti-radicalaire de notre jus est inférieure à celle du standard.

Ce résultat est en concordance avec celui trouvé par **GIL *et al*. (2000).** Ces derniers ont réalisé une extraction méthanolique qui a donné un pourcentage d'inhibition de 26.4% pour une concentration similaire à la nôtre et une dilution de 1/50. La même étude a obtenu un pourcentage d'inhibition de 0% pour une extraction aqueuse. Une autre étude **(ALOQBI *et al*., 2016)** a rapporté des pourcentages d'inhibition de 14,4%, 27,5% et 37,9% pour des concentrations de 0,05, 0,1 et 0,15 mg/ml. Ces pourcentages d'inhibitions sont inférieurs à celui que nous avons trouvé (63,21%).

La teneur élevée en composés phénoliques contenue dans l'extrait de l'écorce de grenade peut expliquer sa forte activité antioxydante. Dans les investigations sur les activités antioxydantes de certains extrais de peau de fruit y compris la grenade et la banane, la peau de grenade a montré l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée **(OKONOGI *et al*., 2007)**.

Les résultats de test de piégeage du radical libre DPPH suggèrent que les composants qui se trouvent dans l'écorce de la grenade sont capables de piéger les radicaux libres par l'intermédiaire des mécanismes de donation d'électrons ou d'hydrogène et pourrait donc être en mesure d'empêcher l'initiation des réactions en chaine des radicaux libres délétères induites dans les matrices sensibles comme les membranes biologiques. Ceci indique que les composants de l'écorce de grenade peuvent être des agents thérapeutiques utiles pour le traitement des dommages pathologiques liés aux radicaux (**ABDELAZIN *et al*., 2011**).

2.5.2. L'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, dans le but de tester l'effet de nos échantillons sur quatre souches bactériennes à une concertation de 0,16 g/ml pour l'extrait de l'écorce et 0,11 g/ml pour le jus. Les résultats de l'essai sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Résultats de l'essai de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce et du jus de grenade.

Souches	Volume de l'extrait de l'écorce	Diamètre d'inhibition	Volume du Jus	Diamètre d'inhibition
pseudomonas	10 µl	+++	10 µl	-
	20 µl		20 µl	
	40 µl		40 µl	
Escherichia coli	10 µl	+++	10 µl	-
	20 µl		20 µl	
	40 µl		40 µl	
Staphylococus aureus	10 µl	++	10 µl	-
	20 µl		20 µl	
	40 µl		40 µl	
Bacillus cereus	10 µl	+	10 µl	-
	20 µl		20 µl	
	40 µl		40 µl	

D'après les résultats obtenus, il apparait que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'écorce, contrairement au jus de grenade qui n'a aucun effet sur celles-ci. De plus, il est remarquable que tous les volumes utilisés montrent le même effet inhibiteur sur toutes ces souches.

A partir des résultats exprimés dans le tableau précédent, L'activité antimicrobienne du jus a été négligée alors que celle de l'extrait de l'écorce a été re-testée en exprimant les résultats comme diamètre de zones d'inhibition des différentes souches bactériennes.

