

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البلدية (1)
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biodiversité et Physiologie Végétale

Thème

Caractérisation phytochimique et biochimique des feuilles et des
fruits du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.)

Présenté par :

Soutenu le : 01/07/2025

- FKAIR Imene
- MEKHANEG Lina

Devant le jury :

Nom	Grade/Lieu	Qualité
Mme MELOUANI N.	MAA /USDB1	Présidente
Mme KADIR N.	MAB/USDB1	Examinatrice
Mme TOUAIBIA M.	MCA/USDB1	Promotrice

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Nous remercions en premier lieu *ALLAH* tout puissant de m'avoir accordé la puissance et la volonté pour achever ce travail.

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre chère enseignante encadrant *Mme Touaibia M.* maître de conférences à l'université de Blida 1, non seulement pour nous avoir encadrer et prodiguer le long de cette période de réalisation du travail mais aussi pour sa patience, sa gentillesse, sa confiance, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Nos profonds remerciements madame.

A notre présidente de jury *Mme Melouani N* qui a eu la volonté d'avoir accepté de lire et de juger notre modeste travail, ainsi que pour le chaleureux aide qu'elle nous a accordé.

Nos remerciements les plus distingués à *Mme Kadir N* Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner précieusement et de discuter notre travail ainsi que pour son précieux aide qu'il nous a apporté au niveau du laboratoire.

Nos sincères remerciements s'adressent à *Mr Gheribi Y*, ingénieur de laboratoire D'analyse/USBD, pour tous leurs conseils et leur aide.

Finalement nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.



Dédicace

Je voudrais dédier ce modeste travail :

À ma chère mère **Meriouma**, mon repère, mon refuge, ton amour est la lumière qui guide ma vie qui n'a pas cessé de m'encourager et m'ont donné confiance. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte



À mon chère père **Brahim**, aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime et le respect que j'ai toujours en pour vous. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

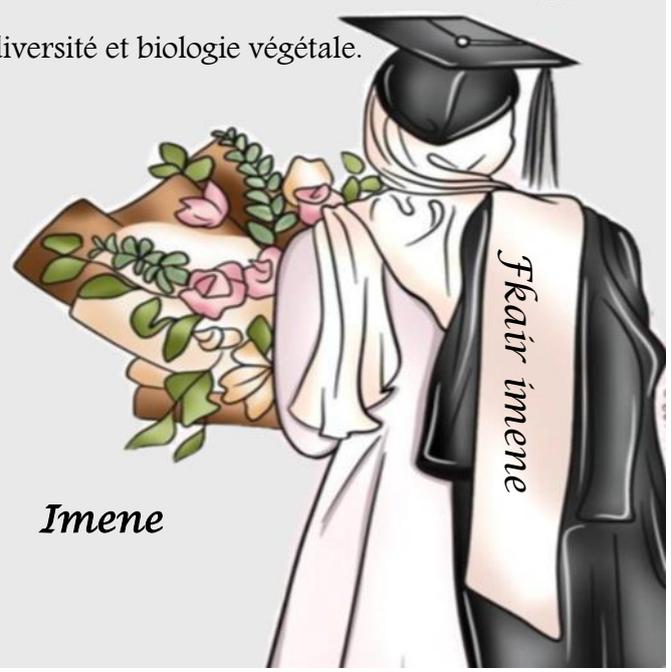
À mes sœurs **Ranime, Yakine et Soudjoud** Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Je souhaite un avenir radieux.

À **mes grandes parentes** que Dieu vous gars et vous accords santé, bonheur et langue vie.

À mon amie **Yasmine**, une amie en or ton amitié est un cadeau précieux que la vie m'a offert. Merci d'être toujours là, Yasmine, avec ton sourire et ton écoute. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

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

À tous **mes collègues** de la promotion 2025 de Biodiversité et biologie végétale.



Imene

🌸 Dédicace 🌸

Louange à Dieu, au début comme à la fin, car nul effort n'aboutit, nul projet ne s'accomplit sans Sa grâce. Le chemin fut long, le rêve lointain et les obstacles nombreux, mais par Sa miséricorde, j'ai pu atteindre ce but.

Je dédie ce mémoire de fin d'études :

À celle dont les prières ont été le secret de ma réussite, à celle qui a toujours été une lumière dans mes ténèbres : **ma chère mère WASSILA**. Cette réalisation n'aurait pu voir le jour sans vos sacrifices.

À celui qui m'a soutenu sans limite, qui m'a tout donné avec amour et générosité : **mon père MOHAMED**.

À **ma sœur Dina** et à **mes frères Chakib, Youcef, Adem et Amine**, sources de courage et de force au quotidien. Que Dieu vous protège et vous garde toujours comme mes soutiens les plus précieux.

À **mon binôme Imene**, avec qui j'ai partagé ce travail et de nombreux moments inoubliables tout au long de notre parcours universitaire.

À **Mme Tuaibia, professeure**, et **M. Youssef, ingénieur de laboratoire**, pour leur accompagnement, leur disponibilité et leurs précieux conseils dans la réalisation de ce projet.

Enfin, à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail : je vous exprime ici ma profonde gratitude.

Lina



Résumé

La présente étude contribue à la valorisation du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.). Cette plante appartenant à la famille des *Lythraceae*, possède une riche histoire ethno-médicinale et constitue un réservoir phytochimique d'une valeur inestimable. Le but de ce travail consiste à étudier quelques caractéristiques morpho-anatomiques, physico-chimiques et phytochimiques des feuilles et des fruits de cette espèce, complétés par la réalisation de quelques dosages biochimiques et de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

L'examen morphologique, fondé sur l'analyse de l'aspect, de la couleur, de la forme et de la taille des feuilles, des épicarpes et des arilles, a permis d'établir certains paramètres morphométriques caractéristiques de cette espèce. Par ailleurs, l'examen microscopique a mis en évidence plusieurs éléments relatifs à l'organisation histo-anatomique des tiges ligneuses et semi-ligneuses, ainsi que des feuilles de *Punica protopunica* Balf.

L'évaluation des paramètres physico-chimiques a révélé une forte teneur en eau, avec 77,81% pour les arilles et 68 % pour les feuilles. Le pH mesuré était acide : 2,95 pour le jus, 3,64 pour l'épicarpe et 5,00 pour les feuilles. Le taux d'humidité a été estimé à 7,22 % pour les feuilles et 8,07 % pour les épicarpes. Par ailleurs, les taux de substances extractibles dans l'eau et dans l'éthanol étaient respectivement de 20 % chacun dans les feuilles, tandis qu'ils atteignaient respectivement 20 % et 30 % dans les épicarpes, cependant, le jus a présenté les plus faibles pourcentages d'extraction avec 6,83 % dans l'eau et seulement 1,85 % dans l'éthanol.

Le criblage phytochimique des extraits réalisés sur les feuilles et les épicarpes a dévoilé la présence des glucosides, des protéines, des lipides, des saponines, des terpénoïdes, des coumarines, des tanins, des flavonoïdes et des saponosides. Cependant, les sucres réducteurs ont été détectés uniquement dans les feuilles, par contre, les anthraquinones libres n'ont pu être mis en évidence que dans les épicarpes. Tous les composés cités précédemment ont été retrouvés dans le jus, à l'exception de l'amidon et des saponines. Cette étude qualitative a été complétée par une analyse quantitative basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et de des pigments photosynthétiques.

Les résultats de l'activité anti-oxydante, évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH, ont montré un pouvoir réducteur intéressant dans l'extrait des épicarpes (49,10%) et dans le jus (85,93%), par contre, les feuilles ne dépassaient pas les 34,39 %. Ces résultats confirment le potentiel du grenadier sauvage en tant que source naturelle de composés antioxydants, prometteuse pour des applications pharmacologiques et nutritionnelles.

Mots clés : *Punica protopunica* Balf., examen morphologique, screening phytochimique, paramètres physico-chimiques, dosages biochimiques, activité antioxydante.

Abstract

The present study contributes to the valorization of wild pomegranate tree (*Punica protopunica* Balf.). This plant, belonging to the *Lythraceae* family, has a rich ethno-medicinal history and is an invaluable phytochemical reservoir. This work aims to study some morpho-anatomical, physico-chemical and phytochemical characteristics of the leaves and fruits of this species, completed by the realization of some biochemical assays and antioxidant activity by the DPPH free radical scavenging method.

Morphological study, based on analysis of the appearance, colour, shape, and size of the leaves, epicarps, and arils, allowed us to establish certain morphometric parameters of this species. In addition, microscopic essay revealed several elements relating to the histo-anatomical organization of the woody and semi-woody stems and the leaves of *Punica protopunica* Balf.

The evaluation of the physico-chemical parameters-revealed a high-water content, with 77.81% for the arils and 68% for the leaves. The pH measured was acidic: 2.95 for the juice, 3.64 for the epicarp and 5.00 for the leaves. The moisture content was estimated to be 7.22% for the leaves and 8.07% for the epicarps. Regarding extractable substances, the water and ethanol-soluble extract contents were both 20% in the leaves, while they reached 20% and 30%, respectively, in the epicarp. However, the juice exhibited the lowest extraction yields, with 6.83% in water and only 1.85% in ethanol.

Phytochemical screening of the extracts performed on the leaves and epicarps revealed the presence of glucosides, proteins, lipids, saponins, terpenoids, coumarins, tannins, flavonoids and saponosides. However, reducing sugars were detected only in leaves, while free anthraquinones could only be detected in epicarps. All the compounds mentioned above were found in juice, except starch and saponins. This qualitative study was complemented by a quantitative analysis based on the determination of total polyphenols, flavonoids, flavonols and photosynthetic pigments.

The results of the antioxidant activity, evaluated by the DPPH free radical scavenging test, showed an interesting reducing power, both in the epicarp extract (49.10%) and the juice (85.93%), on the other hand, the leaves did not exceed 34.39%. These results confirm the potential of wild pomegranate as a natural source of antioxidant compounds, promising for pharmacological and nutritional applications.

Keywords: *Punica protopunica* Balf., morphological examination, phytochemical screening, physico-chemical parameters, biochemical assays, antioxidant activity.

ملخص

تساهم الدراسة الحالية في تثمين شجرة الرمان البرية (*Punica protopunica* Balf). هذا النبات، الذي ينتمي إلى عائلة *Lythraceae*، له تاريخ عرقي طبي غني وهو خزان كيميائي نباتي لا يقدر بثمن. الهدف من هذا العمل هو دراسة بعض الخصائص المورفو-مجهرية، الفيزيائية والكيميائية لأوراق وثمار هذا النوع، مع استكمالها بإجراء بعض التحاليل البيوكيميائية والنشاط المضاد للأكسدة من خلال طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH.

أتاح الفحص المورفولوجي، المستند إلى تحليل مظهر ولون وشكل وحجم الأوراق، إضافة إلى قشور وحببيات الثمار، تحديد بعض المعلومات المورفومترية المميزة لهذا النبات. بالإضافة إلى ذلك كشف الفحص المجهرى عن العديد من العناصر المتعلقة بالتنظيم النسيجي التشريحي للسيقان الخشبية وشبه الخشبية، وكذلك أوراق *Punica protopunica* Balf.

كشفت التقييم الفيزيائي والكيميائي عن نسبة عالية من الماء، متمثلة في 77.81% للحيبيات و68% للأوراق. كان الرقم الهيدروجيني المقاس حمضياً: 2.95 للعصير، و3.64 لقشر الثمار و5.00 للأوراق. تم تقييم نسبة الرطوبة ب 7.22% للأوراق و8.07% للعصير، فيما يتعلق بالمواد القابلة للاستخلاص، فقد بلغت نسب المواد الذائبة في الماء والإيثانول 20% لكل منهما في الأوراق، في حين وصلت إلى 20% و30% على التوالي في القشور. بالمقابل، أظهر العصير أقل نسب استخلاص، حيث بلغت 6.83% في الماء و1.85% فقط في الإيثانول.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات التي أجريت على الأوراق والمشروب عن وجود الجلوكوزيدات والبروتينات والدهون والصابونين والتربينويدات والكومارين والعفص والفلافونويد والسابونوسيدات. ومع ذلك، تم اكتشاف المركبات المختزلة فقط في الأوراق، بينما لا يمكن اكتشاف أنثراكينون الحر إلا في القشر. تم العثور على جميع المركبات المذكورة أعلاه في عصير الفاكهة، باستثناء النشاء والصابونين. تم استكمال هذه الدراسة بتحليل كمي يعتمد على تحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويد والفلافونول وأصباغ التمثيل الضوئي.

أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة، التي تم تقييمها بواسطة اختبار تثبيط الجذور الحرة DPPH، قوة اختزال كبيرة، سواء في مستخلص (49.10%) من القشر، أو العصير (85.93%)، من ناحية أخرى، لم تتجاوز الأوراق 34.39%. تؤكد هذه النتائج إمكانات الرمان البري كمصدر طبيعي للمركبات المضادة للأكسدة، وهي واعدة للتطبيقات الدوائية والغذائية.

الكلمات المفتاحية: *Punica protopunica* Balf ، الفحص المورفولوجي، الفحص الكيميائي النباتي، التقييم الفيزيائي والكيميائي، التحاليل البيوكيميائية، النشاط المضاد للأكسدة.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DE FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1. Généralités sur la famille des Lythracées.....,	3
I.2. Généralités sur le genre <i>Punica</i>	3
I.3. Grenadier sauvage (<i>Punica protopunica</i>).	4
I.3.1. Étymologie et nom vernaculaire	4
I.3.2. Classification botanique	4
I.3.3. Description botanique	5
I.3.4. Ecologie et aire de répartition... ..	7
I.3.5. Domaines d'utilisation de l'espace <i>Punica protopunica</i>	7
I.3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle	7
I.3.5.2. Utilisation pharmacologique et activités biologiques	8
I.3.5.3. Ressource génétique pour l'amélioration variétale	8
I.3.6. Composition biochimique	8
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Matériel	9
II.1.1. Matériel biologique	9
II.1.1.1. Collecte et identification du matériel végétal	9
II.1.1.2. Séchage et conservation du matériel végétal	10
II.1.2. Matériel non biologique	11
II.2. Méthodes.....	11

II.2.1. Etude morpho-anatomique	13
II.2.2. Etude histo-anatomique.....	13
II.2.2.1. Préparation des échantillons	13
II.2.2.2. Réalisation des coupes histologiques	13
II.2.2.3. Coloration des coupes histologiques	14
II.2.3. Etude de quelques paramètres physico-chimiques	16
II.2.3.1. Détermination du teneur en eau.....	16
II.2.3.2. Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale.....	16
II.2.3.3. Détermination de la teneur des substances extractibles	17
II.2.3.3.1. Substances extractibles par l'eau... ..	17
II.2.3.3.2. Substances extractibles par l'éthanol 80%.....	17
II.2.3.4. Détermination du potentiel hydrogène (pH)... ..	18
II.2.4. Etude de quelques paramètres phytochimiques (Screening phytochimique)	18
II.2.4.1. Recherche de l'amidon	18
II.2.4.2. Recherche des sucres réducteurs	18
II.2.4.3. Recherche des glucosides	19
II.2.4.4. Recherche de protéines	19
II.2.4.5. Recherche des lipides	19
II.2.4.6. Recherche des alcaloïdes	19
II.2.4.7. Recherche des saponines	19
II.2.4.8. Recherche des saponosides	19
II.2.4.9. Recherche des mucilages	19
II.2.4.10. Mise en évidence anthraquinones libres	19
II.2.4.11. Recherche des terpénoïdes	20
II.2.4.12. Recherche des stéroïdes	20
II.2.4.13. Recherche des substances polyphénoliques	20
a) Les coumarines	20
b) Les tanins	20
c) Les flavonoïdes	20
d) Les anthocyanes	20

e) Les leuco-anthocyanes (pro-anthocyanidols)	21
II.2.5. Etude de quelques paramètres biochimiques	21
II.2.5.1. Extraction par macération dans l'éthanol.....	21
II.2.5.2. Préparation des extraits éthanoliques (solutions mères)	21
II.2.5.3. Dosage spectrophotométrique	21
II.2.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	22
II.2.5.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	22
II.2.5.3.3. Dosage des flavonols	22
II.2.5.3.4. Dosage des pigments photosynthétiques.....	23
II.2.6. Etude de l'activité antioxydante.....	24
II.2.6.1. Préparation de la solution de DPPH	24
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Résultats de l'étude morpho-anatomique	27
III.1.1. Résultats de l'étude morphologique	27
III.1.1.1. Examen macroscopique des feuilles	27
III.1.1.2. Examen macroscopique des fruits et des arilles	28
III.1.2. Résultats de l'étude histo-anatomique	31
III.1.2.1. Observation histo-anatomique des tiges ligneuses et tiges semi- ligneuses	31
III.1.2.1.1. Observation des tiges ligneuse.....	31
III.1.2.1.2. Observation de tiges semi-ligneuses.....	32
III.1.2.2. Observation histo-anatomique des feuilles	33
III.1.2.2.1. Observation des épidermes foliaires	33
III.1.2.2.2. Observation des feuilles en coupe transversale	34
III.2. Résultats de l'étude physico-chimique	36
a) Teneur en eau.....	36
b) Taux d'humidité.....	36
c) Potentiel hydrogène pH.....	36
d) Le teneur des substances extractibles	37
III.3. Résultats de l'étude phytochimique	37
a) L'amidon... ..	38

b) Les sucres réducteurs.....	39
c) Les glucosides	39
d) Les protéines	39
e) Les lipides.....	40
f) Les alcaloïdes.....	40
g) Les saponines	40
h) Les saponosides.....	41
i) Les mucilages.....	41
j) Les anthraquinones.....	41
k) Les terpénoïdes.....	41
l) Les stéroïdes.....	42
m) Les flavonoïdes, les coumarines et les Tanins (galliques et catéchiques)	42
n) Les anthocyanes	43
o) Les leuco- anthocyanes	43
III.4. Résultats de l'étude biochimique.....	43
III.4.1. Dosage des polyphénols totaux... ..	43
III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux... ..	44
III.4.3. Dosage des flavonols	45
III.4.4. Dosage des pigments photosynthétiques	46
III.5. Résultats de l'activité antioxydante	47
Conclusion	51