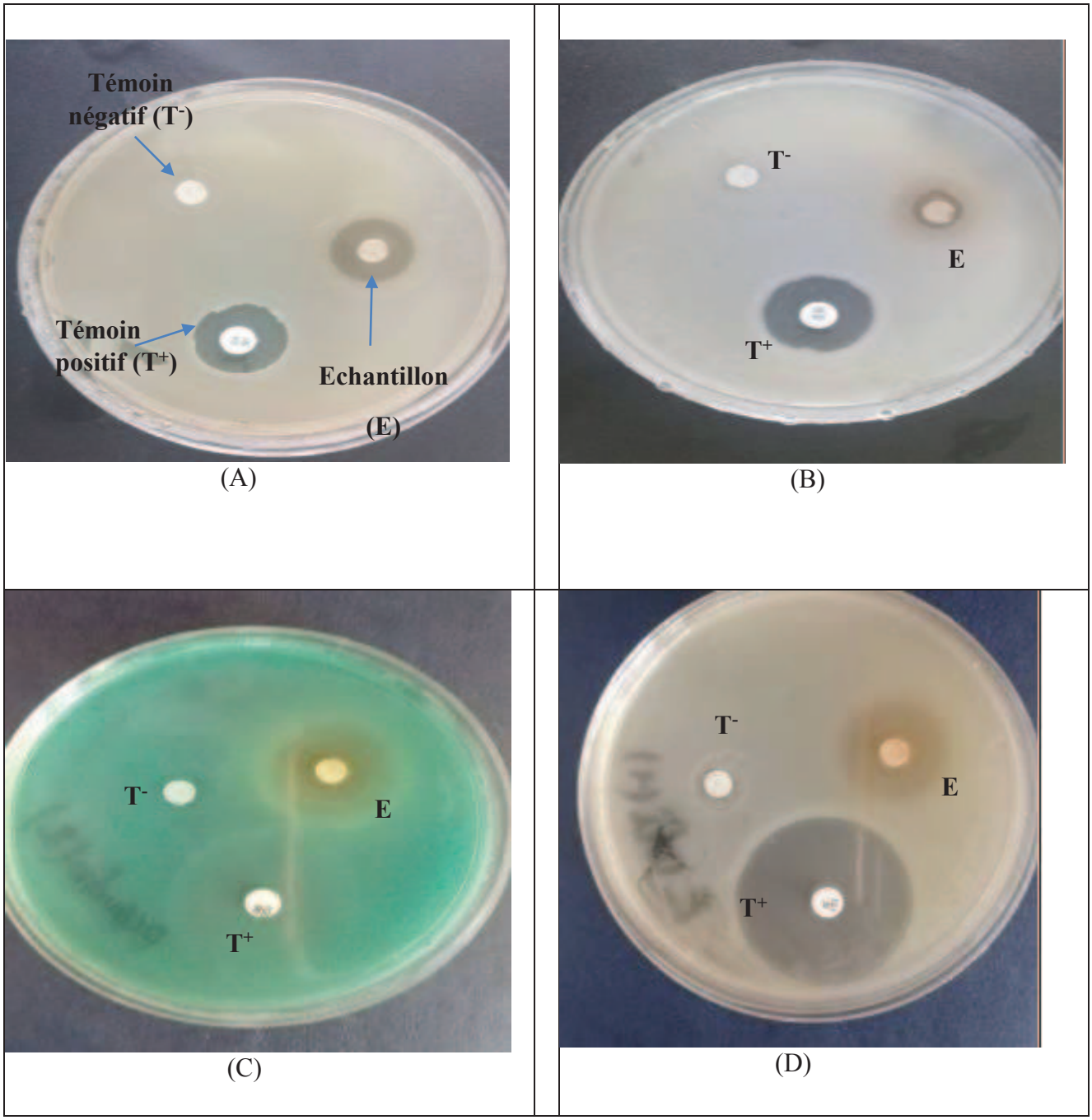


Figure 17 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de grenade sur les quatre souches testées (A : *Staphylococcus aureus,* B *: Bacillus cereus,* C *: Pseudomonas aeruginosa,* D *: Escherichia coli*).

Les souches *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* montrent les mêmes zones d'inhibition dont les diamètres sont de 18 à 21 mm Ces dernières sont inférieures à celle de la souche *Bacillus cereus* qui est de 8 mm.

REGUIEG YSAAD et HAMMADI. (2017) ont trouvé que tous les extraits de grenade (extrait aqueux, éthanolique et méthanolique) à une concertation de 0,1 g/ml, montrent une activité antibactérienne élevée sur *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité antibactérienne de ces extraits sur les souches *Pseudomonas* et *Escherichia coli* corroborent nos résultats. Pour la même étude, la zone d'inhibition trouvée pour la souche *Staphylococcus aureus* est plus élevée à celle trouvé avec notre extrait.

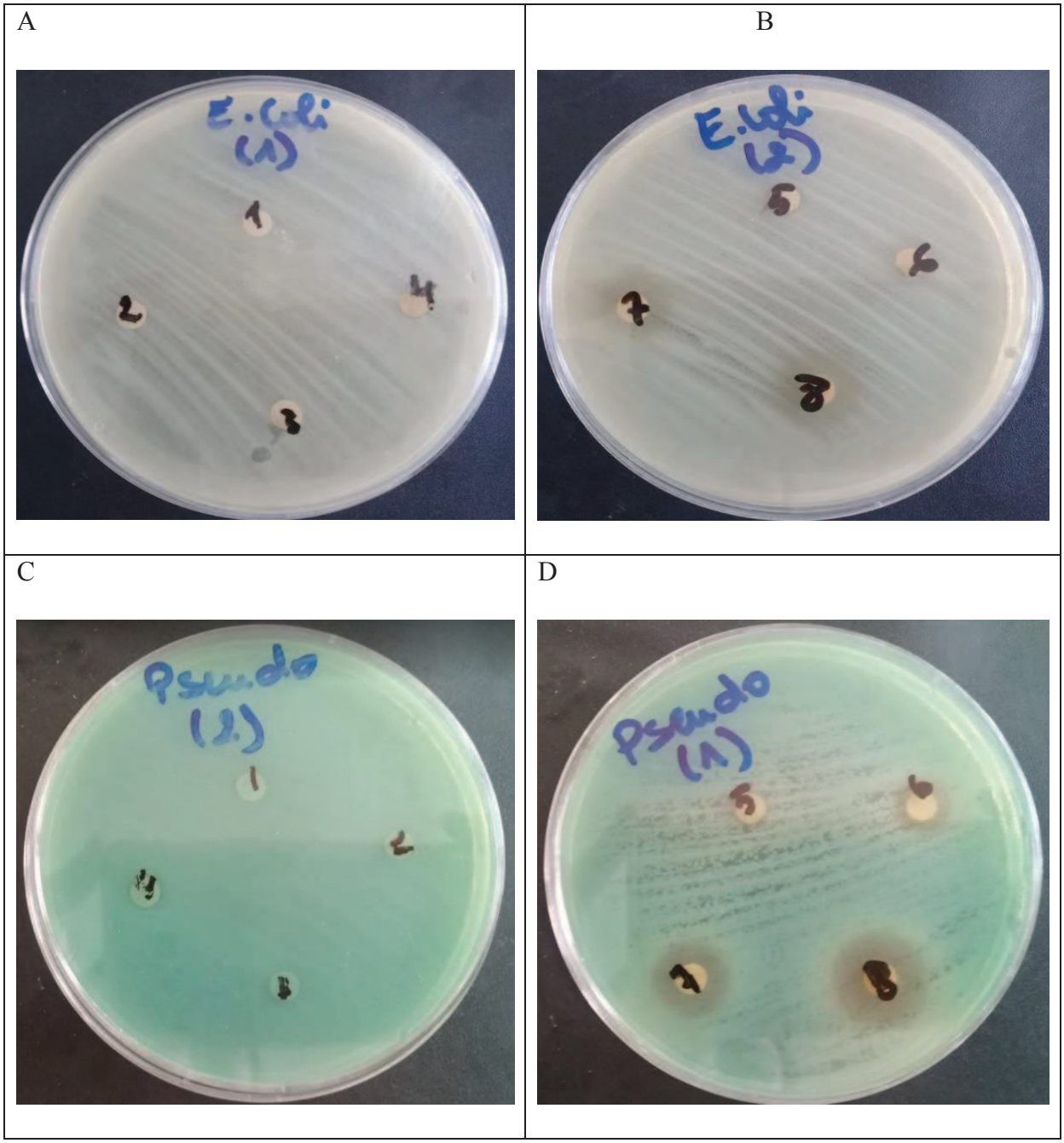
D'après **BENDJABEUR. (2012)**, pour une concentration de 0,1 g/ml l'extrait de la peau de la grenade n'a aucune activité antibactérienne contre Escherichia *coli.* Ce résultat a été trouvé aussi par **ALHIJNA et BOURICH. (2017)**.

La sensibilité des souches Gram- (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*) est due à la présence d'une fine couche de peptidoglycane perméable aux alcools y compris l'éthanol présent dans notre extrait. Cependant pour les Gram+ (*Bacillus cereus*) la présence d'une paroi épaisse de peptidoglycane empêche la pénétration de substances antibactériennes solubilisées dans l'éthanol. L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram+ aux changements environnementaux externes tel que la température, le pH et les extraits naturels, dû à l'absence de la membrane externe **(BALENTINE *et al*., 2006)**. **BRAGA *et al*. (2005)** ont observé que les extraits méthanoliques de grenade pouvaient inhiber non seulement la croissance de S. aureus mais également la production de l'entérotoxine.

2.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'analyse des résultats des CMI déterminé en utilisant la méthode des dilutions dans un milieu gélosé confirme les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque.

Selon les résultats de la figure 18, il apparait que les dilutions allant de 1/2 à 1/16 de l'extrait de l'écorce de grenade exercent une activité inhibitrice sur toutes les souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Pour ce qui est de la souche *Bacillus cereus,* la CMI n'a pas été déterminée en raison de la faible zone d'inhibition apparue dans la méthode précédente.



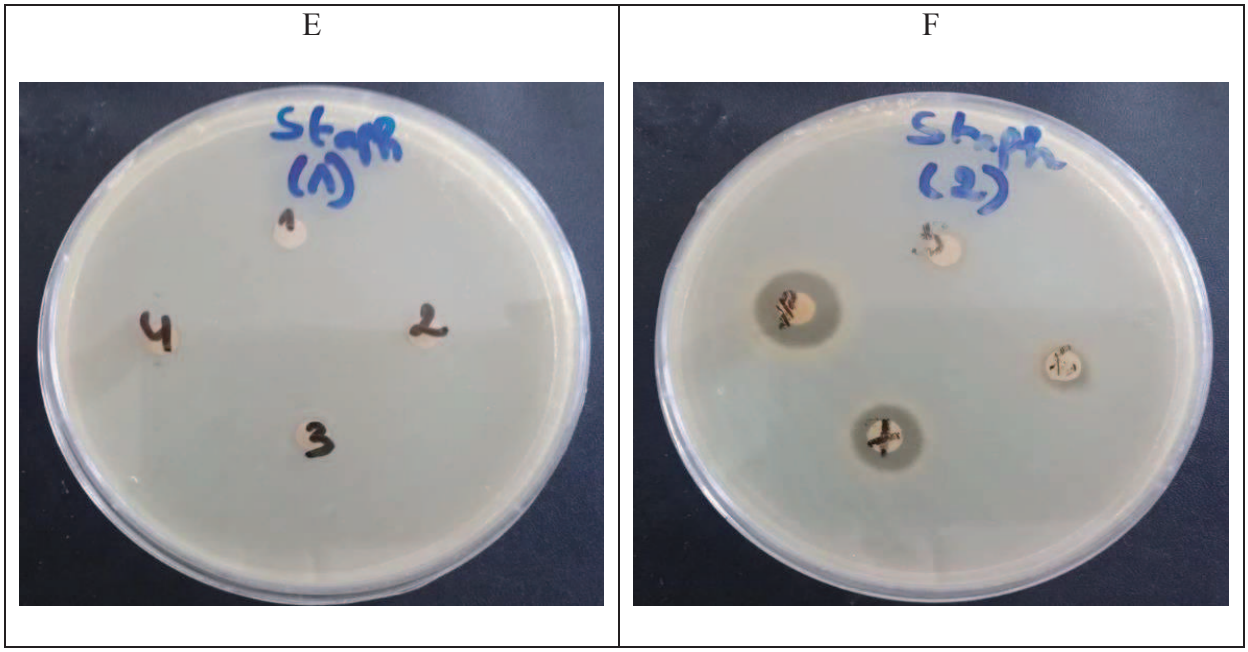


Figure 18 : résultat de la CMI de l'extrait de l'écorce de grenade sur les trois souches testées (A, B : *Escherichia coli. C, D : Pseudomonas. E, F : Staphylococcus aureus*).

1 :0,78125 mg/ml, **2** : 1,5625 mg/ml, **3** :3, 125 mg/ml, **4** : 6,25 mg/ml, **5** : 12,5 mg/ml, **6** : 25 mg/ml, **7** : 50 mg/ml, **8** : 100 mg /ml.

Les trois souches montrent la même CMI avec une concentration de 0,01g/ml ce qui explique la similarité des diamètres de zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque.

L'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de grenade est due aux divers agents chimiques présents dans ce dernier, y compris les flavonoïdes, les tanins ainsi que d'autres composés phénoliques qui sont classés comme composés antibiotiques hautement actifs **(REGUIEG YSAAD et HAMMADI, 2017).** Ainsi **COWAN. (1999)** a suggéré que les propriétés antimicrobiennes des tanins pourraient être liées à leur capacité d'inactiver les adhérences microbiennes, les enzymes et les protéines de transports d'enveloppe de cellules, leur complexité avec les polysaccharides et leur capacité de modifier la morphologie des microorganismes. **(MACHADO *et al.*, 2003 ; NAZ *et al.*, 2007 ; Al-ZOREKY, 2009)** ont également suggéré que le mécanisme responsable de la toxicité des composés phénoliques sur les microorganismes est lié à la réaction de ces composés aux groupes sulfhydriques des

protéines ce qui engendre l'indisponibilité des substrats aux microorganismes, de plus les polyphénols interférents avec les sécrétions protéiques bactériennes.