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect des organes aériens du Grenadier sauvage (<i>Punica protopunica</i> Balf.)	6
Figure 2 : Distribution géographique de l'espèce <i>Punica protopunica</i> et <i>punica granatum</i> dans le monde	7
Figure 3 : Aspect des feuilles et des fruits collectés du grenadier sauvage (<i>Punica protopunica</i> Balf.).....	9
Figure 4 : Aspect des feuilles et des fruits du Grenadier sauvage (<i>Punica protopunica</i> Balf.).....	10
Figure 5 : Schéma récapitulatif des paramètres étudiés.....	12
Figure 6 : Schémas représentatif des étapes de la technique de double coloration	15
Figure 7 : Aspect macroscopique de la feuille de <i>Punica protopunica</i> Balf	27
Figure 8 : Aspect des fruits et des arilles de l'espèce étudiée (<i>P. protopunica</i>)	29
Figure 9 : Anatomie d'une tige semi-ligneuse de <i>P. protopunica</i> Balf. En coupe transversale au microscope photonique (G : x10)	31
Figure 10 : Aspect des lenticelles à la périphérie d'une tige semi ligneuse de l'espèce <i>Punica protopunica</i> Balf. (G :x40).....	32
Figure 11 : Aspect de l'épiderme supérieur (A) et de l'épiderme inférieure (B) de la feuille de l'espèce <i>P. protopunica</i> en vue de face au microscope optique	33
Figure 12 : Anatomie des feuilles de <i>Punica protopunica</i> Balf. En coupe transversale (G :x40)	35
Figure 13 : Teneurs en polyphénols des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de <i>P. protopunica</i>	44
Figure 14 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de <i>P. protopunica</i>	45
Figure 15 : Teneurs en flavonols des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de <i>P. protopunica</i>	46
Figure 16 : Teneurs en chlorophylle a et b des extraits des feuilles <i>P. protopunica</i>	47
Figure 17 : les variations de la DO en fonction des concentrations.....	47
Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH exprimés par les extraits testés.....	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales espèces du genre <i>Punica</i>	4
Tableau II : Noms vernaculaires attribués au Grenadier sauvage.....	4
Tableau III : Nature, date et quantité des échantillons collectés.....	9
Tableau IV : Différentes solutions et dilutions préparées pour la mesure de l'activité antioxydante.....	25
Tableau V : Caractères morphologiques des feuilles de <i>Punica protopunica</i> en comparaison avec ceux de l'espèce <i>Punica granatum</i>	28
Tableau VI : Caractères morphologiques des fruits et des arilles de <i>P. protopunica</i>	28
Tableau VII : Caractères morphologiques des fruits et des arilles de <i>P. granatum</i>	30
Tableau VIII : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles et des fruits de <i>P. protopunica</i>	36
Tableau IX : Résultats du screening phytochimique des feuilles et des fruits de <i>Punica protopunica</i>	38
Tableau X : Les répétitions des dosages biochimiques.....	Annexe E
Tableau XI : Les dilutions de l'activité antioxydante.....	Annexe E

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide ascorbique

Abs : Absorbance

Ac gal : Acide gallique

APG : Angiosperm Phylogeny Group (Classification phylogénique des angiospermes)

E : Epicarpe

Eq : Equivalent

ES : Extrait sec

F : Feuille

G : Grossissement

J : Jus

L : Linné

P : *Punica*

pH : Potentiel hydrogène

Que : Quercétine

Rut : Rutine

V : Volume

EEF : Extrait éthanolique des feuilles

EEE : Extrait éthanolique des épicarpes

EEJA : Extrait éthanolique des jus des arilles

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

Introduction

Introduction

L'Algérie, avec ses paysages variés allant des zones côtières méditerranéennes aux étendues sahariennes, dispose d'une biodiversité végétale remarquable mais encore largement sous-exploitée et insuffisamment documentée. De nombreuses espèces végétales sauvages, rares ou méconnues, y prospèrent naturellement ; elles pourraient receler des propriétés médicinales, nutritionnelles et écologiques précieuses. Cependant, ce patrimoine unique est aujourd'hui menacé par la pression de l'urbanisation, la dégradation des habitats, le surpâturage, la surexploitation des ressources naturelles et les effets du changement climatique (**Touati, 2021**).

Les plantes spontanées, souvent appelées plantes sauvages, jouent un rôle écologique fondamental dans le maintien de la biodiversité, la stabilisation des sols et la résilience des écosystèmes. Elles s'adaptent naturellement à leur environnement sans intervention humaine, ce qui leur confère une grande valeur en termes de conservation génétique et de ressources phytogénétiques. Selon **Hodel et al. (2021)**, ces espèces contribuent aussi à la sécurité alimentaire locale en servant de sources alternatives de nourriture, de médicaments ou de fourrage. Par ailleurs, leur présence favorise les interactions écologiques avec la faune locale, notamment les pollinisateurs (**Milla et al., 2021**).

Dans ce contexte, le grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.), originaire de l'archipel de Socotra, est un arbuste caduc considéré comme l'ancêtre sauvage du grenadier commun (*P. granatum*). Cette plante se distingue par ses caractéristiques morphologiques et biochimiques uniques, mais reste encore très peu explorée sur le plan scientifique et agronomique (**Guerrero-Solano et al., 2020**). L'intérêt qu'elle suscite ne cesse de croître, notamment en raison de son potentiel d'exploitation en médecine traditionnelle, en cosmétologie, ainsi que dans le développement de compléments alimentaires riches en composés bioactifs.

L'objectif de ce travail consiste à apporter une contribution à la valorisation des feuilles et des fruits du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.) en effectuant une caractérisation morpho-anatomique, physico-chimique, phytochimique et biochimique. Cette étude s'intègre dans un projet de recherche qui vise à valoriser les arbres à fruits non conventionnels, afin de promouvoir le secteur économique via leur intégration en industrie en tant que matière première, ce qui permet d'ouvrir les portes pour une éventuelle contribution au développement durable de notre pays.

Notre travail est reparti en trois chapitres :

✓ Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique sur l'espèce étudiée (*Punica protopunica* Balf.), incluant sa description botanique, sa systématique, sa composition chimique ainsi que ses différentes utilisations.

Introduction

✓ Le deuxième chapitre expose le matériel et les méthodes analytiques utilisées dans le travail expérimental, il est focalisé sur les quatre volets suivants :

- Etude morphologique des feuilles et des fruits
- Etude histo-anatomique des feuilles ainsi que des tiges semi-ligneuses et ligneuses.
- Caractérisation de quelques paramètres physico-chimiques et phyto-chimiques des fruits et des feuilles.
- Préparation de trois extraits éthanoliques par macération (feuilles, épicarpes et jus), destinés à l'analyse de quelques paramètres biochimiques à partir de ces extraits.
- Etude de l'activité antioxydante des extraits obtenus

✓ Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion de l'ensemble des résultats obtenus en les comparant avec des travaux antérieurs.

Ce travail est clôturé par une conclusion générale à laquelle s'ajoute quelques perspectives.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1.1. Généralités sur la famille des *Lythraceae* :

La famille des *Lythraceae*, anciennement connue sous le nom de *Punicaceae* comprend entre 620 et 650 espèces réparties en 30 à 32 genres (Stevens, 2001; Tushar Dukre et al., 2022). Ces plantes sont majoritairement originaires des régions tropicales et subtropicales et présentent une grande diversité morphologique incluant: des herbacées, des arbustes, des arbres ainsi que quelques plantes semi-aquatiques.

Leurs caractéristiques botaniques communes incluent des feuilles simples, souvent opposées, des fleurs bisexuées à symétrie radiale, un calice persistant, des pétales alternés et un ovaire généralement supère, parfois infère, avec des fruits en forme de capsules souvent ailées (Spichiger et al., 2004).

Judd et al. (2008) et (Spichiger et al., 2004) ont rapporté que les plus grands genres appartenant à cette famille sont : *Cuphea* (275 espèces), *Lagerstroemia* (56 espèces), *Nesaea* (50 espèces), *Rotala* (45 espèces) et *Lythrum* (35 espèces) auxquels s'ajoute le genre *Punica* (2 espèces).

1.2. Généralités sur le genre *Punica* :

Selon Guerrero-Solano et al. (2020), le genre *Punica* appartenant à la famille des *Lythraceae*, regroupe des arbustes ou petits arbres connus principalement pour leurs fruits que l'on appelle: les grenades, derivant du mot latin *granatum* qui signifie «granuleux », en référence aux nombreuses graines du fruit.

Ces mêmes auteurs ont rapporté que les deux principales espèces qui composent ce genre sont:

- *Punica granatum* L., largement cultivée pour ses fruits comestibles, originaire d'une région s'étendant de l'Iran au nord de l'Inde, ce qui en fait le centre d'origine de la grenade. Cette espèce s'est ensuite répandue autour de la Méditerranée, en Asie de l'Est, en Amérique et en Afrique du Sud, contribuant ainsi à la diversité génétique du pomegranate.

- *Punica protopunica* Balf., une espèce plus ancienne et méconnue, décrite pour la première fois en 1880 par le botaniste écossais Isaac Bayley Balfour, est endémique de l'archipel de Socotra, situé entre la mer d'Arabie et le canal de Guardafui, au large de la Corne de l'Afrique.

La taille et l'aspect de chacune de ces deux espèces sont récapitulés dans le **tableau I**.

Tableau I : Principales espèces du genre *Punica*

Espèces	Taille et aspect	Références
Grenadier commun (<i>Punica granatum</i> L.)	Arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur	(Wald, 2009)
Grenadier sauvage ou Grenadier de Socotra (<i>Punica Protopunica</i> Balf.)	Grand arbuste de 7,13 m de hauteur moyenne.	(Rawat et al., 2012)

I.3. Le Grenadier sauvage (*Punica Protopunica* L.) :

I.3.1. Etymologie et nom vernaculaire :

Le nom *Punica* est dérivé du latin "*Punicus*", qui signifie "**Carthaginois dont l'origine est phénicienne**". Les Romains ont ainsi nommé le grenadier en référence à **Carthage**, d'où la plante leur aurait été rapportée. Le fruit était appelé *Malum punicum* "pomme carthaginoise", soulignant son origine géographique supposée en Afrique du Nord (Morton; 1987).

L'épithète spécifique *protopunica* vient de la racine grecque "*Proto*" (πρῶτος), signifiant "**premier**" ou "**ancestral**", et de *Punica*, reprenant le nom du genre. Le nom complet *Punica protopunica* peut donc être traduit littéralement par "**Punica primitive**" ou "premier grenadier", ce qui indique son statut d'**espèce ancestrale de *P. granatum*** : la grenade commune (Levin, 2006).

Cette espèce a été décrite scientifiquement pour la première fois au XIX^e siècle sur l'île de **Socotra** du Yémen, une région connue pour son isolement biogéographique et sa flore unique (Daniell et al., 2001).

Cette espèce est connue par différents noms vernaculaires, ces derniers sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Noms vernaculaires attribués au Grenadier sauvage (Rawat et al., 2012)

Langue	Noms vernaculaires
Arabe	Romane Barri (الرمان البري)
Français	Grenadier sauvage, Grenadier de Socotra
Anglais	Wild pomegranate, Socotra pomegranate, Pomegranate tree

I.3.2. Classification botanique :

Selon Wald (2009), le genre *Punica* a été décrit et classé pour la première fois par Linné en 1753. La classification adoptée par cet auteur est la suivante :

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica protopunica</i> Balf.

Dans la version révisée de l'APG IV (2016), la systématique du grenadier sauvage a été déplacée vers la famille des Lythraceae, selon l'hierarchie phylogénétique suivante:

Règne	Plantae
Clade	Tracheophytes
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Ordre	Myrtales
Familles	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica protopunica</i> Balf.

I.3.3. Description botanique :

D'après Guerrero-Solano et al. (2020), *Punica protopunica* est un arbuste ou petit arbre qui présente une largeur supérieure à sa hauteur selon les conditions écologiques (figure 1a). Il adopte un port dressé ou étalé, notamment sur les pentes rocheuses ou les plateaux calcaires. Ce végétal pousse spontanément à des altitudes comprises entre 1 000 et 1 500 m (Rawat et al., 2012).

En se référant à la description botanique établis par Guerrero-Solano et al. (2020) ainsi que celle de Rawat et al., (2012), l'espèce *Punica protopunica* présente les caractères suivants :

- Une écorce brun rougeâtre lorsque l'arbre est jeune, mais prend une teinte grisâtre en vieillissant. Les branches sont épineuses (Figure 1 a)
- Les feuilles sont persistantes et atteignent 3 cm de long, elles sont organisées en paires de part et d'autre de la tige. La forme la plus fréquente est elliptique ou oblongue, bien qu'on trouve aussi des feuilles de forme ronde, ovale et obovale (une seule branche peut présenter toutes ces formes). Elle arbore une teinte verte foncé et vive. (Figure 1 b)
- Les fleurs possèdent des pétales qui sont obovales ou ovales, et parfois en forme de cœur. Elles sont de couleur rose clair pailleté et ont une forme en trompette. La période de floraison s'étend de décembre jusqu'à l'été de l'année suivante. (Figure 1 c)
- La forme des fruits est subglobuleuse. Ils conservent leur calice floral. Leur peau est dure à maturité et leur couleur varie du vert clair au jaune verdâtre, avec ou sans reflets

roses. À l'intérieur, ils présentent un péricarpe spongieux muni de membranes (endocarpe) qui séparent les arilles en compartiments. Chaque arille contient une membrane, de la pulpe, du jus et une graine. (Figure 1 e,d)

- Les graines sont à l'intérieur des arilles et il y en a des centaines, elles sont relativement légères. Elles sont de forme obconique et de couleur blanche.

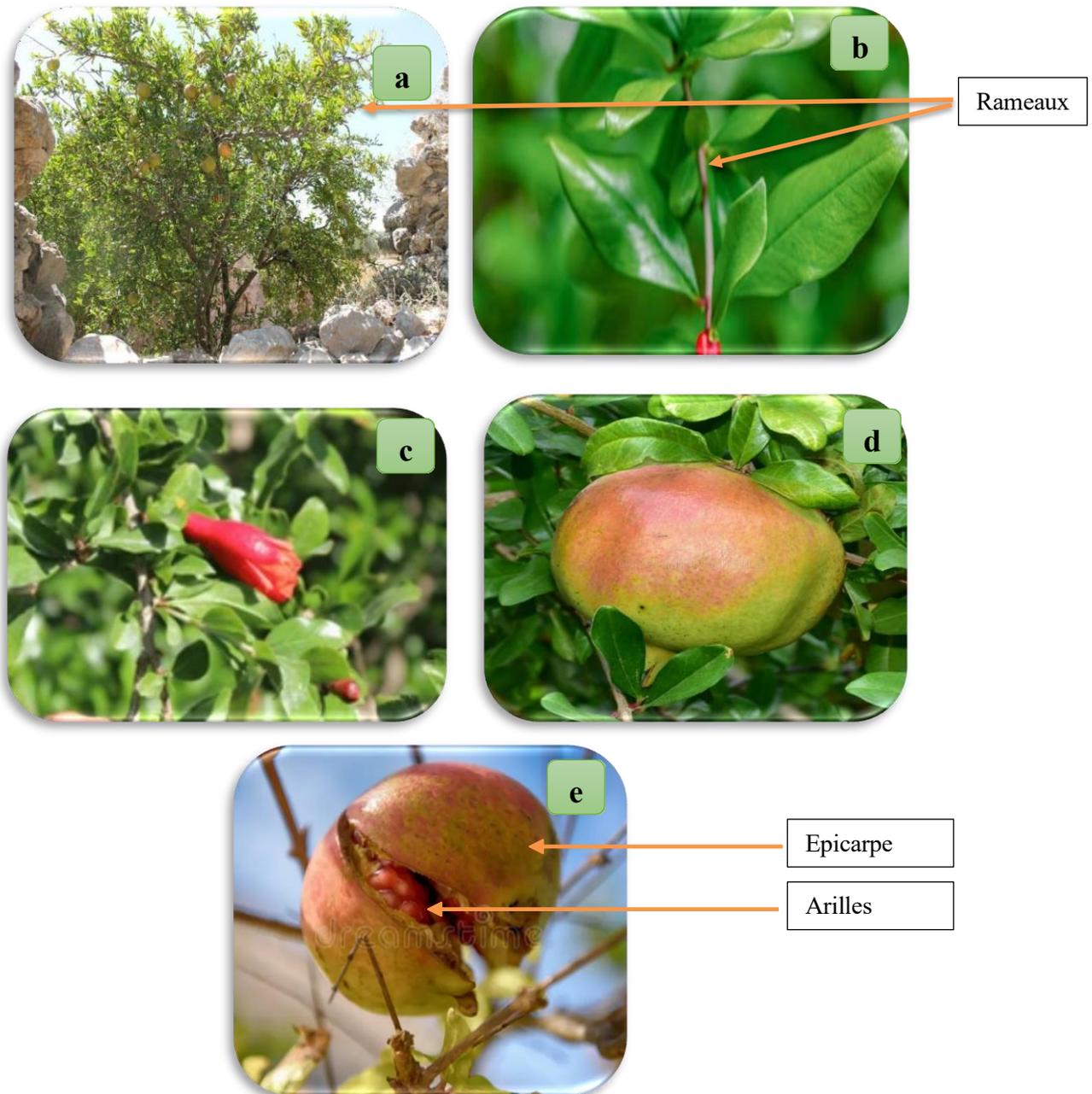


Figure 1 : Aspect des organes aériens du Grenadier sauvage (*Punica protopunica* L.)