Conclusion

Certains composants de la grenade tels que l'écorce sont considérés comme une source importante de composés phénoliques possédant une bonne activité antioxydante et antimicrobienne. Il ressort de cette étude les points importants suivants :

- L'écorce de grenade a montré une teneur en polyphénols assez élevée (281,25 ± 1,69 mg EAG/g Ps) dont les flavonoïdes (¨12,07 ± 0,23 mg EQ/g Ps), les tanins condensés (53,27 ± 0,35 mg EAT/g Ps) et les tanins hydrolysables (62,5 ± 0,1 mg EAT/g Ps) pour un faible rendement d'extraction (0,8 ± 0,0003 %). Ces teneurs sont considérées beaucoup plus importantes par rapport à celles trouvés pour le jus de grenade qui sont de 31,45 ± 0,88 mg EAG/g Ps Pour les polyphénols totaux, 0,90 ± 0,03 mg EQ/g Ps pour les flavonoïdes, 8,67 ± 0,08 mg EAT/g Ps et 7,72 ± 0,1 mg EAT/g Ps pour les tanins condensés et hydrolysables respectivement.
- L'extrait de l'écorce de grenade a indiqué également une activité anti-oxydante élevée (82,87 ± 2,4 %) dépassant celle de la vitamine C (50,92 ± 0,09 %) et du jus de la grenade (63,21 ± 0,1 %). Cette activité est hautement dépendante de la concentration en polyphénols.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'écorce a été réalisée sur quatre souches bactériennes (2 Gram+ et 2 Gram-). Le jus de grenade n'a aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*. Cependant, l'extrait de l'écorce a montré un effet assez important sur *Pseudomonas, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibitions allant de 18 à 21mm, par contre il a montré un effet moins important sur *Bacillus cereus* avec une zone d'inhibition de 8 mm.
- Sur la base de la connaissance de ces propriétés, il serait possible d'utiliser l'extrait de l'écorce pour formuler de nouveaux produits à utiliser dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique comme antioxydant naturel en les substituant aux antioxydants synthétiques, et également comme conservateurs naturels.

Etant donné que la détermination *in vitro* de l'activité anti-oxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'écorce sans ajouter l'interférence des substances constituant l'aliment ou le médicament, elle ne peut pas nécessairement reproduire toute la variabilité qui pourrait exister dans le système complexe de ces derniers. Donc, il serait très utile de :

- Confirmer le potentiel d'activité antioxydante de l'extrait par l'application de d'autres tests supplémentaires tels que la méthode dite Oxygen radical absorbance capacity

(ORAC), la méthode de Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) et Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP) ;

- Evaluer l'activité antioxydante par des essais *in vivo* sur des animaux comme les rats ;
- Purifier les molécules responsables des activités biologiques de la grenade à l'aide d'une chromatographie liquide de haute performance (HPLC) ;
- Etudier l'effet antimicrobien de l'extrait de l'écorce sur des levures et champignons ;
- Etudier la possibilité de combiné l'effet antimicrobien de l'extrait de l'écorce avec d'autres antibiotiques afin de produire des antibiotiques plus efficace contre les bactéries résistantes ;
- Evaluer l'activité antimicrobienne et anti-oxydante directement dans un aliment ou un médicament ;
- Etudier l'influence de facteurs tels que le pH sur le pouvoir antimicrobien serait également un point non négligeable à éclaircir afin de mieux cibler les applications alimentaires possibles.

Par conséquent, l'écorce de grenade peut être explorée comme source antioxydante et antimicrobienne potentielle d'origine naturelle ; cependant, il est recommandé à ce que la cytotoxicité de l'écorce soit étudiée avant son application dans les aliments ou les médicaments.

Références bibliographique

AFAQ F., MALIK A., SYED D., MAES D., MATSUI MS., MUKHTAR H. (2005). Pomegranate fruit extract modulates UV-Bmediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 81, 38-45.

AFAQ F., SALEEM M., KRUEGER C.G., REED J.D. et MUKHTAR H. (2005). Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal Cancer*, 113, 423-433.

AGUILERA-CARBO A., AUGUR C., PRADO-BARRAGAN L. A., FAVELA-TORRES E. et AGUILAR C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78,189-199.

ALBRECHT M., JIANG W., KUMI-DIAKA J., LANSKY E.P., GOMMERSALL L.M., PATEL A., MANSEL R.E., NEEMAN I., GELDOF A.A. et CAMPBELL M.J. (2004). Pomegranate extracts potently supress proliferation, xeno-graft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *Journal Medicinal Food*, **7** (3), 274-283.

ALHIJNA O.S.A et BOURICH E.H. (2017). Grenade de Beni Snous : Etude et Caractérisation Chimique des Extraits de Pépins, Evaluation de l'Activité Microbiologique. Diplôme de Docteur en Pharmacie. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid Faculté de Médecine Tlemcen, 80 p.

Al-MAIMAN SA et AHMAD D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (Punica granatum L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76, 437-441.

ALOQBI A., OMAR U., YOUSR M. et HOWELL N.K. (2016). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Punicalagin. *Natural Science* ,08(06),235-246.

AL-ZORKY N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.

AMAROWICZ R., PEGG R.B., RAHIMI-MOGHADDAM P., BARL B. et WEIL J.A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.