Figure (a, d, e) <https://www.dreamstime.com/photos-images/punica-protopunica.html>
(Consulté le 18/04/2025 à 14 :30)

Figure (b, c) https://www.shutterstock.com/fr/search/feuilles-de-punica-protopunica?image_type=photo
(Consulté le 26/04/2025 à 13 :02)

I.3.4. Ecologie et aire de répartition :

Guerrero-Solano et al. (2020) ainsi que **Dossin (2019)** ont rapporté que les espèces du genre *Punica* présentent des exigences écologiques similaires, notamment une bonne adaptation aux climats arides et semi-arides, caractérisés par des précipitations modérées à faibles. Ces espèces privilégient des sols bien drainés et tolèrent une sécheresse prolongée, tout en nécessitant un minimum d'humidité pour un développement optimal. Elles peuvent également pousser dans les régions méditerranéennes, au moyen-orient ainsi que les zones centro-asiatiques et subtropicales (**Rawat et al., 2012**). Toutefois, cette occurrence est marginale : *P. protopunica* n'est pas cultivé et, lorsqu'il est présent, il pousse de manière spontanée et sauvage dans des écosystèmes naturels reculés, où il reste extrêmement rare et souvent méconnu par les populations locales (**figure 2**).

Selon **Rawat et al (2012)** le grenadier sauvage se trouve de préférence à une altitude comprise entre 1 000 et 1 500 m au-dessus du niveau de la mer.



Figure 2 : Distribution géographique de l'espèce *Punica protopunica* dans le monde.

I.3.5. Domaines d'utilisation de l'espèce *Punica protopunica* :

I.3.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle :

L'espèce *Punica protopunica* est largement utilisée par les populations locales de l'île de Socotra dans le domaine de la médecine traditionnelle. Cette plante occupe une place importante dans la pharmacopée locale grâce à ses multiples propriétés thérapeutiques. Les différentes parties de la plante, telles que l'écorce du fruit, les graines et les fleurs, sont préparées sous forme de décoction, d'infusion ou de macération. Ces préparations sont utilisées pour traiter une variété de maux tels que les ulcères gastriques, la diarrhée, la dysenterie, les infections urinaires, la toux sèche, les troubles digestifs, les affections cutanées, les maux de

gorge, la jaunisse, ainsi que pour leurs propriétés antidiabétiques et vermifuges (**Guerrero-Solano et al., 2020**).

I.3.5.2. Utilisation pharmacologique et activités biologiques :

Selon **Guerrero-Solano et al. (2020)**, au-delà de son usage traditionnel, *Punica protopunica* a fait l'objet de recherches scientifiques qui ont mis en évidence son potentiel pharmacologique. Des études *in vitro* ont démontré son activité antioxydante élevée, attribuée à sa richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Cette activité antioxydante permet de neutraliser les radicaux libres, responsables du vieillissement cellulaire et de nombreuses pathologies.

Par ailleurs, la plante présente une activité anti-microbienne significative, notamment contre des bactéries Gram-positives, y compris des souches multirésistantes comme *Staphylococcus aureus*. Elle possède également des propriétés anti-virales, bien que modérées, contre le virus de la grippe (influenza) et le virus de l'Herpès simplex (HSV-1). En plus de ces propriétés, *Punica protopunica* a montré une activité anti-parasitaire notable, en particulier contre le *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme, ainsi que contre *Leishmania infantum* et *Trypanosoma cruzi*, agents responsables de la leishmaniose et de la trypanosomiase. Enfin, des essais de cytotoxicité ont révélé un effet anti-cancéreux modéré contre plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines.

I.3.5.3. Ressource génétique pour l'amélioration variétale

Grâce à la morphologie, l'indice de similarité génétique entre *Punica protoponica* et *Punica granatum* est de 53,84 %. Des études morphologiques et chimiques ont confirmé leur relation génétique et l'hypothèse selon laquelle *Punica protoponica* est la forme sauvage originale de *Punica granatum*. Par conséquent, l'espèce *P. protopunica* est une ressource précieuse pour les programmes de croisement ou d'amélioration génétique. Ses caractéristiques uniques, comme sa floraison continue, sa résistance naturelle aux maladies et son adaptation au stress environnemental, pourraient être exploitées pour développer de nouvelles variétés de grenadiers plus robustes ou mieux adaptées aux changements climatiques (**Guerrero-Solano et al., 2020**).

I.3.6. Composition chimique

En raison de la similarité génétique entre l'espèce *P. Protopunica* et l'espèce *P. granatum*, il est supposé qu'elles possèdent une composition chimique similaire (**Nawaz et al., 2022; Shahsavari, 2021; Youssef et al., 2018**). Bien que les concentrations de certains composés, notamment les anthocyanes et les punicalagines, soient probablement variables. **Singh et Sharma (2023)** ont souligné que les métabolites primaires tels que les glucides, les acides aminés, les acides organiques et les minéraux sont essentiels à la croissance et au développement des plantes, tandis que les métabolites secondaires, incluant les tanins, les flavonoïdes et les acides phénoliques, jouent un rôle crucial dans la défense des plantes et leur adaptation à l'environnement.

Chapitre II :

Matériel

et

Méthodes

Durant la période allant du 02 Mars à la fin du mois d'avril, nous avons effectué un stage pratique au sein du laboratoire de PFE de la faculté SNV, situé au niveau de l'institut des sciences vétérinaires de l'université Blida-1.

Notre travail expérimental au sein de ce laboratoire a été effectué en quatre étapes comme suit :

- Première étape : Etude morphologique des feuilles et des fruits du Grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.), complétée par une étude histo-anatomique effectuée sur les tiges semi ligneuses, ainsi que sur les feuilles.
- Deuxième étape : Analyse de certains paramètres physico-chimiques et phytochimiques des feuilles des fruits (épicarpe et jus des arilles)
- Troisième étape : Élaboration d'extraits éthanoliques par macération à froid dans l'éthanol et étude de certains paramètres biochimiques issus de ces extraits.
- Quatrième étape : Etude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles et de fruits (épicarpe et jus des arilles).

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

II.1.1.1. Collecte et identification du matériel végétale :

La collecte des feuilles et des fruits a été effectuée dans la région de Mouzaïa-Wilaya de Blida.

Nous avons collecté une quantité suffisante de ce matériel végétal pour effectuer les manipulations (figure 3a et figure 3b). Ces dernières sont présentées dans le **tableau III**.

Tableau III : Nature, date et quantité des échantillons collectés

Organes récoltés	Date de récolte	Quantité récoltée
Fruits	Novembre 2024 (pour la caractérisation)	2 kg
Feuilles	Novembre 2024 (pour la caractérisation) Avril 2025 (pour l'étude microscopique)	70g

L'identification de cette espèce a été réalisée par **Dr METTAI. M** au niveau du département de pharmacie de l'université blida -1- selon logiciel Identiplant (version PRO)



Figure 3 : Aspect des feuilles et des fruits collectés du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.)

II.1.1.2. Séchage et conservation du matériel végétal :

Après la récolte, les fruits (baies) ont d'abord été soigneusement nettoyés à sec puis décortiqués :

- Les épicarpes des fruits ont été triées et séchées à l'abri du soleil dans un lieu sec et aéré pendant 20 jours, puis broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. Ensuite, nous les tamisons pour obtenir une poudre très fine. A la fin, nous les stockons dans des récipients en verre stériles et scellés à l'abri du soleil et à température ambiante. **(Figures 4a et 4c).**
- Les arilles (graines entourées par une masse de pulpe juteuse) récupérées après décortication des baies ont été conservées au congélateur (+4°C). **(Figure 4e).** Leur broyage électrique et filtration pour récupérer le jus est effectué juste avant leur utilisation, en fonction du besoin de chaque manipulation.

Les feuilles ont été soigneusement nettoyées à sec, triées et mises à sécher à l'abri du soleil, dans un lieu sec et aéré pendant 10 jours. Par la suite, elles ont été réduites en une poudre fine au broyeur électrique. Ensuite, nous les tamisons pour obtenir une poudre très fine **(Figure 4b et 4d).**

Les poudres végétales ainsi obtenues (provenant des feuilles et de l'épicarpe) ont été passées au tamis, stockées dans des pots en verre bien fermés et conservées à température ambiante jusqu'à leur emploi.



Figure 4 : Aspect des feuilles et des fruits du Grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.)
a, b : Après séchage **c, d :** Après broyage **e :** Arilles

II.1.2. Matériel non biologique :

La verrerie, les équipements ainsi que les produits chimiques et les réactifs utilisés pour mener à bien le travail expérimental sont tous listés en Annexe A.

II.2. Méthodes :

Un résumé de tous les essais effectués sur les feuilles et les fruits de l'espèce *Punica protopunica* est présenté dans la figure 5.

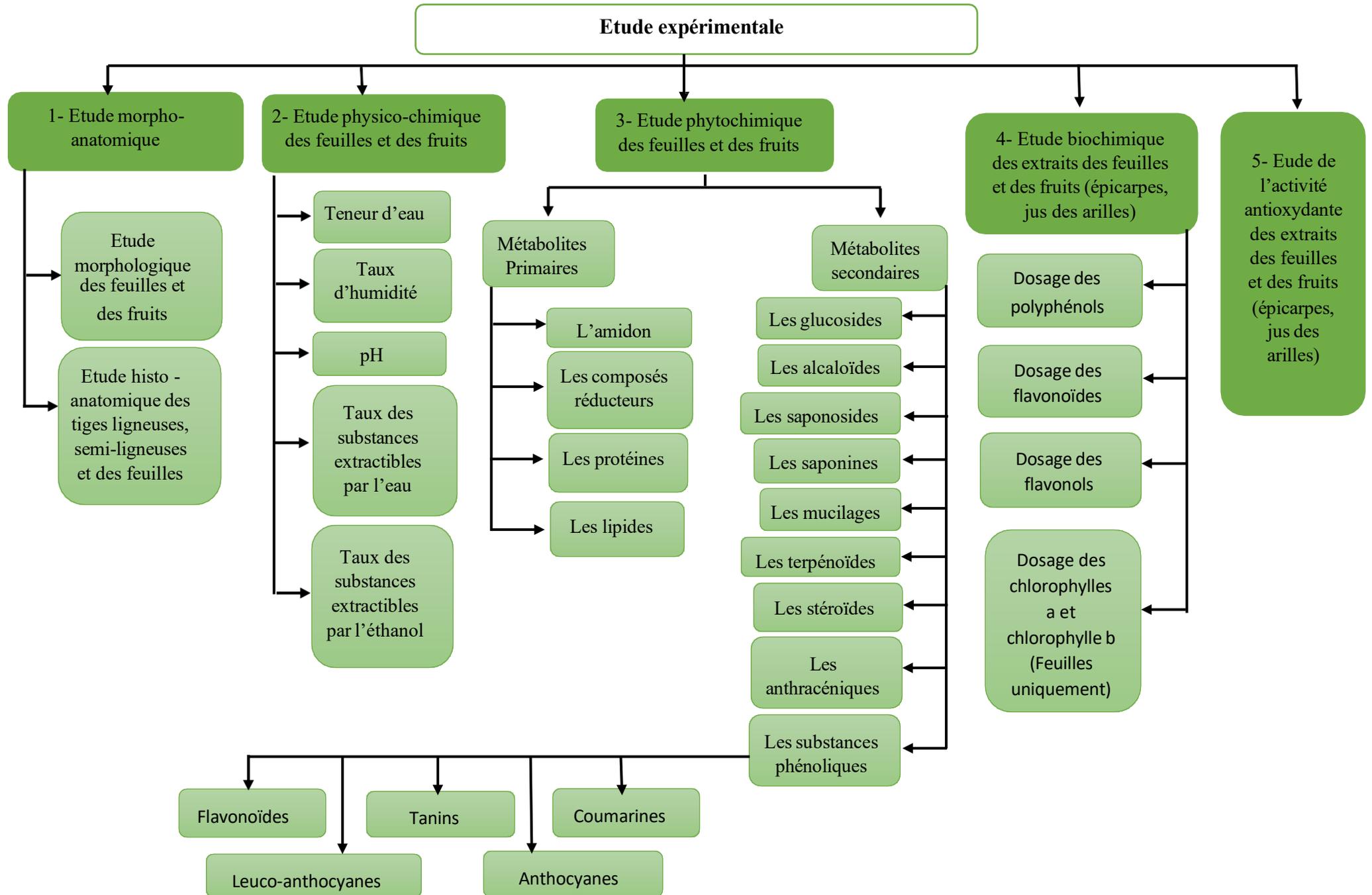


Figure 5 : Schéma récapitulatif de tous les paramètres étudiés.

II.2.1. Etude morpho-anatomique

L'étude morphologique a été effectuée dans l'objectif d'examiner, de définir et de saisir les caractéristiques phénotypiques des feuilles et des fruits de l'espèce *Punica protopunica* Balf. Ainsi que pour lister toutes les propriétés morphologiques relatives à ces deux organes de la plante. Cette dernière a été complétée par étude histo-anatomique qui vise à déterminer les structures tissulaires et leur disposition au niveau des tiges et des feuilles de cette espèce.

II.2.1.1. Etude morphologique :

L'analyse morphologique repose sur des observations à l'œil nu, puis à l'aide d'une loupe binoculaire, pour identifier les caractéristiques morphologiques de la plante. Pour cela, nous avons réalisé :

- Un examen macroscopique à partir d'un échantillon constitué de plusieurs feuilles, afin de décrire les caractéristiques foliaires de l'espèce (type de nervation, taille et aspect des feuilles, phyllotaxie).
- Un examen macroscopique à partir d'un échantillon constitué de plusieurs baies, au cours de laquelle nous avons pris en compte :
 - La forme, la taille, le type et la couleur du fruit.
 - La forme, la taille, le type et la couleur des arilles.
 - L'aspect et la couleur des épicarpes

II.2.1.2. Etude histo-anatomique :

Une étude microscopique a été réalisée au niveau des feuilles et tiges de *Punica protopunica* Balf., dans le but de décrire les caractéristiques histo-anatomiques de ces organes.

II.2.1.2.1. Préparation des échantillons :

Les rameaux ligneux et semi-ligneux ainsi que les feuilles du grenadier sauvage fraîchement récoltés ont été soigneusement nettoyés à l'eau courante et égouttés.

II.2.1.2.2. Réalisation des coupes histologiques :

Une exécution manuelle précise des coupes permet une visualisation claire des diverses structures cellulaires analysées au microscope optique.

Des sections transversales ont été effectuées avec une lame de rasoir neuve au niveau des tiges et des feuilles de *Punica protopunica* Balf.

Ces coupes doivent être aussi fines que possible et sont immédiatement recueillies dans l'eau pour éviter leur dessèchement.

II.2.1.2.3. Coloration des coupes histologiques : (Technique de double coloration)

Nous avons utilisé la technique classique de double coloration décrite par **Longeron (1949)**. Les sections préparées sont colorées pour faciliter l'identification des structures tissulaires. Cette méthode repose sur la coloration distincte des parois cellulaires grâce au rouge Congo et au vert de méthyle (**figure 6**).

✓ **Remarque :**

Les protocoles de la préparation deux colorants utilisés (vert de méthyle et rouge Congo) pour la coloration des coupes histologiques, sont détaillés en annexe B.

• **Mode opératoire :**

Les coupes ont été traitées par des trempages dans plusieurs bains selon les étapes suivantes :

- Trempage des coupes dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel 12°Chl), pendant 20 minutes pour éliminer leur contenu cellulaire et garder uniquement les parois squelettiques, puis elles sont rincées à l'eau du robinet pendant 5 minutes.
- Transfert de ces coupes dans une solution d'acide acétique pendant une minute, afin de neutraliser le PH induit par l'hypochlorite de sodium, puis elles sont lavées à l'eau du robinet durant cinq minutes.
- Traitement de ces coupes avec le vert de méthyle pendant 5 min pour colorer les parois lignifiées, suivi d'un rinçage à l'eau courante pendant cinq minutes.
- Traitement de ces coupes au rouge Congo pendant trois minutes, suivi d'un dernier rinçage à l'eau courante pendant cinq minutes.

Suite aux colorations, les coupes ont été immergées dans de l'eau afin d'éviter leur déshydratation. Parmi elles, certaines (celles présentant la meilleure coloration et les plus fines coupes) ont été choisies et positionnées entre une lame et une lamelle avant de passer à l'observation au microscope optique.

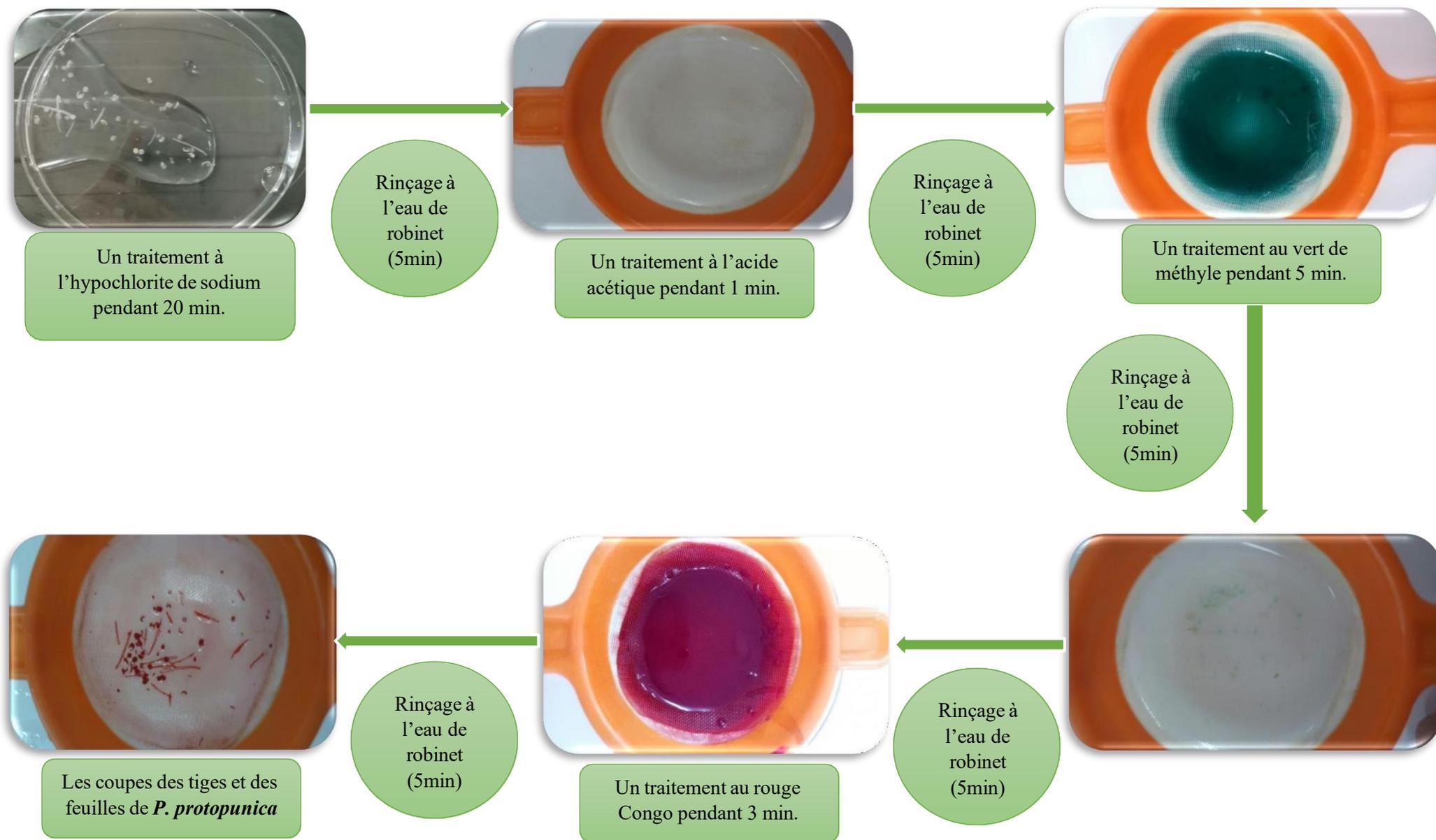


Figure 6 : Schémas représentatif des étapes de la technique de double coloration.

II.2.3. Etude de quelques paramètres physico-chimiques :

II.2.3.1. Détermination du teneur en eau :

La détermination de ce paramètre physico-chimique dans les arilles et les feuilles est effectué conformément à la méthode décrite par **Audigié et al (1978)**.

- **Mode opératoire :**

-Sécher les capsule vides à l'étuve durant 15 min à $45 \pm 2^\circ\text{C}$.

-Vidées les capsules après refroidissement dans un dessiccateur.

-Peser 5g d'échantillon à une précision $\pm 0,001$ g dans chaque capsule, et les placer dans l'étuve réglée à $45 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures,

-Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur, et après refroidissement, les peser.

- **Calcul :**

-La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de la mesure

$$\% \text{eau} = [(M1 - M2) / P] \times 100$$

%eau : Teneur en eau.

M1 : Masse initiale en gramme (avant la dessiccation) (matière fraîche + capsule).

M2 : Masse finale en gramme (après la dessiccation) (matière sèche + capsule).

P : Masse de la prise d'essai en gramme

II.2.3.2. Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale :

Le taux d'humidité dans la poudre végétale (écorce, feuilles) est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci. Les poudres végétales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme (**Pharmacopée européenne, 2002**).

- **Mode opératoire :**

On met 1g de poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé, l'ensemble est placé dans une étuve réglée entre 65 et 70°C durant 3 heures

- **Calcul :**

Après avoir obtenu le poids de ce matériel végétal séché à l'étuve, on calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule suivante (**Pharmacopée européenne, 2005**) :

$$X\% = [(M - M') / M] \times 100$$

X% : Taux d'humidité de la poudre.

M : Masse de la prise d'essai en gramme.

M' : Masse de la prise d'essai après séchage en gramme.

II.2.3.3. Détermination de la teneur des substances extractibles dans la poudre végétale :

Les substances extractibles sont des substances organiques et inorganiques extraites à partir des matières végétales par un solvant.

II.2.3.3.1. Substances extractibles par l'eau :

On introduit dans un ballon un 1g de poudre et 20 ml d'eau distillée, qu'on porte à ébullition pendant 15 minutes. On laisse refroidir pendant 20 minutes et on filtre. Le filtrat est mis dans une boîte de pétri en verre préalablement pesé (masse m), après évaporation à sec, on pèse à nouveau la boîte de pétri avec le résidu (masse m').

- **Calcul :**

-La teneur des substances extractibles par l'eau, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante (Diarra, 2003) :

$$\text{Substances extractibles par l'eau} = [(m'-m) / Pe] \times 100$$

Pe : Masse de la prise d'essai en gramme.

m : Masse du bécher vide en gramme.

m' : Masse du bécher avec le résidu en gramme.

II.2.3.3.2. Substances extractibles par l'éthanol 80% :

On introduit dans un erlenmeyer 1g de poudre végétale et 20ml d'éthanol 80%, qu'on laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire, après l'avoir recouvert à l'aide d'un verre de montre. Ce mélange est ensuite filtré avec du papier filtre.

On pèse le bécher vide (m) avant d'y mettre le filtrat, on laisse évaporer à sec et on repèse le bécher avec le résidu (m').

- **Calcul :**

-La teneur des substances extractibles par l'éthanol, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante (Togola, 2002) :

$$\text{Substances extractibles par l'éthanol} = [(m'-m) / Pe] \times 100$$

Pe : Masse de la prise d'essai en gramme.

m : Masse du bécher vide en gramme.

m' : Masse du bécher avec résidu en gramme.

II.2.3.4. Détermination du potentiel hydrogène (pH) :

Dans une fiole de 200 ml, on disperse 4 g de poudre végétale (feuilles, épicarpes) dans de l'eau chaude. Après refroidissement, la fiole est complétée jusqu'au trait de Jauge avec de l'eau distillée. On détermine le pH de cette solution en utilisant un pH-mètre (**Dowson et Aton, 1963**).

La mesure du pH a été réalisée en plongeant l'électrode dans 20 à 30 ml de jus filtré contenu dans un bécher propre, et en notant la valeur après stabilisation de la lecture (**AOAC, 2005**).

II.2.4. Etude de quelques paramètres phytochimiques (Screening phytochimique) :

C'est un ensemble des tests qualitatifs qui permet de déterminer la présence ou l'absence de certains métabolites primaires/secondaires chez l'espèce *Punica protopunica* Balf. Ces tests sont indispensables pour orienter le choix des paramètres biochimiques à analyser.

Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration. Ces tests phytochimiques ont été effectués sur la poudre végétale et/ou l'infusé des feuilles, les épicarpes et également sur le jus des arilles de cette espèce.

✓ Remarque :

Les protocoles utilisés pour la préparation du réactif de Stiasny utilisés dans la caractérisation phytochimique sont détaillés en annexe C.

• Préparation de l'infusé :

Les poudres du matériel végétal (feuilles, épicarpes) ont été préparées séparément sous forme d'infusions, en dispersant 5g de chaque poudre végétale dans 100 ml d'eau distillée bouillante. Après 15 min, l'infusé est filtré et versé dans une fiole jaugée de 100ml, le volume est ajusté jusqu'au trait de Jauge (**Bouabid et al., 2016**).

• Préparation du jus des arilles :

La préparation du jus du grenadier sauvage a été réalisée en broyant 500 g des arilles à l'aide d'un broyeur mécanique électrique. Le broyat obtenu a été ensuite filtré à travers une passoire fine afin de séparer le jus des résidus solides (pépines des arilles).

II.2.4.1. Recherche de l'amidon :

À deux grammes de poudre végétale ou l'équivalent de 1ml du jus, on ajoute quelques gouttes d'iode. La formation d'une coloration bleu-violacée indique la présence de l'amidon (**Pharmacopée URSS, 1991**).

II.2.4.2. Recherche des sucres réducteurs :

On introduit 5 ml de l'infusé et/ou de jus dans un creuset, puis on laisse évaporer au bain Marie jusqu'au séchage. Au résidu obtenu, on ajoute 1ml de réactif de Fehling. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs (**Diallo, 2005**).

II.2.4.3. Recherche des glucosides :

A deux grammes de poudre végétale (ou l'équivalent de 1ml de jus), on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4 1M), la formation d'une coloration rouge brique, ensuite violette indique la présence des glucosides (**Pharmacopée URSS, 1991**).

II.2.4.4. Recherche des protéines :

La mise en évidence des protéines est faite par la réaction de Biuret. Une quantité de la poudre végétale ou l'équivalent de 2 ml jus est ajoutée à 2 ml de NaOH à 20% dans un tube à essai, auxquels sont ajoutées 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse de $CuSO_4$ à 2%. Une coloration violette, quelquefois teintée de rouge indique la présence des protéines (**Békro et al., 2007**).

II.2.4.5. Recherche des lipides :

Une quantité de 2 g de poudre la poudre végétale bien l'équivalent de 15ml de jus, est macérée dans 15 ml d'éther du pétrole pendant 30 minutes dans un tube à essai. Ce mélange est filtré, puis le filtrat obtenu est évaporé sur une plaque chauffante à haute température afin d'obtenir un résidu huileux. Au résidu huileux obtenu, on ajoute 3 gouttes de H_2SO_4 . Une forte coloration violette ou une coloration verte indique la présence des lipides (**Matenga, 1996**).

II.2.4.6. Recherche des alcaloïdes :

2g de poudre ou bien l'équivalent de 12ml de jus-sont macérés dans 12 ml d'eau distillée pendant 24 heures, suivis d'une filtration. Ensuite, quelques gouttes de réactif Dragendorff sont ajoutées au filtrat. L'apparition d'une couleur rouge indique la présence des alcaloïdes. (**Pharmacopée URSS, 1991**).

II.2.4.7. Recherche des saponines :

Dans un tube à essai, on introduit 1 ml de l'infusé ou du jus, puis on ajuste le volume du tube à 10 ml avec de l'eau distillée. La solution est agitée dans le sens de la longueur de tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. L'apparition d'une mousse persistante stable pendant 2 min indique la présence des saponines (**EL-Haoud et al., 2018**).

II.2.4.8. Recherche des saponosides :

On mélange 2ml d'infusé ou du jus avec 2ml d'une solution d'acétate de plomb à 1%. La formation d'un précipité blanc indique la présence de ces metabolites (**Harbone, 1998; Raaman et al., 2006**).

II.2.4.9. Recherche des mucilages :

On introduit 1 ml de l'infusé ou du jus dans un tube à essai, et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, après 10 min, la formation d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages (**Diallo, 2005**).

II.2.4.10. Mise en évidence anthraquinones libres :

A un gramme de poudre végétale ou bien à l'équivalent de 10ml de jus, on ajoute 10 ml de chloroforme, ce mélange est chauffé au bain Marie à 80° , pendant 3 min puis filtré. On introduit 1ml de ce filtrat dans un tube à essai et on lui ajoute 1ml d'ammoniaque (NH_4OH 1M). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des dérivés anthracéniques libres (**Togola, 2002 ; Diallo, 2005**).

II.2.4.11. Recherche des terpénoïdes :

1g de poudre végétale (ou l'équivalent de 5ml de jus) a été mélangé avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La présence de terpénoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur brune rougeâtre (**Edeoga et al., 2005 ; Amin et al., 2013**).

II.2.4.12. Recherche des stéroïdes :

1g de poudre végétale ou bien l'équivalent de 10ml de jus est mélangé avec 10 ml d'éthanol pendant 5 min puis filtré. Ensuite, 1 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) a été rajouté à 1 ml de filtrat. La formation d'une coloration rouge indique la présence des stérols insaturés (**Senhaji et al., 2005**).

II.2.4.13. Recherche des substances polyphénoliques :**a) Les coumarines :**

On fait bouillir 2 g de poudre végétale ou bien l'équivalent de 20 ml de jus dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min au bain Marie. Après refroidissement, on filtre ensuite on prend 5 ml de ce filtrat auquel on ajoute 10 gouttes de KOH (10%) et quelques gouttes d'HCl (10%), l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines (**Diallo, 2005**).

b) Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols polaires, ils existent dans les écorces d'arbres, les feuilles, les fruits et les racines (**Berthod et al., 1999 ; Cowan, 1999**).

Ils sont divisés en deux groupes, qui peuvent être révélés séparément :

→ **Tanins catéchiques** : On ajoute 7,5 ml de réactif de Stiasny à 15 ml d'infusé ou du jus. Ce mélange est chauffé au bain Marie à 90°C pendant 15 min. L'apparition d'un précipité confirme leur présence (**Judith, 2005**). Le mode de préparation de ce réactif est détaillé en annexe C

→ **Tanins galliques** : On ajoute graduellement de l'acétate de sodium à 5 ml de l'infusé ou du jus jusqu'à sa saturation. On n'y ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de FeCl₃ (1%). L'apparition d'une couleur bleu-noirâtre indique la présence de tanins galliques (**Judith, 2005; Diallo, 2005**).

c) Les flavonoïdes :

1ml de l'infusé ou du jus est traité par quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré HCl et quelques tournures de magnésium, l'apparition d'une coloration rouge-orange ou jaune indique la présence des flavonoïdes (**Safer, 2018**).

d) Les anthocyanes :

On prend 5 ml d'infusé ou du jus auquel on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄ 1M), puis 5 ml d'ammoniaque (NH₄OH 1M). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violet en milieu basique, on peut confirmer la présence d'anthocyanes (**Diallo, 2005**).

e) Les leuco-anthocyanes (pro-anthocyanidols) :

On additionne 2 g de poudre végétale ou l'équivalent de 20 ml de jus à 20 ml d'un mélange propanol/acide chlorhydrique (v/v), qu'on porte à ébullition dans un bain Marie pendant 3 min. La réaction donne une coloration rouge en présence des leuco-anthocyanes (**Pharmacopée URSS, 1991**).

II.2.5. Etude de quelques paramètres biochimiques :

L'objectif de cette étude consiste à réaliser un ensemble de dosages biochimiques afin de quantifier certains métabolites secondaires dont la présence a été validée lors du screening phytochimique que nous avons effectué pour les feuilles et les fruits de *Punica Protopunica* Balf.

II.2.5.1. Extraction par macération dans l'éthanol :

Les poudres végétales obtenues à partir des feuilles et des épicarpes des fruits de *P. protopunica* Balf., ainsi que le jus des arilles ont été soumises séparément à une extraction par macération dans l'éthanol. Cette méthode consiste à mettre en contact direct le solvant avec le matériel végétal, durant un temps déterminé et à température ambiante.

- **Mode opératoire :**

On verse 100 ml d'éthanol sur 10 g de poudre végétale contenue dans un bécher (v:10v), ce mélange est maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures, ensuite filtré deux fois, afin d'écartier la poudre végétale épuisée. Le filtrat obtenu est évaporé à sec dans une étuve de séchage (45°C) jusqu'à l'obtention d'un résidu.

Un volume de 100 ml de jus des arilles est mélangé avec un volume équivalent d'éthanol (v:v), puis soumis à une agitation magnétique pendant 24 h, suivi par un séchage à (45°C) dans l'étuve jusqu'à l'évaporation totale de solvant et la persistance d'un résidu (**Saxena et al., 2013**)

Les résidus obtenus sont soigneusement conservés au frais (+4°C), et à l'abri de la lumière dans des petits flacons sombres bien fermés, afin d'éviter tout éventuel risque d'oxydation de leurs constituants.

II.2.5.2. Préparation des extraits éthanoliques (solutions mères) :

- Nous avons pris 10 mg de chaque résidu (Feuille, épicarpe, jus de fruit) de *Punica protopunica* Balf. Afin de les dissoudre séparément dans 10 ml d'éthanol 96% chacun.

- Chaque extrait est soumis à une agitation jusqu'à solubilisation totale, puis maintenu dans un flacon sombre à conservés au frais (+4°C).

II.2.5.3. Dosages spectrophotométriques :

Les dosages biochimiques des extraits éthanoliques précédemment préparés, ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type *SHIMADZU UV-1601*, (3 répétitions par dosage).

II.2.5.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols, contenus dans les extraits éthanoliques, est réalisé selon le protocole décrit par **Singleton et Rossi (1965)**.

Le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3[P(W_3O_{10})_4]$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (**Ribereau, 1968**).