AVIRAM M., DORNFELD L., ROSENBLAT M., VOLKOVA N., KAPLAN M., COLEMAN R., HAYEK T., PRESSER D. et FUHRMAN B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1062-76.

AVIRAM M et DORNFELD L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis, 158(1), 195-8.

AVIRAM M.,ROSENBLAT M., GAITINI D, NITECKI S., HOFFMAN A., DORNFELD L., VOLKOVA N., PRESSER D., ATTIAS J., LIKER H. et HAYEK T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23(3), 423-33.

AVIRAM M., VOLKOVA N., COLEMAN R., DREHER M., REDDY M.K., FERREIRA D. et ROSENBLAT M. (2008). Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3), 1148-1157.

BENDJABEUR S. (2012). Evaluation du Pouvoir Antioxydant et Antimicrobien des Extraits Végétaux (cas de la grenade *Punica granatum L.*) en Vue de leur Utilisation Alimentaire. Diplôme de Magister en Sciences Agronomiques. Alger : Ecole Nationale Supérieur Agronomique EL-HARRACH, 154 p.

BENJILALI B. (1986). Sur trois plantes aromatiques et médicinales du Maroc : armoises, thym et origans. Chimie de leurs huiles essentielles, chimiotaxinoie et propriétés antimicrobiennes, thèse de doctorat ès-sciences agronomiques, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Maroc.

BOULLARD B. (2001). Plantes médicinales du monde ; **in** :« Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 p.

BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SAMOJLIK I. et IGIC R. (2008). Phenolic as antioxidant in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4),925-929.

BRUNETON J. (2008). Acides phénols. In : Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.

BRAGA L.C., SHUPP J.W., CUMMINGS C., JETT M., TAKAHASHI J.A., CARMO L.S., CHARTONE-SOUZA E et NASCIMENTO A.M. (2005). Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. *Journal Ethnopharmacol*, 96, 335-339.

ÇAM M et HISIL Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*,123 (2010), 878–885.

CARDON D. (2003). Le monde des teintures naturelles ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

CAUCHARD P. (2013). La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage. France : Université Angers, 56 p.

CLIFFORD M.N. (1999). Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea Washington. DC, CRC *Press, Boca Raton* Florida, 41 (5), 393-397.

COWAN M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

DALIMOV D.N., DALIMOVA G.N. et BHATT M. (2003). Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 37-40.

DANGLES O et DUFOUR C. (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. *In Recent Advances in Polyphenol Research. Blackwell Publishing*, 01, 67-87.

DANGLES O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols : chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 16, 692-714.

D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R., GIOVANNINI C. et MASELLA R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dellIstituto-Superiore-di-Sanità*, 43(4), 348-361.

DELL'AGLI M., GALLI G.V., BULGARI M., BASILICO N., ROMEO S., BHATTACHARYA D., TARAMELLI D. et BOSISIO E. (2010). Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize in vitro the host inflammatory response mechanisms involvedin the onset of malaria. *Malaria Journal*, 9, 208.

EBRAHIMI N.S., HADIAN J., MIRJALILI M.J., SONBOLI A. et YOUCEFZADI M. (2008). Composition d'huile essentielle et activité antibactérienne de thymus caramanicus et différentes étapes phonologiques. *Food chemistry*, 110, 927-931.

ELFALLEH W., HANNACHI H., TLILI N., YAHIA Y., NASRI N. et FERCHICHI A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(xx), 4724-4730.

ESMAILLZADEH A., KIMIAGAR M., MEHRABI Y., AZADBAKHT L., HU FB. et WILLETT WC. (2006). Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome. *American Journal Clinical Nutrition*, 84(6), 1489-97.

FOURNIER P. (1948). Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse

pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

FUKUMOTO L R et MAZZA G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.

GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L., *et al*. (1961). Ressources médicinales de la flore française ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

GHAZI F et SAHRAOUI S. (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et 4 ième Séminaire Maghrébin sur les Sciences et les Technologies de Séchage (SMSTS 2013) 8 Hamraia, mémoire d'ingéniorat en agronomie, El Harrach

GHEDIRA K. (2005). Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 04, 162-169.

GIL MI., TOMAS-BARBERAN F.A., HESS-PIERCE B., HOLCROFT D.M, KADER A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48(10) :4581-4589.

GUILLAUME G., MACH-CHIEU. (1987). Pharmacopée et médecine traditionnelle chinoise - Plantes chinoises, plantes occidentales ; **in** : « Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 2009, 158 pages.

HAKKINEN S.H., KARENLAMPI S.O., HEINONEN I.M., MYKKANEN H.M. et TORRONEN A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,2274-2279.

HAVSTEEN B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67-202.

HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R. et BOBILVA D.J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

HEINECKE J.W. (2006). Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 813-6.

HONG M.Y., SEERAM N.P. et HEBER D. (2008). Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthsizing genes in human prostate cancer cells over-expressing the androgen receptor. *Journal Nutrition Biochemistry*, 19, 848-855.

HYNES M.J., O'COINCEANAINN M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85(2-3): 131–142.

JACOB J., LAKSHMANAPERMALSAMY L., ILLURI D., BHOSLE D., SANGLI G.K. et MUNDKINAJEDDU D. (2018). In vitro evaluation of antioxidant potential of isolated compounds and various extracts of peel of *punica granatum* L. *Pharmacognosy ress* 10 (1): 44-48.

JAFRI MA. , ASLAM M. , JAVED K. , SINGH S . (2000). Effect of Punica granatum Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 309-314.

JAHFAR M., VIJAYAN KK. et AZADI P. (2003). Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Research Journal of Chemistry and Environment*, **7**, 43-50.

KATZ SR., NEWMAN RA. et LANSKY EP. (2007). Punica granatum: heuristic treatment for diabetes mellitus. Journal Medicinal Food, 10(2), 213-217.