- **Mode opératoire :**

Un volume de 200 μ l de chaque extrait (1mg/ml) est mélangé avec 1ml du réactif de Folin Ciocalteu et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5%. L'ensemble est bien mélangé et incubé à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée contre un blanc au spectrophotomètre à 765nm.

- **Calcul :**

On utilise une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique. L'indice de Folin-Ciocalteu est exprimé en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec (μ g eq ac gal/mg ES).

II.2.5.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est déterminée par la méthode colorimétrique décrite par **Kim et al. (2003)**.

- **Mode opératoire**

Une quantité de 100 μ l de chaque extrait (1mg/ml) est mélangée avec 0,4ml d'eau distillée puis avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$ 5%). Après 5min, 0,02ml d'une solution de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$ 10%) est ajoutée. On additionne à ce mélange 0,2ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 1M) et 0,25ml d'eau distillée, ce mélange est maintenu sous agitation à l'aide d'un vortex, pendant 5 minutes, à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 510 nm.

- **Calcul :**

-Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la quercétine à différentes concentrations, pratiquée dans les mêmes conditions opératoires. La concentration des flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent quercétine par milligramme d'extrait sec (μ g eq quer/mg ES).

II.2.5.3.3. Dosage des flavonols :

Les flavonols représentent un sous-groupe de flavonoïdes (flavonoïdes monomériques), ils sont responsables de la pigmentation jaune que l'on observe dans les organes de certaines espèces. La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de **Yermakoy et al. (2004)**.

- **Mode opératoire :**

On mélange 2 ml de chaque extrait (1mg/ml) avec 2 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 20 g/l) et 6 ml d'une solution d'acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 50 g/l). Après 2 heures et demi d'incubation à 20°C, La lecture de l'absorbance est réalisée à 440 nm.

- **Calcul :**

-La courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations allant de 0,0166 à 0,5 mg/ml de solution éthanolique de rutine. Le taux des flavonols, est déterminé en microgramme équivalent rutine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g eq rut/mg ES}$).

II.2.5.3.4. Dosage des pigments totaux :

Le dosage des pigments totaux (chlorophylle a + chlorophylle b) dans les feuilles fraîches est réalisé conformément au protocole décrit par **Plassard et al. (1983)**.

Ce protocole est réalisé en deux phases : la phase d'extraction des pigments photosynthétiques puis la phase de dosage des pigments totaux proprement dits.

- **Extraction des pigments photosynthétiques :**

Selon **Plassard et al. (1983)**, il est important de mener l'extraction rapidement et de conserver les extraits au frais et à l'abri de la lumière (en l'enveloppant avec du papier aluminium) afin de minimiser les risques de dégradation des pigments.

Selon ces auteurs, la méthode d'extraction des pigments photosynthétiques inclue les étapes suivantes :

- Laver, égoutter puis peser précisément 1.5g de matériel végétale (Feuilles fraîches uniquement)
- Couper le matériel végétal en petits fragments.
- Ajouter 4ml d'acétone et broyer jusqu'à obtenir un mélange homogène.
- Ajouter 6 ml d'acétone à 80% et broyer à nouveau soigneusement.
- Laisser décanter quelques minutes (10min).
- Récupérer le surnageant dans un erlène (de préférence, filtrer sur papier filtre et recueillir la solution acétonique de chlorophylle) et compléter à 10 ml avec de l'acétone 80%
- Fermer le flacon contenant l'extrait pigmentaire avec du parafilm et agiter.
- Conserver dans un flacon sombre et l'envelopper avec du papier aluminium et mettre dans un endroit de température ambiante

- **Mode opératoire :**

- Introduire 2ml d'extrait pigmentaire dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter avec de l'acétone 80%.

- Fermer la fiole avec du parafilm et agiter manuellement.

- Placer une cuve en verre, qui contient le solvant d'extraction, et régler le zéro de l'appareil (spectrophotomètre UV-visible Type *SHIMADZU UV-1601*) à 460nm.

- Remplacer cette cuve par une autre qui est remplie au 2/3 par l'extrait pigmentaire dilué (1/4) et lire l'absorbance.

- Recommencer les opérations successivement à 645 et 663nm (régler le zéro de l'appareil pour chaque longueur d'onde utilisée).

➤ **Calcul :**

Les formules ci-dessous établies à partir de loi de BEER-LAMBERT permettent de calculer les concentrations en pigments, les résultats obtenus sont exprimés en µg/ml.

$$\text{Chlorophylle a} = 12,7 (A663) - 2,63 (A645)$$

$$\text{Chlorophylle b} = 22,9 (A645) - 4,68 (A663)$$

II.2.6. Etude de l'activité anti-oxydantes :

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. (**Chew et al., 2009**).

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) est un radical libre stable qui possède une coloration violet foncé, une fois réduit, il devient jaune pâle. Cette dernière est due aux molécules responsables du pouvoir antioxydant présent dans les extraits. (**Douaouri,2025**)

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fruits de *Punica protopunica* Balf. Sont testées pour leur pouvoir anti-oxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Pour cela, nous avons utilisé la méthode décrit par **Lopes-Lutz et al. (2008)**.

II.2.6.1. Préparation de la solution de DPPH :

- On dissout dans 100 ml d'éthanol, 4mg de DPPH sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Il est indispensable de maintenir cette solution à l'abri de la lumière (protégée par du papier aluminium)

-Un contrôle négatif est préparé dans un tube en mélangeant 1ml de réactif DPPH avec un volume équivalent d'éthanol (1 :1), ce dernier sert au réglage de la ligne de base du spectrophotomètre.

Avant de tester le pouvoir anti-oxydant des extraits testés, nous avons préparé trois dilutions pour chacun d'entre eux, les détails de ces préparations sont mentionnés dans le tableau IV

Une solution éthanolique d'acide ascorbique (1mg/ml) est préparée puis soumise aux mêmes dilutions citées précédemment, pour servir en tant que contrôle positif.

Tableau IV : Différentes solutions et dilutions préparées pour la mesure de l'activité anti-oxydante

Numéro du tube		Composition
Contrôle négatif	01	01 ml de DPPH + 01 ml d'éthanol
Dilutions préparées		
Extrait éthanolique des feuilles (EEF)	01	02 ml de EEF + 08 ml d'éthanol
	02	04 ml de EEF + 06 ml d'éthanol
	03	06 ml de EEF + 04 ml d'éthanol
Extrait éthanolique des épicarpes (EEE)	04	02 ml de EEE + 08 ml d'éthanol
	05	04 ml de EEE + 06 ml d'éthanol
	06	06 ml de EEE + 04 ml d'éthanol
Extrait éthanolique des jus des arilles (EEJA)	07	02 ml de EEJA + 08 ml d'éthanol
	08	04 ml de EEJA + 06 ml d'éthanol
	09	06 ml de EEJA + 04 ml d'éthanol
Contrôle positif (Acide ascorbique)	10	02 ml de SEAA + 08 ml d'éthanol
	11	04 ml de SEAA + 06 ml d'éthanol
	12	06 ml de SEAA + 04 ml d'éthanol

- **Mode d'opérateur :**

- Dans chaque tube à essai, on mélange 1 ml de la dilution à tester et 3 ml de la solution de DPPH et ajouter 6 ml d'éthanol.
- Mélanger bien et incuber pendant 30 min à l'obscurité et à Température ambiante.
- Après l'incubation, mesurer l'absorbance à 517 nm contre un blanc (DPPH pure).

- ✓ **Remarque**

Au cours de l'incubation, tous les tubes à essai doivent être parfaitement recouverts avec le papier aluminium.

- **Calcul**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide ascorbique à différentes concentrations.

Le pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH est calculé conformément à la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs blanc} - \text{Abs éch}) / \text{Abs blanc}] \times 100$$

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'étude morpho-anatomique :

III.1.1. Résultats de l'étude morphologique :

Les feuilles et les fruits du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf) ont été soumis à un examen morphologique afin de relever les critères phénotypiques qui les caractérisent. Cet examen est basé sur des observations faites à l'œil nu et/ou à la loupe binoculaire.

III.1.1.1. Examen macroscopique des feuilles :

Le grenadier sauvage possède des feuilles persistantes insérées de façon opposée sur les tiges, pouvant être parfois regroupées en verticilles.

Les feuilles sont simples et munies chacune d'un petit pétiole de 1 à 5 mm de longueur et de couleur sombre. Elles sont généralement glabres sur les deux faces : la face supérieure est de couleur vert foncé par contre la face inférieure de la feuille est de couleur vert clair avec une nervure médiane très saillante.

Chaque feuille est constituée d'un limbe elliptique allongé, caractérisé par une base atténuée, un apex échancré et une nervation réticulée. La taille moyenne des feuilles est estimée à $4,97 \pm 0,07$ cm de long et $1,8 \pm 0,4$ cm de large (Figure 7).

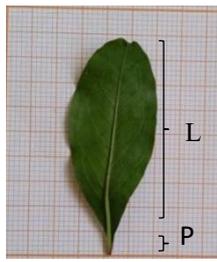
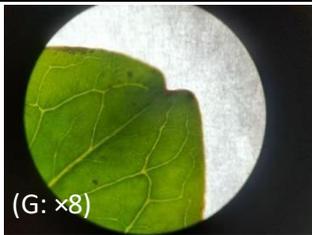
	Face supérieure	Face inférieure
Observation à l'œil nu		
Observation sous loupe binoculaire		
		
		

Figure 7 : Aspect macroscopique de la feuille de *Punica protopunica* Balf.

L : Limbe ; P : Pétiole

Nous avons récapitulé dans le tableau V, les principaux traits morphologiques des feuilles de l'espèce *Punica protopunica* étudiée en comparaison avec ceux de travaux antérieurs qui ont été publiés sur une autre espèce apparentée : *Punica granatum*.

Tableau V : Caractères morphologiques des feuilles de *Punica protopunica* en comparaison avec ceux de l'espèce *Punica granatum*

Caractère morphologique	<i>Punica protopunica</i>	<i>Punica granatum</i>	Références
Type de feuilles	Persistantes	Caduques	(Hanelt, 2001)
Disposition	Opposée ou rarement verticillée	Opposée ou sub-opposée	(Morton, 1987)
Phyllotaxie (Disposition)	Elliptique à oblongue	Oblongue à lancéolée	(Mars, 2000)
Longueur	4,97 ± 0,07 cm	1,5 à 7 cm	(Zohary et Hopf, 2000).
Largeur	1,8 ± 0,4 cm	0,8 à 2 cm	(Hussain et al., 2008).
Texture	Plus coriace que <i>P. granatum</i> lisse, brillante	Subcoriace, lisse, brillante	(Levin, 2006).
Couleur	Vert foncé brillant	Vert foncé brillant	(Mars, 2000)
Pétioles	1 à 5 mm de long	2 à 10 mm,	(Hussain et al., 2008)

• III.1.1.2. Examen macroscopique des fruits et des arilles :

Après la récolte du matériel végétal, les fruits de *Punica protopunica* ont été décortiqués, afin de récupérer les arilles. Nous avons calculé la taille moyenne des fruits et des arilles à partir d'un lot constitué de 8 baies.

Le tableau VI et la figure 8 résument toutes les caractéristiques morphologiques que nous avons relevé sur les fruits et les arilles étudiées.

La description morphologique que nous avons établie est effectuée conformément aux clés morphométriques de genre *Punica* rapportées par Hassen (2022) ainsi que Rawat et al (2013).

Tableau VI : Caractères morphologiques des fruits et des arilles de *P. protopunica*

	Fruit	Arilles
Forme	Rond cortiqué	Ovoïdes à légèrement anguleuses ou polyédriques
Taille moyenne (cm)	8 ± 2,40	1,2 ± 0,1
Couleur	Jaunâtre	Rouge
Type	Fruit multigrain, contenant de nombreuses loges (ou carpelles) séparées par des membranes blanches. Ce fruit est non déhiscent	Exalbuminées, chaque arille est composé d'une pulpe qui entoure un pépin
Epicarpe (ou exocarpe)	Lisse, dur souvent brillant.	
Mésocarpe	Épais et fibreux souvent de couleur blanche à crème.	Charnu, acidulé et gélatineux,
Endocarpe	Mince et membraneux.	

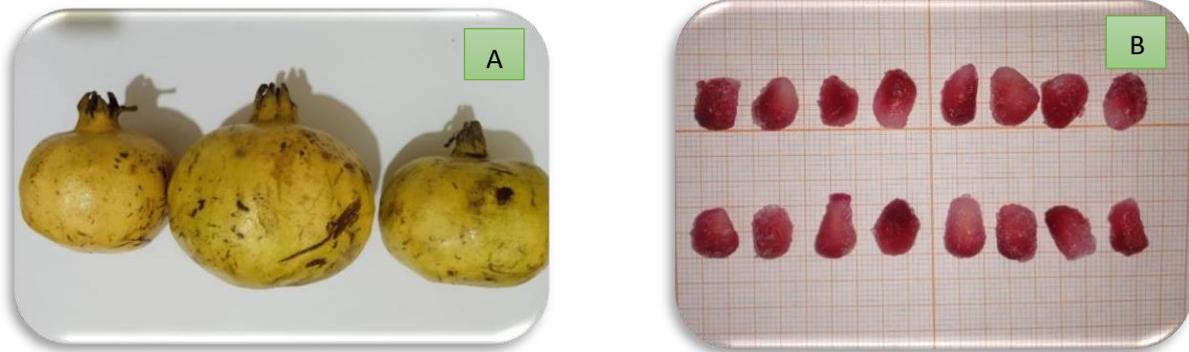


Figure 08 : Aspect des fruits et des arilles de l'espèce étudiée (*P. protopunica*)

A : Fruits, B : Arilles

À titre de comparaison, le **tableau VII** résume les principales caractéristiques distinctives que nous avons identifiées par rapport aux travaux antérieurs concernant l'espèce apparentée *Punica granatum*.

Tableau VII : Caractères morphologiques des fruits et des arilles de *P. granatum*

	Fruit	Références	Arilles	Références
Forme	Presque ronde	(Douaouri, 2018)	Anguleuse	(Douaouri, 2018)
Taille moyenne (cm)	Entre 6 et 12 cm	(Holland et <i>al.</i> , 2009) (Pande et Akoh, 2016)		
Couleur	Brun-rougeâtre	(Chakass et <i>al.</i> , 2007)	Rouge	(Douaouri, 2018)
Type	C'est une balauste, baie complexe Contient en moyenne 600 graines pulpeuses, contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et nombreuses	(Douaouri, 2018) (Chakass et <i>al.</i> , 2007)	Contient d'enveloppées d'une pulpe d'un rose grenat plus ou moins foncé suivant les variétés	(Douaouri, 2018)
Péricarpe	Non comestible est épais et coriace de consistance dure, de saveur amère et astringente	(Hassen, 2022) (Douaouri, 2018)		
Epicarpe (ou exocarpe)	Peau lisse de teinte blanc-jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé	(Douaouri, 2018)		
Mésocarpe			Charnu et gélatineux, acidulé et sucré	(Bärtels, 1998)

III.1.2. Résultats de l'étude histo-anatomique :

Les feuilles et les tiges semi-ligneuses de l'espèce *Punica protopunica* ont fait l'objet d'une analyse microscopique.

Les observations ont été effectuées sur des coupes transversales réalisées manuellement et soumises à une double coloration au Vert de Methylene-Rouge Congo. Des observations vitales et colorées en vue de face ont été également réalisées sur les faces inférieures et supérieures de la feuille.

III.1.2.1 Observation histo-anatomique des tiges ligneuses et semi-ligneuses

III.1.2.1.1 Observation des tiges ligneuses

Sur le plan microscopique, l'organisation des tissus conducteurs au niveau de la tige ligneuse nous a permis la détection des structures suivantes : le xylème, les trachéides, le bois hétéroxylé et le liber, qui sont mentionnés dans la **figure 09**

Cependant, la partie périphérique de cette tige se caractérise par la présence du suber : il s'agit de cellules épidermiques dont les parois sont entièrement imprégnées de subérine : cette substance cireuse qui confère des propriétés d'étanchéité et de résistance. **Garça (2015)** a rapporté que cette couche joue un rôle important dans la protection de la plante contre la perte d'eau et les agressions extérieures (comme les maladies ou les dommages mécaniques).

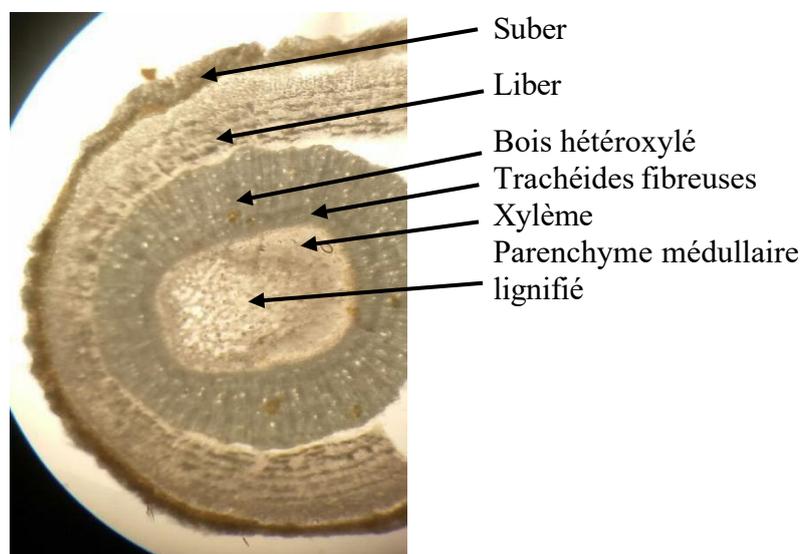


Figure 09 : Anatomie d'une tige semi-ligneuse de *P. protopunica* Balf. En coupe transversale au microscope photonique (G : x10)

III.1.2.1.2 Observation de tiges semi-ligneuses

L'étude histo-anatomique des tiges semi-ligneuses a révélé les mêmes structures tissulaires citées précédemment, par contre, le revêtement périphérique de ces tiges est caractérisé par la présence d'une ou plusieurs lenticelles (**figure 10**)

Ces structures jouant un rôle crucial dans les échanges gazeux entre les tissus internes de la plante et l'atmosphère. Elles permettent le passage de l'oxygène, du dioxyde de carbone et de la vapeur d'eau à travers le suber, qui est autrement imperméable. Substituant ainsi le rôle des stomates qui sont absents chez les tiges semi-ligneuses.

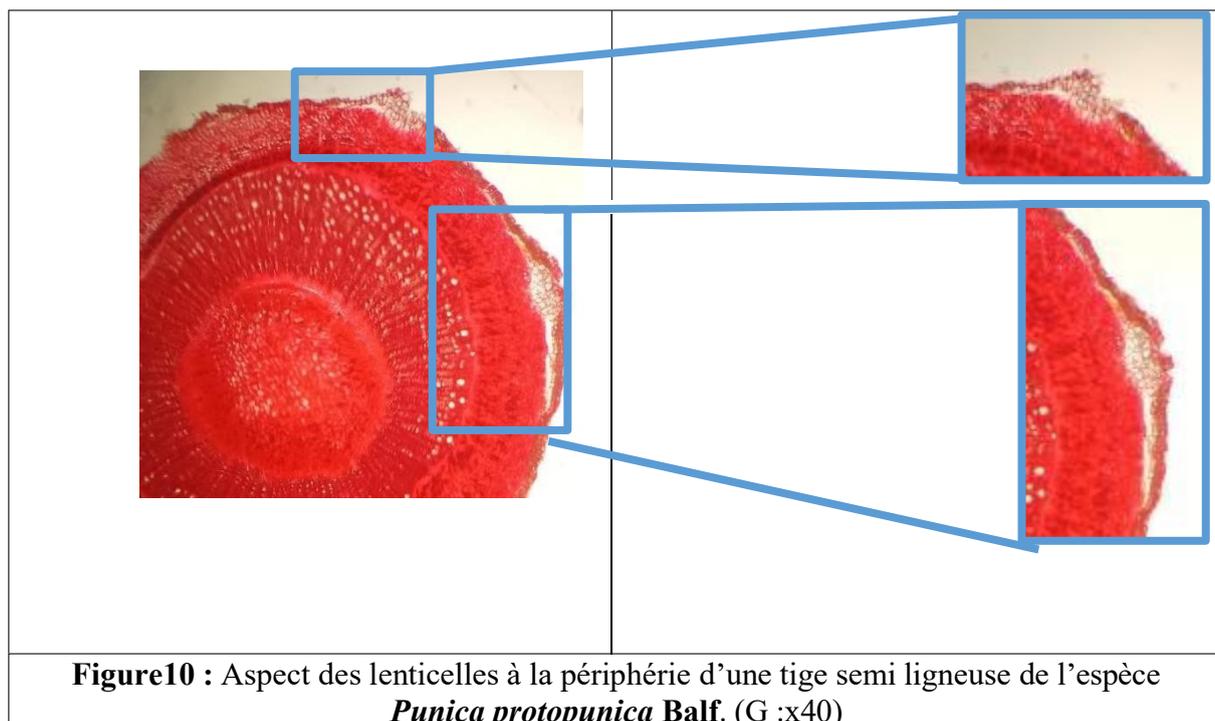


Figure10 : Aspect des lenticelles à la périphérie d'une tige semi ligneuse de l'espèce *Punica protopunica* Balf. (G :x40)

En comparant nos observations avec les données de la littérature qui concernent le grenadier comestible : *Punica granatum* L., nous avons constaté que l'espèce *Punica protopunica* Balf. Présente des trachéides lignifiées. Dans ce même contexte, l'étude menée par **Shilkina (1973)** a mis en évidence que le bois de *P. protopunica* contient des trachéides lignifiées, une caractéristique unique parmi les espèces de l'ordre des Myrtales. Par contre, chez l'espèce *Punica granatum*, le bois est principalement constitué de vaisseaux larges avec des éléments de fibres scléreuses, typiques des angiospermes avancés (**Diab et Altahir, 2019**).

La lignine est un polyphénol issu de la voie des phénylpropanoïdes, constituant majeur des parois cellulaires secondaires des plantes vasculaires. Elle s'accumule principalement dans les tissus conducteurs (xylème) et de soutien (sclérenchyme), conférant rigidité et imperméabilité aux cellules. Cette rigidité structurelle permet aux plantes de croître verticalement et de développer une ramification étendue, augmentant ainsi les surfaces photosynthétiques et facilitant le transport efficace de la sève brute via les vaisseaux conducteurs (**Barros et al., 2015 ; Wang et Dixon, 2022**).

III.1.2.2 Observation histo-anatomique des feuilles

III.1.2.2.1 Observation des épidermes foliaires

Sur le plan microscopique, on constate que de la face supérieure de la feuille est recouverte par un épiderme supérieur, c'est un tissu protecteur d'origine primaire à parois pectocellulosique (**figure 11**). Les cellules présentent une forme sinueuse, elles sont étroitement agencées les unes aux autres. On note également une absence totale des stomates sur cette face du limbe foliaire.

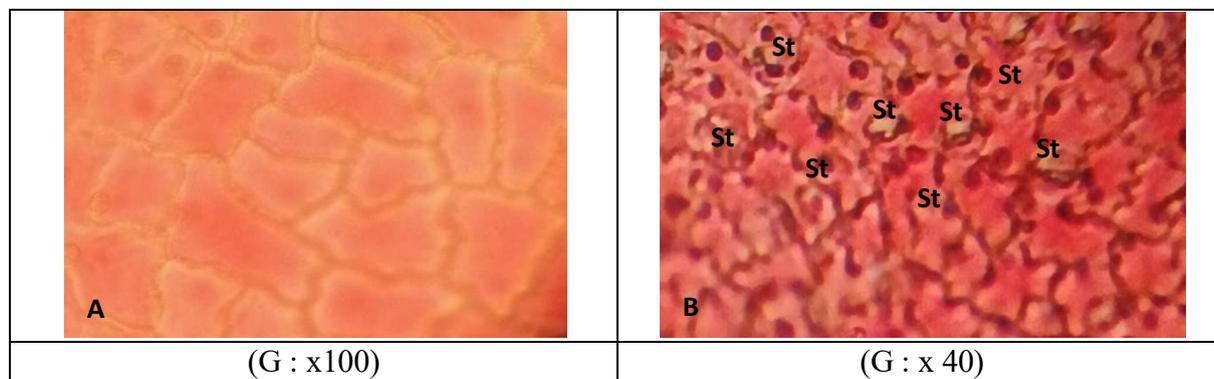


Figure 11 : Aspect de l'épiderme supérieur (A) et de l'épiderme inférieure (B) de la feuille de l'espèce *P. protopunica* en vue de face au microscope optique

Les cellules de l'épiderme inférieure des feuilles de cette espèce sont également à parois pecto-cellulosiques et comportant un nombre très important de stomates (St), qui sont dispersés entre les cellules épidermiques (**figure 11**), ils jouent un rôle important dans les échanges gazeux (respiration et photosynthèse) ainsi que dans le contrôle du phénomène d'évapo-transpiration et dans l'aptitude de cette plante à résister à la sécheresse, car ces stomates peuvent contribuer à l'assimilation de l'humidité atmosphérique pour compenser le manque d'eau au niveau du sol. Ainsi on peut qualifier les feuilles de cette espèce comme étant hypostomatiques, vu que les stomates ne sont apparents que dans la face inférieure des feuilles.

Aucun travail antérieur n'a évalué les caractéristiques histo-anatomiques de l'espèce *Punica protopunica*, cependant, **Ozcan et Yelmaz (2020)** ont rapporté que les feuilles de l'espèce *Punica grantum* présente un nombre très important indice stomatique foliaire, caractérisé par un nombre élevé de stomates par mm^3 de surface foliaire (estimé à $760/\text{mm}^3$), témoignant de sa forte adaptation aux habitats xérophiiles et au manque d'eau. Ces auteurs ont également évoqué la présence couche de cuticule qui renforce hypothèse de l'adaptation de cette espèce aux conditions arides.

Metcalfé et Chalk (2004) ont rapporté que les feuilles de l'espèce *Punica granatum* poussant Spontanément au Nigeria. Sont hypostomatiques, confirmant la présence exclusive des stomates aux niveau de la face inférieure de ses feuilles. Cependant, **Sinjare et Abdulrahman (2025)** avaient souligné la présence de certains cultivars de cette espèce qui sont amphistomatiques, soulignant la présence de stomates avec une fréquence variable sur les deux faces des feuilles, ces cultivars avaient démontré une très intéressante résistance à l'aridité.

III.1.2.2.2 Observation des feuilles en coupe transversale

Les détails histologiques qui caractérisent la feuille concernent les structures suivantes : (figure 12)

a) **Épidermes :**

- Épiderme supérieur (face adaxiale) : une seule assise de cellules isodiamétriques, à paroi mince, recouvert d'une cuticule mince.
- Épiderme inférieur (face abaxiale): similaire à l'épiderme supérieur mais avec présence de stomates
- Cuticule fine exclusivement présente à la surface de l'épiderme supérieur.

b) **Mésophylle hétérogène** composé de :

- Parenchyme palissadique : cellules allongées riches en chloroplastes, occupant la moitié de l'épaisseur du mésophylle.
- Parenchyme spongieux : cellules arrondies ou lobées, avec de nombreux espaces intercellulaires, permettant les échanges gazeux.

c) **Tissus conducteurs** au niveau des nervures présentant un xylème orienté vers la face supérieure et un phloème vers la face inférieure.d) **Cortex :** Formé de parenchyme cortical du côté supérieur et de cellules collenchymateuses sous-jacentes à l'épiderme inférieur, jouant un rôle de soutien.e) **Faisceaux conducteurs** représentés par :

- Le bois comporte des vaisseaux de grand diamètre et des fibres lignifiées, chargé de la conduction de la sève brute
- Le liber est composé de tubes criblés et de cellules compagnes, il s'occupe de la conduction de la sève élaborée.

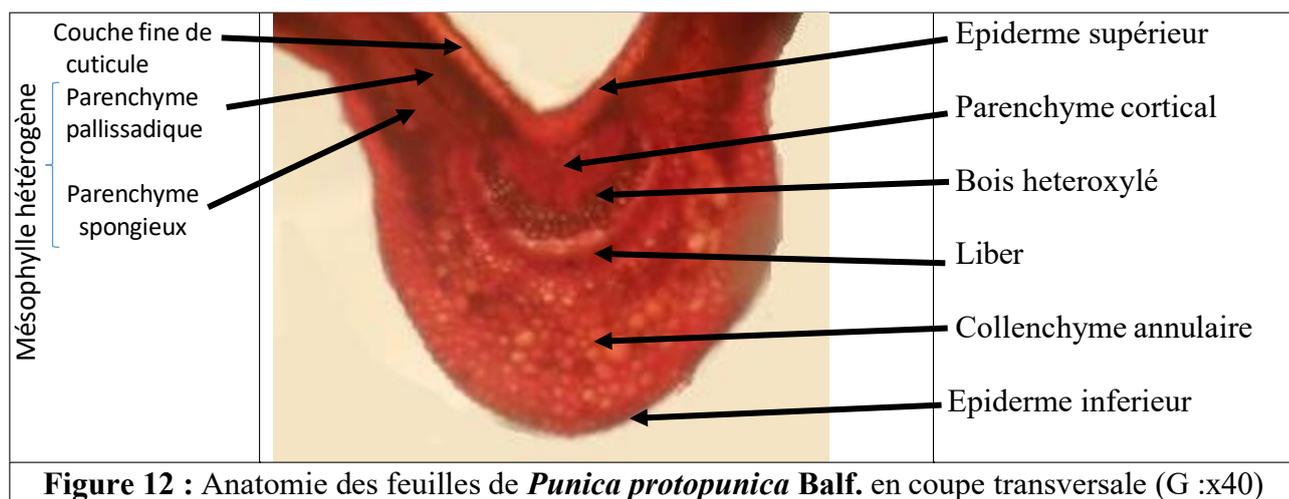


Figure 12 : Anatomie des feuilles de *Punica protopunica* Balf. en coupe transversale (G :x40)

Dans le genre *Punica*, la quasi-totalité des travaux déjà publiés sur les caractéristiques histo-anatomiques portent sur les feuilles de l'espèce *Punica granatum* seulement. La présence d'un épiderme foliaire unistrate recouvert par une cuticule mince a été rapporté chez le grenadier commun (*Punica granatum*) par les travaux de **Rajaei et Yazdanpanah (2025)**. Ces mêmes

auteurs ont également souligné la présence de faisceaux conducteurs (cribro-vasculaires) qui ont exactement la même organisation anatomique que nous avons observé chez l'espèce *Punica protopunica*

Carlquist (2001) a rapporté que les feuilles de *Punica granatum* présentent un Mésophylle composé d'une assise de parenchyme palissadique et de 3 à 4 couches de parenchyme spongieux.

III.2. Résultats de l'étude physico-chimique :

Afin de valider la bonne qualité de la poudre végétale des feuilles et des fruits de *Punica protopunica*, nous avons effectué une caractérisation physico-chimique pour les paramètres suivants : le taux d'humidité, le pH et le taux des substances extractibles (par l'eau et par l'éthanol). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

Tableaux VIII : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles et des fruits de *P. protopunica*.

Propriétés physico-chimiques		Résultats obtenues		
		Feuilles	Fruits	
			Arilles	Epicarpes
Teneur en eau		68%	77,81%	
Taux d'humidité		7,22%		8,07%
pH		5	2,95	3,64
Teneur des substances extractibles	Par l'eau	20%	6,83%	20%
	Par l'éthanol	20%	1,85%	30%

✓ **Remarque :** Nous n'avons pas étudié Teneur en eau au niveau des épicarpes, et taux d'humidité au niveau des arilles.

a) Teneur en eau :

Les arilles de la grenade sauvage comme pour les autres fruits charnus, sont riches en eau. La teneur que nous avons obtenu est de 77,81%. Cependant, pour les feuilles, elle est égale à 68%.

L'eau constitue plus de 80% de poids frais des fruits, elle joue des rôles primordiaux dans divers processus physiologiques végétaux et animaux. Elle est impliquée dans le transport des nutriments et dans le processus de thermorégulation (Lozano, 2006)

b) Taux d'humidité :

A partir des poudres végétales préparées, nous avons obtenu des taux d'humidité de 7,22% et 8,07% pour les feuilles et les épicarpes respectivement.

Ceci montre que les poudres végétales avec lesquelles nous avons travaillé ont été soumises à des bonnes conditions de séchage et de conservation (norme <15%) d'après les recommandations de la Pharmacopée européenne (2002), validant ainsi leur bonne qualité.

c) Potentiel hydrogène (pH) :

Le pH s'est avéré acide pour les feuilles (5), et très acide dans le jus (2,95) et l'épicarpes (3,64) (photos en annexe D.1)

Douaouri (2018) a rapporté que le pH du jus de *Punica granatum* récoltée dans la région de Beni Tamou (Wilaya de Blida) est égale à 4,12.

Les jus des cultivars tunisiens de *Punica granatum* analysés par **Zaouay et al. (2012)**, ont montré également un caractère acide (pH entre 2,72 et 4,24). Selon **Bist et al. (1994)**, les fruits des sélections sauvages appartenant au genre *Punica* sont plus acides que ceux des cultivars commerciaux.

La connaissance des valeurs de pH pourrait être utilisée comme paramètre de contrôle de qualité des poudres et de leur stabilité. En effet, les pH pourraient d'une part varier d'une région à une autre en raison des propriétés physico-chimiques des sols, ce qui pourrait influencer les propriétés physico-chimiques des matières végétales, d'autre part, elles pourraient varier au cours du temps durant leur conservation (**Ouédraogo et al., 2018**).

d) Teneur des substances extractibles :

Les taux de substances extractibles dans l'eau et dans l'éthanol étaient respectivement de 20 % pour chacun dans les feuilles, de 20 % et 30 % dans les épicarpes.

La diversité structurale de chaque organe dans une même plante est responsable de la grande variabilité des rendements obtenus (**Koffi et al., 2010**). L'éthanol et l'eau sont les meilleurs solvants d'extraction recommandés, car ils ont l'avantage d'être non polluants et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (**Jokiæ et al., 2010**).

L'emploi de l'éthanol et de l'eau dans la mesure de substances extractibles est dû à leurs caractéristiques en tant que solvants et de leur miscibilité, facilitant l'extraction efficace de diverses substances. L'éthanol, en tant que solvant organique, solubilise efficacement les composés non polaires et légèrement polaires, tandis que l'eau, en tant que solvant polaire, dissout toutes les substances polaires.

III.3. Résultats de l'étude phytochimique :

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence qualitativement la présence de quelques classes de métabolites primaires et secondaires au niveau des feuilles et des fruits de *Punica protopunica* Balf. La détection de ces composés est soit basée sur des réactions de précipitation, soit sur le changement de couleur spécifique du mélange réactionnel préparé. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau IX (les photos de ces réactions sont présentées en annexe D.2)**.

Tableau IX : Résultats du screening phytochimique des feuilles et des fruits de *Punica protopunica*.