JOSLYN M.A. (1970). A serie of monographies. *Journal Food Sciences*. Techn. 2éme Edition. Board.

JOVANOVIC S.V., STEENKEN S., TOSIC M., MARJANOVIC B. et SIMIC M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society*, 116, 4846-4851.

JULIANO C et MAGRINI G.A. (2017). Cosmetic ingredients as emerging polluants of environmental and health concern. *Cosmetics*, 4 (2): 11.

KACI-MEZIANE Z., ELOTHMANI D. et BOUTEKRABT-BENHADJA L. (2016). Caractéristiques morphologiques et physicochimiques de trois cultivars de grenade cultivés dans le nord algérien. *Fruits*, **17**(1), 17-26.

KAKHLON O et CABANTCHIK Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(8), 1037–1046.

KATZ S.R., NEWMAN R.A. et LANSKY E.P. (2007). Punica granatum : heuristic treatment for diabetes mellitus. *Journal Medicine Food*, 10(2), 213–217.

KOBAYASHI H. OIKAWA S., HIRAKAWA K. et KAWANISHI S. (2004). Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutation Research*, 558, 111-120.

KONSOULA Z. (2016). Comparative Efficacy of Pomgranate Juice, Peel and Seed Extract in the stabilization of Corn Oil under Accelerated Conditions. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 10(9).

KULKARNI A.P et ARADHYA S.M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food chemistry*, 93, 319-324.

LANSKY E.P et NEWMAN R.A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal Ethnopharmacol*, 109 (2), 177-206.

LAROSSA M., GONZALEZ-SARRIAS A., YANEZ-GASCON M.J., SELMA M.V., AZORIN-ORTUNO M., TOTI S., TOMAS-BARBERAN F., DOLARA P. et ESPIN J.C. (2010). Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A

in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *Journal Nutrition Biochemistry*, 21 (8): 717-725.

LEE C.E., REMFERT J.L. et GELEMBIUK G.W. (2003). Evolution of Physiological Tolerance and Performance During Freshwater Invasions. *Integrative and Comparative Biology*, 43, 439–449.

LEE CJ, CHEN LG, LIANG WL, WANGA CC. (2010). Anti-inflammatory effects of *punica granatum* linne *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 118: 315-322.

LEE KW., KIM YJ., LEE HJ. et LEE C.Y. (2003). Cacao a plus de composés phyto-chimiques phénoliques et une plus grande capacité anti-oxydante que les thés et le vin rouge. *Food Chemistry*, 51, 7292-7295.

LHUILLERY S. (2006). Voluntary technological disclosure as an efficient knowledge management device : An empirical study, Economics of Innovation and New Technology. *Taylor and Francis Journals*, 15(4-5), 465-491.

LIN C., CHEN C., LIANG Y. et LIN J. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 167-172.

L'Oréal SA. Use of Ellagic acid as an anti-pollution cosmetic agent. **DUCH D., COTOVIO J., CATROUX PH.** Classification international: US 20040013696 A1. Jan. 22, 2004.

MAATAOUI B.S., HMYENE A. et HILALI S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (O*puntia ficus indica). Lebanese Science Journal 7 : 3-8.*

MACHADO T.B., PINTO A.V., PINTO M.C.F.R., LEAL I.C.R., SILVA M.G., AMARAC A.C.F., KUSTER R.M. et NETTO-DOS SANTOS K.R. (2003). *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occuring naphtoquinones and their analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, 279-284.

MADRIGAL-CARBALLO S., RODRIGUEZ G., KRUEGER C.G., DREHER M. et REED JD. (2009). Pomegranate (Punica granatum L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal Funtional Foods*, 1, 324-329.

MAKOI J.H et NDAKIDEMI P.A. (2007). Importance biologique, écologique et agronomique des composés phénoliques végétaux dans la rhizosphère des légumineuses symbiotiques. *African Journal of Biotechnology***,** 6, 1358-1368.

MALVIYA S., ALOK JHA A. et HETTIARACHCHY N. (2014). Antioxidant and Antibacterial Potential of Pomegranate Peel Extracts. *Journal Food Science Technology*, 51(12), 4132–4137.

MBAYE DIENG M. (2007). Étude phytochimique et activité antifongique des feuilles de Borassus aethiopum Mart. Mémoire de maitrise en sciences naturelles. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 69 pages.

MELGAREJO P et SALAZAR D M.S. (2003). Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiáridas. Vol. 2 : Algarr. 416 p. In : HMID I. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica Granatum L.*) : Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Maroc : Université de Béni Mellal, 2013,180 p.

MIRDEHGHAN S.H et RAHEMI M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (Punica granatum L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111,120-127.

MILIAUSKAS G., VENSKUTONIS P.R. et VAN BEEK T.A. (2004). Dépistage de l'activité anti-radicalaire de certains extraits de plantes médicinales et aromatiques. *Food Chemistry*, 85, 231-237.

MURTHY K.N., REDDY V.K., VEIGAS J.M. et MURTHY U.D. (2004). Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *Journal Medicine Food*, **7** (2), 256-259.

NAGAO. A., SEKI M. et KOBAYASHI H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Bioscience, *Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1787-1790.

NAZ S., SIDDIQI R., AHMAD S., RASOOL S. et SAYEED S. (2007). Antibacterial activity directdisolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Sciences*, 72, 341-345.

NEURATH A.R., STRICK N., LI Y.Y. et DEBNATH A.K. (2004). *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*, 4, 41

O'CONNELL J.E et FOX P.F. (2001). Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products : a review. *International Diary Journal*, 11(3),103-120.

OKONOGI S., DUANGRAT C., ANUCHPREEDA S., TACHAKITTIRUNGROD S. et CHOWWANAPOONPOHN S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103, 839–846.

OZCAL N et DINC S. (1993). Evaluation of the pomegranate (*Punica granatum L.*) peels from the standpoint of pharmacy. *Eczacılık Fakultesi Dergisi*, 22, 21-29.

OZTURK M., AYDOGMUS-OZTURK F., DURU M.E. et TOPCU G. (2007). Activité antioxydante des extraits de tige et de racine de Rhubarbe (Rheum ribes) : Une plante médicinale comestible. *Food Chemistry*, 103, 623 à 630.

PAUL DK et SHAHA P.K. (2004). Nutrients, vitamins, mineral content in common citrus fruiits in the northern region of Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **7** (2), 238-242.

PLANCHON G et COLLIN E. (1875). Traité pratique de la détermination des drogues simples d'origine végétale. Librairie F. Savy. Tome I. Pages 235-236 et 307-308. **In** : WALD E. Le grenadier (*Punica Granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Nancy 1 : Université Henri Poincare,2009, 158 p.

PIETTA P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants*, Journal of Natural Production*, 63, 1035-1042.

PIQUEMAL G. (2004). Documents et paramètres/ mb/ Flavo-perso.

PONCE A.G., FRITZ R., ROURA S.I. et DEL VALLE C.E. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic swiss chard. *Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.

PSOTOVA J., KOLAR M., SOUSEK J., SVAGERA Z., VICAR J. et ULRICHOVA J. (2003). Biological activities of Prunella vulgaris extract. *Phytother Res*, 17(9),1082-7.

QUIROZ I. (2009). Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de Mercado. Fundacion Chile. **In** : WALD E. Le grenadier (*Punica Granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Nancy 1 : Université Henri Poincare,2009, 158 p.

REDDY C.S., REDDY K.R.N., PRAMEELA M, MANGALA U.N. et Muralidharan K. (2007). Identification of antifungal component in clove that inhibits *Aspergillus* spp. colonizing rice grains. *Journla Mycol Plant Pathol*, 37, 87-94.

REDE-GANSHKUMAR D., KALYAN B., LAKSHMI N. et YUMNAM-SANTOSH S. (2016). Performance of pomegranate export from India. *Economic Affairs*, 61**(**4**),** 575-580.

REGUIEG YSSAAD A et HAMMADI K. (2017). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of the Pomegranate (*Punica granatum*). *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4 (6), 100-107.

SANCHEZ-MONGE E. (1974). Fitogenética : mejora de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*. Ministero de Agricultura*. Madrid, 456.

SANCHEZ-MORENO C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8.

SCHWARTZ E., TZULKER R., GLAZER I., BAR-YA'AKOV I., WIESMAN Z., TRIPLER E., BAR-ILAN I., FROMM H., BOROCHOV-NEORI H., HOLLAND D. et

AMIR R. (2009). Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57 (19), 9197-9209.

SEERAM N et SCHULMAN R. (2006). Pomegranates. Ancient roots to modern medicine. Editions Taylor & Francis. 244 pages.

SEZER E.D., AKCAY Y.D., ILANBEY B., YILDIRIM H.K. et SOZMEN E.Y. (2007). Pomegranate wine has greater protection capacity than red wine on low-density lipoprotein oxidation. *Journal Medicine Food*,10(2), 371-374

SINGLETON V.L et ROSSI J.A. (1965). Colorimentry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158**.**

STRATIL P., KLEJDUS B. et KOUBAN V. (2007). Détermination des composés phénoliques et de leurs propriétés anti-oxydantes. Dans les fruits et les céréales. *Talanta,* 71,1741-1751.

TEHRANIFAR A., SELAHVARZI Y., KHARRAZI M. et JAHAN BAKHSH V. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum L.*) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3),1523-1527.

TEIXEIRA J., GASPAR A., GARRIDO EM., GARRIDO J. et BORGES F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview, *Biomedicine Res International.*

TEZCAN F., GULTEKIN-OZGUVEN M., DIKEN T. et ERIM FB. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food chemistry*, 115 (3), 873-877.

TSUYUKI H., ITOH S. et NAKATSUKASA Y. (1981). Studies on the lipids in pomegranate seed. *Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihom University of Japan*, 38, 141-148).

TOMAS-BARBERAN F.A. (2010). Grenade et santé : aspects pharmacologiques et thérapeutiques de la Grenade. *Journée national de la grenade*, 7-27.

TORREGGIANI A., TAMBA M., TRINCHERO A. et BONORA S. (2005). Copper(II)–Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties. *Journal of Molecular Structure*, 744–747, (SPEC. ISS.) 759-766.

TZULKER R., GLAZER I., BAR-ILAN I., HOLLAND D., AVIRAM M. et AMIR R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 9559-9570.

VASCONCELOS L et SAMPAIO F. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of Punica granatum Linn (pomegranate) gel against S. mutans, S. mitis and C. albicans. *Brazilian dental journal*, 17(3), 223-227.

VIUDA-MARTOS M., J. FERNANDEZ-LOPEZ. et PEREZ-ALVAREZ J.A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (6), 635-654.

WALD E. (2009). Le grenadier (*Punica granatum*) : plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie. Nancy 1 : université HENRI POINCARE-Nancy 1, 158 pages.

WAHEED S, SIDDIQUE N, RAHMAN A, ZAIDI JH, AHMAD S. (2004). INAA for dietary assessment of essential and othertrace elements in 14 fruits harvested and consumed in Pakistan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260: 523-531.

WANG RF, XIE W.D., ZHANG Z, XING D.M., DING Y., WANG W., MA C. et DU L.J. (2004). Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*, 67: 2096-2098.

WELCH K.D., DAVIS T. Z. et AUST S.D. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysique*, 397(02), 360–369.

WILLIS R.B et ALLEN P.R. (1998). Determination of hydrolyzable tannins after reaction with potassium iodate. *The Analyst*, 123, 435-439.

YEN S., LIANG J.I.N., PENG X., YAN L. et JINSONG B. (2009). total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to gain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 49: 106-111.

ZAHIN M., AQIL F. et AHMAD I. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. 703(2), 99-107.

Site web:

Anonyme 1: http://www.freshplaza.com/article/193134/Peru-Pomegranate-exports-up-45-procent-in-the-first-two-months-of-the-year **(**Consulté le: 26-06-2018).

AVREINOFF V. A. (1957). Contribution à l'Etude du Grenadier. Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée [en ligne]. Vol. 4, n° 3-4, pp. 124-138. Disponible sur : https://www.persee.fr/issue/jatba_0021-7662_1957_num_4_3?sectionId=jatba_0021-7662_1957_num_4_3_2380 (consulté le : 03.05.2018).

CYR A. (2017). Grenade (la petite histoire de la grenade) [en ligne]. In : Encyclopédie des aliments.https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=grenade_nu (consulté le : 05.05.2018).

Annexes

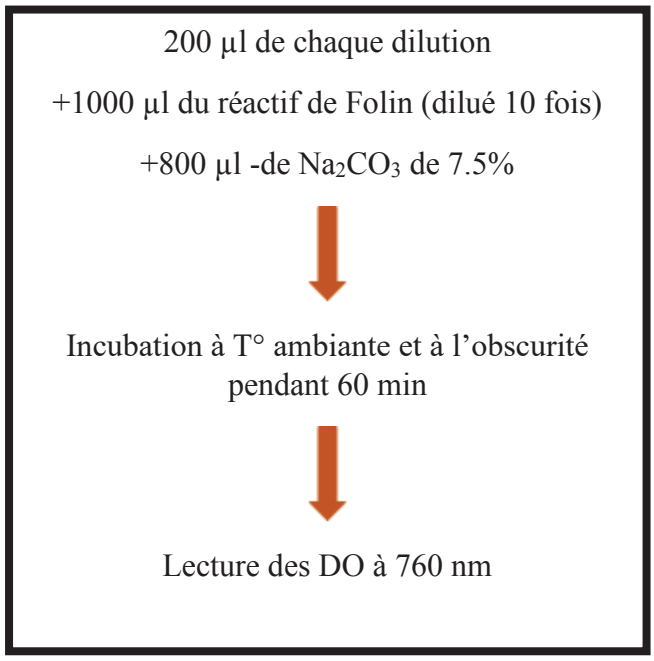
Annexes

Annexe 1 : Tableau des dilutions de l'acide gallique préparées (a) et le protocole de dosage des polyphénols totaux (b).

(a)

Concentration µg/ml	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Volume SM (µl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Volume H_2O (µl)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

(b)



Annexe 2 : Tableau des dilutions préparées de la quercétine (a) et protocole de dosage des flavonoïdes (b).

(a)

Concentration mg/ml	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
Volume SM (µl)	0	200	400	600	800	1000	1200
Volume méthanol (µl)	2000	1800	1600	1400	1200	1000	800

(b)

1 ml de chaque dilution

+3ml de méthanol

+0.2ml de la solution chlorure d'aluminium à 10%

+0.2ml d'acétate de potassium 1M

+5.6ml d'eau distillée

↓

Incubation à T° ambiante et à l'obscurité pendant 30 min

↓

Lecture des DO à 420nm

Annexe 3 : Tableau des dilutions préparées de l'acide tannique (a) et le protocole de dosage des tannins condensés (b).

(a)

Concentration mg/ml	0	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Volume SM (µl)	0	1000	1200	1400	1600	1800	2000
Volume H_2O (µl)	2000	1000	800	600	400	200	0

(b)

1 ml de chaque dilution

+ 75 ml d'eau distillée

+ 10 ml du réactif de Folin Denis

+ 20 ml de la solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3)

↓

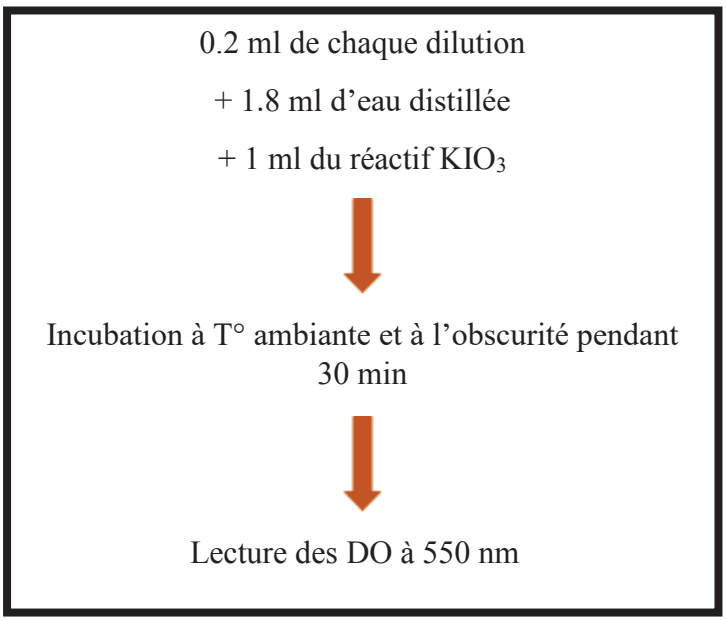
Incubation à T° ambiante et à l'obscurité pendant 30 min

↓

Lecture des DO à 760 nm

Annexe 4 : Tableau des dilutions préparées de l'acide tannique (a) et le protocole de dosage des tannins hydrolysable (b).

(a)

Concentration (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Volume de la SM (µl)	0	200	400	600	800	1000
Volume H_2O (µl)	1000	800	600	400	200	0

(b)