Métabolites recherchés	Indicateur (Réaction positive)	Résultats		
		Feuilles	Epicarpes	Jus
L'amidon	L'apparition d'une coloration bleu-violacée.	-	-	-
Les sucres réducteurs	L'obtention d'un précipité rouge brique	+	+	+
Les glucosides	L'apparition d'une coloration rouge brique	+	+	+
Les protéines	L'apparition d'une coloration violette quelque fois teintée de rouge.	+	+	-
Les lipides	L'apparition d'une forte coloration violette ou une coloration verte	+	+	+
Les alcaloïdes	L'apparition d'une coloration rouge	-	+	+
Les saponines	L'apparition d'une mousse persistante stable pendant 2 min.	+	+	-
Les saponosides	La formation d'un précipité blanc	+	+	+
Les mucilages	La formation d'un précipité floconneux	-	-	+
Les dérivés anthracéniques libres	L'apparition d'une coloration rouge	-	+	+
Les terpénoïdes	L'apparition d'une une coloration brune rougeâtre	+	+	+
Les stéroïdes	L'apparition d'une coloration rouge	-	-	+
Les coumarines	L'apparition d'un trouble	+	+	+
Les tanins	Catéchiques	+	+	+
	Galliques	+	+	+
Les flavonoïdes	L'apparition d'une coloration rouge, orange ou jaune.	+	+	+
Les anthocyanes	L'apparition d'une une coloration bleu-violacée	-	-	+
Les leuco-anthocyanes	L'apparition d'une une coloration rouge	-	+	+

Réaction négative : -

Réaction positive : +

a) L'amidon :

L'absence de l'amidon a été signalée aussi bien dans les feuilles que dans les épicarpes et le jus. Les plantes utilisent l'amidon pour produire de l'énergie lorsqu'elles ne pratiquent pas la photosynthèse, comme pendant les mois d'hiver (York, 2021).

Cependant, le résultat négatif que nous avons obtenu peut-être justifié par l'une des hypothèses suivantes :

- L'amidon n'est pas stocké dans les organes étudiés (feuilles, fruits), témoignant de l'absence d'amyloplastes à l'échelle microscopique. Ces structures n'ont pas été observées lors de l'étude histo-anatomique. Cette hypothèse est renforcée par le travail de **Taiz et al. (2015)** ayant rapporté que l'amidon est souvent absent dans les écorces et les feuilles adultes des plantes supérieures.

- L'amidon est présent à des niveaux faibles qui ne peuvent pas être détectés par cette méthode qualitative. D'après **Smith et Zeemaan (2006)**, la présence de ce métabolite au niveau des organes aériens de la plante est transitoire : il s'accumule le jour (suite à l'activité photosynthétique) et s'hydrolyse la nuit (pour libérer l'énergie nécessaire au processus respiratoire).

- Le prélèvement de matériel végétal en présence d'un stress biotique (Phytopathogènes) ou abiotique (sécheresse), peut également donner un tissu sans amidon résiduel, car la plante utilise les sucres sous leur forme simple afin de surmonter le stress (**Smith et Zeemaan, 2006**).

b) Les sucres réducteurs :

Les résultats de ce test de caractérisation montrent que les feuilles, les épicarpes et le jus contiennent des sucres réducteurs, ces derniers jouent un rôle important dans les voies métaboliques centrales et contribuent à la production de métabolites secondaires qui améliorent les propriétés médicinales des plantes et agissent en tant que molécules de signalisation ou de régulation centrale qui régulent l'expression des gènes associés à la croissance, au développement, au métabolisme, à la réponse au stress et à la résistance aux maladies des plantes (**Khatri et Chhetri, 2020**).

Dans l'étude de **Sreedevi et al. (2017)**, il a été signalé que les feuilles de *P. granatum* étudiées étaient riches en sucres réducteurs. En revanche, **Doukani (2018)** a signalé l'absence de sucres réducteurs dans le jus et les épicarpes.

c) Les glucosides :

Dans notre étude, *Punica protopunica* comporte des glucosides dans les feuilles, l'épicarpe et le jus.

D'après **Hassaine (2020)**, les glucosides sont très répandus dans le règne végétal, on les trouve à peu près dans tous les organes (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits). Ces métabolites sont très fréquents chez les plantes à fruits rouges, les plantes herbacées, et les plantes à feuilles épaisses. Les plantes utilisent ces composés pour se défendre contre des agents pathogènes extérieurs.

d) Les protéines :

Le test de caractérisation phytochimique des protéines, réalisé sur les feuilles et l'épicarpe de *P. protopunica*, avait donné suite à des résultats positifs, contrairement

au jus, qui a donné des résultats négatifs. Les travaux de **Sreedevi et al. (2017)** ont rapporté des résultats similaires, révélant la présence des protéines au niveau des feuilles de *P. granatum*. En revanche, **Douaouri (2018)**, il a été signalé l'absence des protéines dans le jus et les épicarpes.

e) Les lipides :

Les résultats des tests de caractérisations des lipides montrent que tous les organes étudiés contiennent des lipides, notamment le jus.

Les travaux de **Douaouri (2018)** ont rapporté des résultats négatifs des lipides au niveau des épicarpes et de jus de *P. granatum*.

Les lipides sont essentiels à l'intégrité des cellules et des organites en agissant comme une barrière hydrophobe pour la membrane. De plus, les lipides sont stockés sous forme réserves dans les graines (**Kim, 2020**).

f) Les alcaloïdes :

Dans cette étude, nous avons noté que les alcaloïdes sont absents dans les feuilles et les épicarpes de *Punica protopunica*. Cependant, ils ont été détectés au niveau du jus de cette espèce.

Douaouri (2018) a approuvé la présence des alcaloïdes au niveau des épicarpes et de jus de *P. granatum*. Dans ce même contexte, les travaux de **Sreedevi et al. (2017)** ont confirmé leur absence au niveau des feuilles de cette espèce.

Bouvet (2023) a rapporté l'usage de nombreux alcaloïdes en médecine traditionnelle et moderne en raison de leurs multiples effets : Analgésiques (Ils soulagent la douleur, stimulants (Ils augmentent l'activité mentale et physique), anti-inflammatoires (Ils réduisent les inflammations) et antispasmodiques (Ils détendent les muscles).

g) Les saponines :

Le criblage phytochimique des saponines a révélé leur présence au niveau des feuilles et des épicarpes ainsi que leur absence dans le jus de *P. protopunica*.

Les travaux de **Sreedevi et al. (2017)** et **Benchagra (2022)** ont rapporté des résultats positifs au niveau des feuilles, des épicarpes et du jus de *P. granatum*,

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (**Badiaga, 2012**). Ces métabolites diminuent les lipides sanguins, diminuent les risques de cancer. Un régime riche en saponines peut être utilisé pour inhiber la carie dentaire et l'agrégation plaquettaire, traiter l'hypercalcémie chez l'Homme et servir d'antidote contre l'intoxication aiguë au plomb (**John Shi et al., 2004**).

h) Les saponosides :

Le test de caractérisation phytochimique des saponosides, réalisé sur les feuilles, les épicarpes et le jus de *P. protopunica* avait donné suite à des résultats positifs.

Les saponosides sont des glycosides naturels présents dans de nombreuses plantes, composés d'une partie aglycone (souvent triterpénique ou stéroïdique) liée à des sucres. Ils jouent un rôle important dans la défense des plantes grâce à leurs propriétés antimicrobiennes et toxiques. Chez l'Homme, ils présentent divers effets pharmacologiques, notamment expectorant, anti-inflammatoire, hypocholestérolémiant et immunostimulant. D'après **Vincken et al. (2007)**, les saponosides sont aussi étudiés pour leur capacité à renforcer la réponse immunitaire dans les vaccins.

i) Les mucilages :

La caractérisation phytochimique des mucilages réalisés sur les feuilles et l'épicarpe de *P. protopunica* a donné suite à des résultats négatifs tandis que le jus a donné des résultats positifs.

Doukani (2018) ont approuvé la présence des mucilages au niveau des épicarpes et leur absence dans le jus de *P. granatum*.

Les mucilages sont des matières végétales riches en polysaccharides qui gonflent au contact de l'eau pour former une substance visqueuse. Ils sont utilisés en médecine dans le traitement de l'inflammation des muqueuses et de la toux, ou comme laxatifs doux, ainsi que dans les industries alimentaires et cosmétiques (**Bernard, 2010**).

En plus de maintenir l'hydratation, les mucilages jouent un rôle dans le maintien de l'oxygène dans les tissus des graines. En raison de la présence des polysaccharides dans leur composition chimique, ils constituent une source d'énergie pour la plante. Les mucilages sont également importants pour la germination des graines (**Katarzyna Dybka-Stępień et al., 2021**).

j) Les anthraquinones libres :

Après les tests de caractérisations des anthraquinones réalisées sur les parties étudiées de *P. protopunica*, nous avons obtenu des résultats négatifs au niveau des feuilles et des résultats positifs pour le jus et les épicarpes.

Dans l'étude de **Sreedevi et al. (2017)**, il a été signalé que les feuilles de *P. granatum* étudiées ne contiennent pas des anthraquinones.

Les anthraquinones colorent les plantes et sont largement utilisées comme colorants naturels. Elles sont également utilisées comme laxatifs et possèdent des propriétés antifongiques et antivirales (**Jean-Louis et al., 2024**).

k) Les terpénoïdes :

Dans cette étude, nous avons observé que les feuilles étudiées, les épicarpes et le jus de *P. protopunica* étaient riches en terpénoïdes.

Dans l'étude de **Sreedevi et al. (2017)**, il a été signalé que les feuilles de *P. granatum* étudiées étaient riches en terpénoïdes. En revanche, **Doukani (2018)** a constaté que les épicarpes et le jus de *P. granatum* ne contiennent pas de terpénoïdes.

Plusieurs terpénoïdes sont biologiquement actifs et sont utilisés dans la lutte contre le cancer, le paludisme, l'inflammation et diverses maladies infectieuses. Néanmoins, certains composés de ce groupe ont montré des effets toxiques provoquant, entre autres, des troubles gastro-intestinaux ou des manifestations du système nerveux central (**Mbaveng et al., 2014**).

Les terpénoïdes jouent également un rôle écologique en défendant les plantes elles-mêmes contre les insectes herbivores et les agents pathogènes (**Wang et al., 2023**).

l) Les stéroïdes :

Le jus du grenadier sauvage comporte des stéroïdes dans sa composition chimique, contrairement aux feuilles et aux épicarpes de cette espèce.

Les travaux de **Sreedevi et al. (2017)** ont noté l'absence des stéroïdes au niveau des feuilles de *P. granatum*.

Sawadogo et al. (2008) rapporté que la présence de stéroïdes dans une plante contribue à justifier ses utilisations traditionnelles contre les inflammations.

Les stéroïdes végétaux, en particulier les brassinostéroïdes (BRs), sont des hormones essentielles qui régulent la croissance, le développement et la réponse des plantes aux stress. Ils favorisent l'élongation cellulaire, la division cellulaire et la formation des organes, tout en renforçant la tolérance aux stress abiotiques et biotiques (**Vriet et al., 2012**).

m) Les flavonoïdes, les coumarines et les Tanins (galliques et catéchiques) :

Les tests de caractérisation phytochimique des flavonoïdes, des coumarines et des tanins (galliques et catéchiques) réalisés sur les épicarpes, les feuilles et le jus *P. protopunica* avaient donné suite à des résultats positifs.

Les travaux de **Sreedevi et al. (2017)** ont confirmé la présence des flavonoïdes, des coumarines et des tanins (catéchiques et galliques) au niveau des feuilles de *P. granatum*. Dans ce même contexte, **Benchagra (2022)** ont confirmé leur présence dans les épicarpes et le jus de cette plante.

Les composés phénoliques offrent une protection efficace contre les agents pathogènes et les herbivores grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques et astringentes, tout comme les tanins. Il protège également contre les stress abiotiques tels que les rayons UV, la sécheresse et les changements de température (**Labani, 2021**).

D'après **Solovchenko et al. (2010)** et **Pourcel et al. (2007)**, les flavonoïdes sont impliqués dans les processus de résistance des plantes aux agents pathogènes,

d'attraction pour les insectes et les animaux pollinisateurs et de facilitation de la dispersion des graines.

D'après **Ghosh et al. (2023)**, les coumarines ont été signalés comme ayant une grande variété de potentiels pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, antipaludéens, antiviraux, antifongiques, neuroprotecteurs, anticonvulsivants, antihypertenseurs, antibactériens, anticoagulants et anticancéreux.

n) Les anthocyanes :

Dans notre étude, nous avons noté que les poudres de feuilles et d'épicarpes ne comportent pas des d'anthocyanes, par contre le jus en est riche.

Dans l'étude de **Kaci-meziane (2017)**, il a été signalé que les feuilles de *P. granatum* étudiées étaient riches en anthocyanes.

Les anthocyanes sont des pigments flavonoïdiques responsables des couleurs rouge, violet et bleus observés dans de nombreuses fleurs, fruits et feuilles. Il joue un rôle clé dans la protection des plantes contre divers stress biotiques et abiotiques. En tant que puissants antioxydants, ils neutralisent l'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors de conditions défavorables telles que la sécheresse, le froid, la salinité ou l'exposition aux UV (**Zhe et Golam, 2023**).

o) Les leuco-anthocyanes :

Le criblage phytochimique réalisé au niveau du jus et des épicarpes de *P. protopunica* a révélé la présence des leuco-anthocyanes et leur absence dans les feuilles.

Les leuco-anthocyanes sont des flavonoïdes incolores. Ils agissent comme précurseurs dans la biosynthèse des anthocyanes grâce à l'action de l'enzyme anthocyanidine synthase. C'est également une source de tanins condensés (ou proanthocyanidines), en les convertissant en flavan-3-ols sous l'influence de la leuco-anthocyanidine réductase. Ils améliorent la structure cellulaire et agissent comme antioxydants (**Forkmann et Heller, 1999**).

III.4. Résultats de l'étude biochimique :

Afin de quantifier certains métabolites secondaires dont la présence a été validée lors du screening phytochimique au niveau des feuilles, des épicarpes et de jus de *P. protopunica*, nous avons réalisé les dosages des paramètres biochimiques suivants : les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les flavonols et les pigments chlorophylliens. Leur quantification a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (*SHIMADZU UV-1601*).

III.4.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques des feuilles, des épicarpes et du jus, a été effectué en utilisant le réactif Folin-ciocalteu. Ces teneurs ont été estimées à l'aide d'une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Annexe F**). Les résultats sont présentés dans la **figure 13**

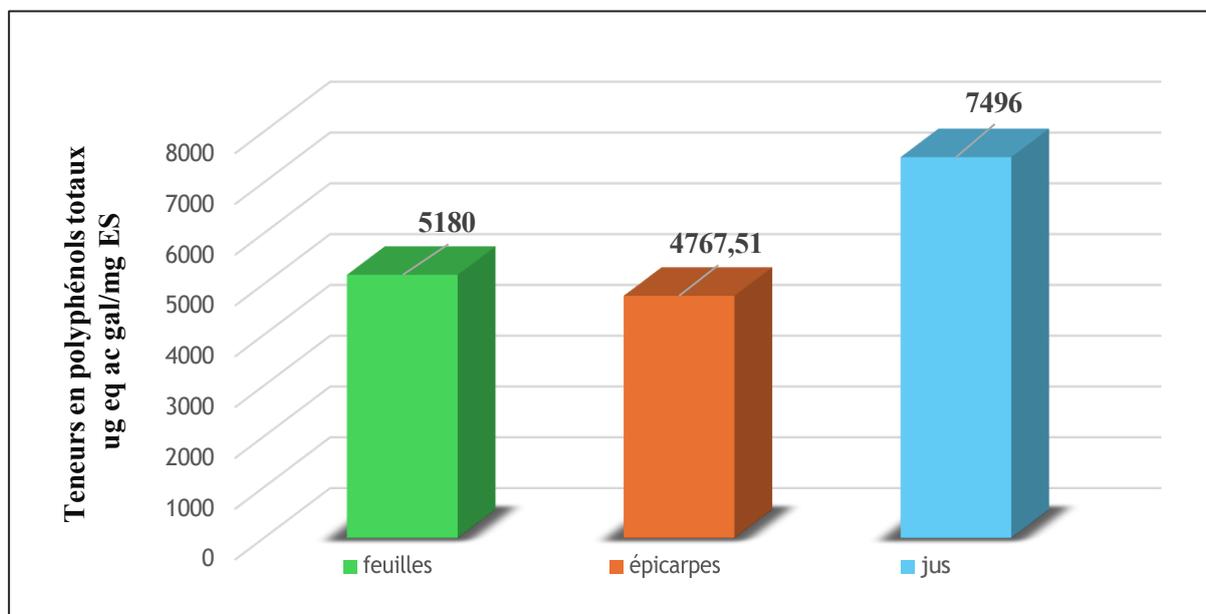


Figure 13 : Teneurs en polyphénols des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de *P. protopunica*.

Les résultats obtenus ont révélé que le jus de *P. protopunica* avait la teneur la plus élevée en composés phénoliques, estimée à 7496 $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$, suivi par les extraits des feuilles et des épicarpes avec des teneurs respectives de 5180 et 4767,51 $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles rapportées par **Milošević et al. (2023)**, qui ont obtenu une teneur en polyphénols de $341 \pm 26 \mu\text{g eq ac gal/mg ES}$ dans les épicarpes de *Punica granatum*, tandis que le jus présentait une valeur beaucoup plus faible estimée à $1,84 \pm 0,02 \mu\text{g eq ac gal/mg ES}$. L'étude de **Cheurfa et al. (2020)** a approuvé la présence des polyphénols dans l'extrait de feuilles avec une teneur de $12,66 \pm 0,10 \mu\text{g eq ac gal/mg ES}$.

Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment : l'origine géographique, les conditions climatiques, la variété de la plante, ainsi que la méthode d'extraction utilisée. Comme l'ont souligné **Alfaro et al. (2014)**, la teneur en composés phénoliques dans les plantes peut varier selon des facteurs environnementaux tels que la saison de croissance, le type de sol, la lumière ou encore les conditions de transformation et de stockage post-récolte.

D'après **Samec et al. (2020)**, les polyphénols constituent le plus grand groupe de métabolites spécialisés dans les plantes, qui peuvent jouer des rôles dans la croissance, le développement et la protection contre le stress des plantes.

III.4.2. Résultats du dosage des flavonoïdes totaux :

La quantité des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits testés est déterminée, à l'aide de la courbe d'étalonnage de la quercétine (annexe F), à partir des valeurs des absorbances mesurées au spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 14**

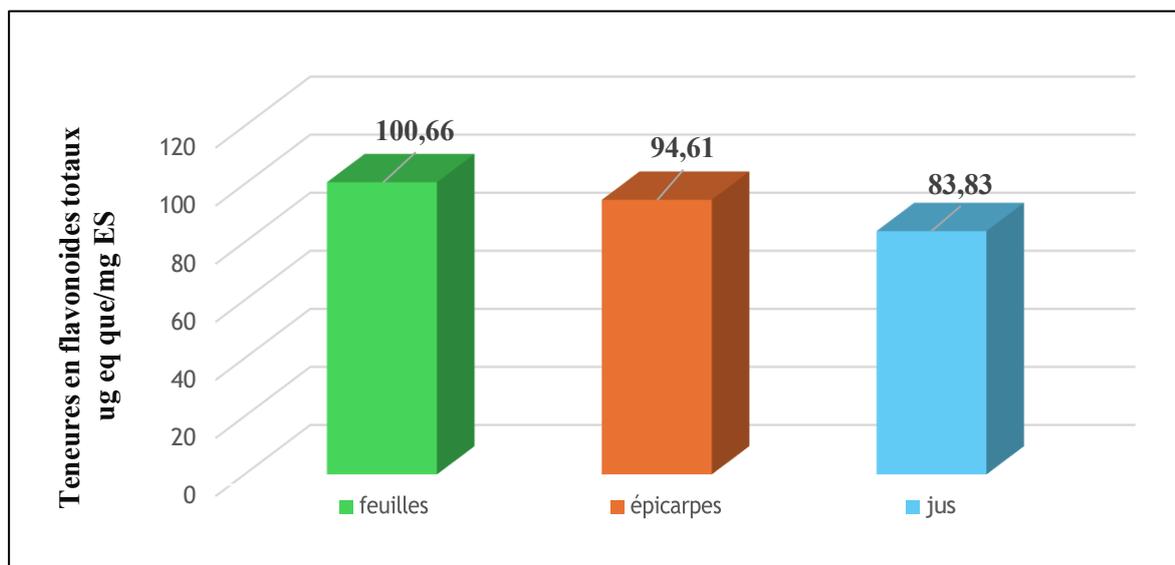


Figure 14 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de *P. protopunica*.

Nous avons constaté que les feuilles de *P. protopunica* sont plus riches en flavonoïdes totaux comparativement à l'épicarpe et au jus. En effet, les teneurs enregistrées sont de 100,66 µg eq quer/mg ES pour les feuilles, 94,61 µg eq quer/mg ES pour l'épicarpe et 83,83 µg eq quer/mg ES pour le jus. Des résultats similaires ont été par **Milošević et al. (2023)** qui ont obtenu une teneur en flavonoïdes de 29.8 ± 0.2 µg eq quer/mg ES dans l'extrait des épicarpes et de 0.13 µg eq quer/mg ES dans le jus *P. granatum*. Par ailleurs, **Cheurfa et al. (2020)** ont rapporté une teneur en flavonoïdes de $24,78 \pm 1,59$ µg eq quer/mg ES l'extrait des feuilles.

III.4.3. Résultats du dosage des flavonols :

Le dosage des flavonols a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par **Yermakov et al. (2004)**. La rutine a été utilisée comme standard, dont la courbe d'étalonnage est présentée en annexe (F). Les résultats sont présentés en **figure 15**

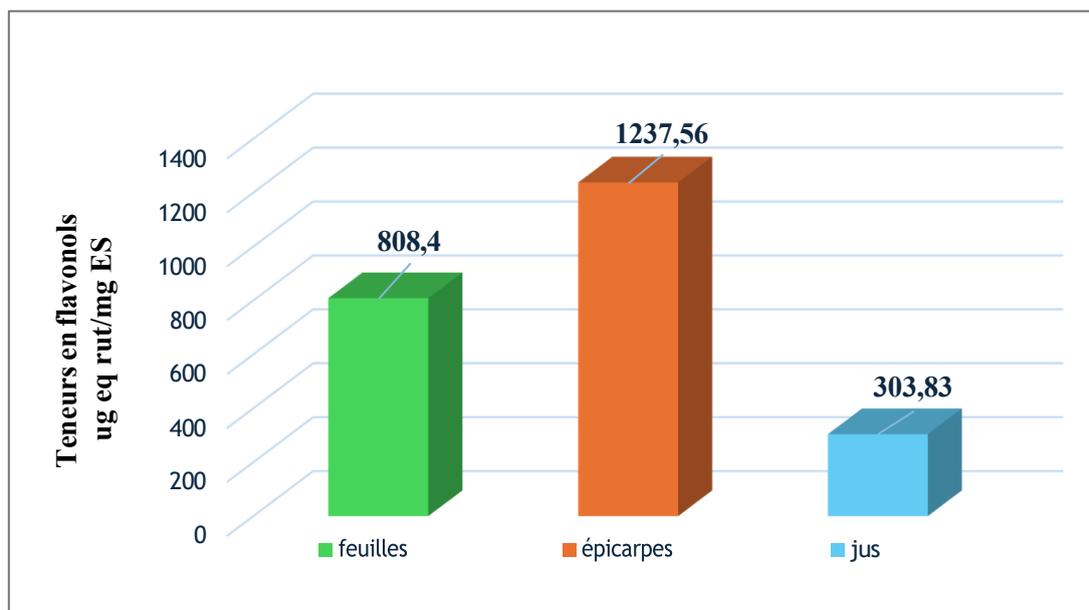


Figure 15 : Teneurs en flavonols des extraits des feuilles, des épicarpes et du jus de *P. protopunica*.

À travers les résultats obtenus, on observe que l'espèce *P. protopunica* présente des teneurs variées en flavonols selon l'organe analysé. Les épicarpes affichent la concentration la plus élevée avec $1237,56 \mu\text{g eq rut/mg ES}$, suivis par les feuilles avec $808,4 \mu\text{g eq rut/mg ES}$, tandis que le jus en contient une quantité nettement inférieure, soit $303,83 \mu\text{g eq rut/mg ES}$.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Milošević et al. (2023)** qui ont trouvé une teneur de $287.4 \pm 0.6 \mu\text{g eq quer/mg ES}$ dans les épicarpes et seulement $1.61 \pm 0.04 \mu\text{g eq quer/mg ES}$ dans le jus, tandis que **Chourfa et al. (2020)** ont rapporté une concentration de $7,68 \pm 0,6 \mu\text{g eq quer/mg ES}$ dans les feuilles de *P. granatum*.

Une autre étude menée par **Xu et al. (2008)** a montré que la teneur en flavonols peut être affectée par la maturité du fruit, les traitements post-récolte et les processus d'extraction (la technique d'extraction ainsi que le solvant utilisé durant l'extraction).

III.5.4. Résultats du dosage des pigments photosynthétiques :

Dans cette étude, nous avons analysé quantitativement les extraits préparés à partir des feuilles fraîchement récoltées de la plante, en utilisant la technique de dosage décrite par **Plassard et al. (1983)**, pour déterminer les teneurs en chlorophylle a et en chlorophylle b

Les résultats des teneurs en chlorophylle a et en chlorophylle b sont présentés en **figure 16**.

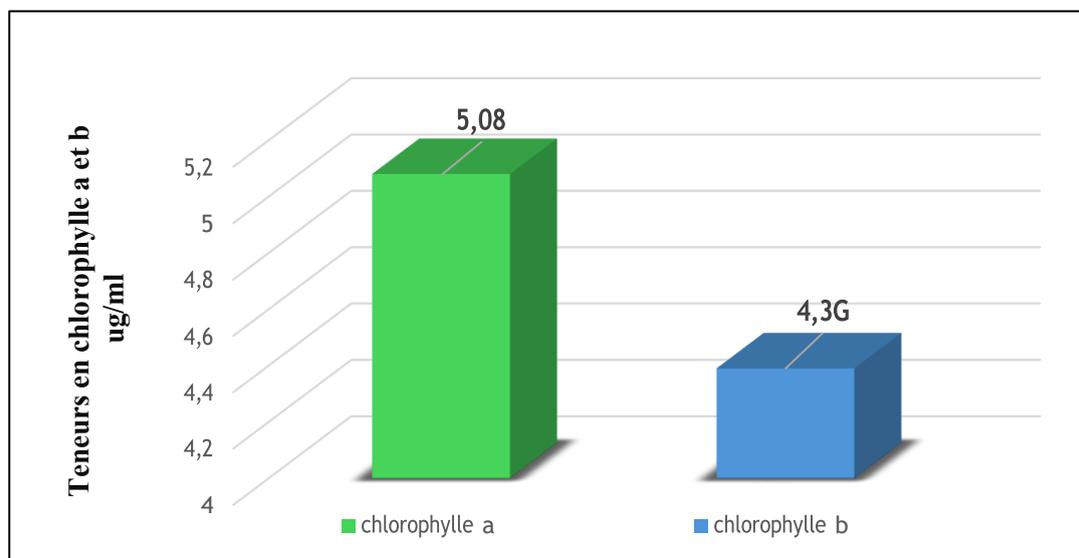


Figure 16 : Teneurs en chlorophylle a et b des extraits des feuilles *P. protopunica*.

À travers ces résultats, on constate que l'extrait des feuilles fraîches de *P. protopunica* est riche en pigments chlorophylliens, avec une teneur en chlorophylle a estimée à 5,08 µg et en chlorophylle b à 4,39 µg/ml.

Selon **Hikosaka et al. (2006)**, l'altération de l'état physiologique des plantes, causée par des conditions défavorables de l'environnement, se reflète rapidement au niveau des signaux lumineux et thermiques émis par les feuilles. La quantité de la chlorophylle des feuilles peut être influencée par plusieurs facteurs ontogéniques tels que : l'âge, le stade de développement et la phase phénologique, ainsi que des facteurs environnementaux tels que : la lumière, la température, la position de la plante, et la disponibilité de l'eau.

III.5. Résultats de l'activité anti-oxydante :

La figure 17 montre l'activité anti-oxydante de différents extraits (jus, épicarpe, feuilles) à différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 mg/ml), comparée à l'acide ascorbique (AA), utilisé comme témoin positif.

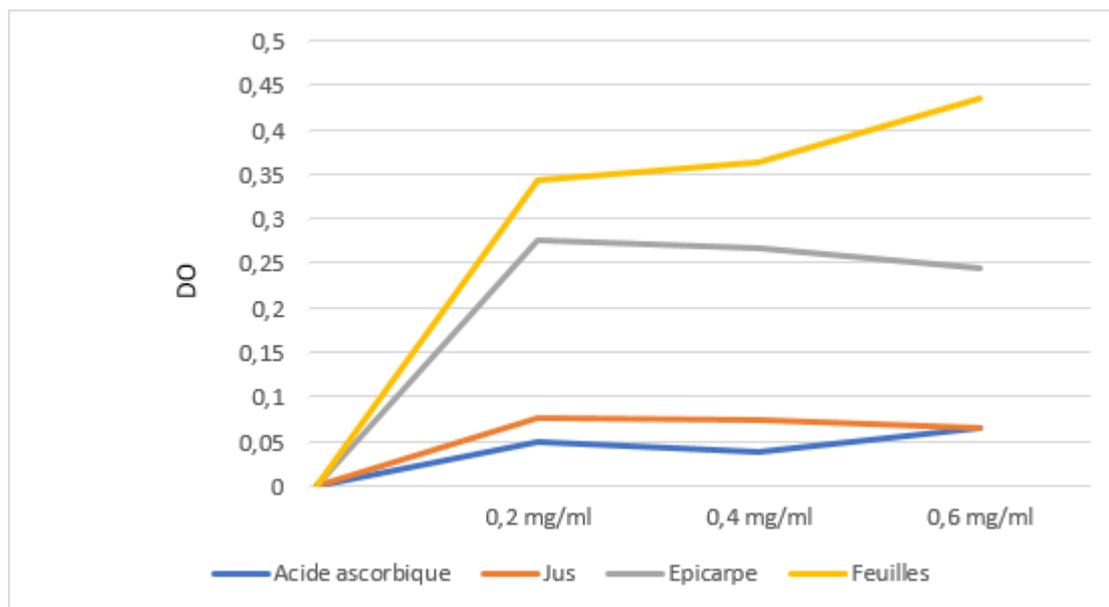


Figure 17 : les variations de la DO en fonction des concentrations

A partir des résultats rapportés dans la figure 17, nous avons remarqué une relation proportionnelle entre l'absorbance et la concentration de l'extrait analysé aussi bien pour les feuilles que pour l'acide ascorbique. D'autre part, l'épicarpe et le jus ont manifesté des courbes ascendantes marquées par une légère régression de la DO pour les concentrations supérieures à 0,2 mg/ml. Ce phénomène de décroissance de la DO rapporté par **Fukumoto et Mazza (2000)** peut être justifié par différentes hypothèses d'ordre expérimental ou technique telle que :

- La saturation chimique du système réactionnel
- La perte de réactivité des systèmes biologiques analysés
- La précipitation ou l'agrégation du mélange réactionnel
- L'interférence avec le réactif de mesure (DPPH)
- Le déroulement de réaction non spécifique absorbant à la même longueur d'onde
- La présence d'un dépôt sur les parois intérieures de la cuve de lecture

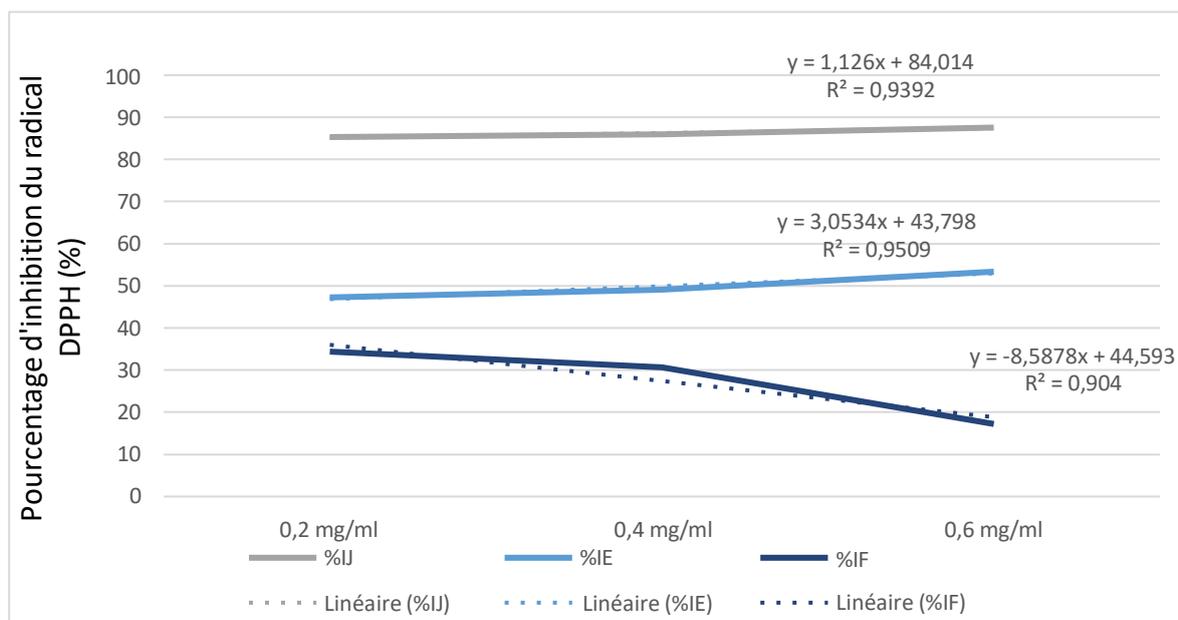


Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH exprimés par les extraits testés

D'après la **figure 18**, nous remarquons que les différentes concentrations du jus et de l'extrait des épicarpes ont montré une activité antioxydante très importante vis-à-vis du piégeage du radical DPPH. Cependant, les l'extrait des feuilles a ont exercé un pouvoir antioxydant faible et décroissant. Les pourcentages d'inhibition moyens trouvés étaient de l'ordre de 87,55 % pour l'extrait de jus, 53,35 % pour l'extrait des épicarpes. De même, les feuilles ne dépassaient pas les 34,39 % d'activité.

Les résultats d'activité anti oxydante confirment le potentiel du grenadier sauvage en tant que source naturelle de composés antioxydants, pouvant trouver des applications dans les domaines pharmacologiques et nutritionnelles.

La richesse des espèces étudiées en composés phénoliques suggère fortement leur contribution dans l'expression de ce pouvoir anti-radicalaire

Un pouvoir anti-radicalaire décroissant en fonction de la concentration d'un extrait soumis au test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) peut sembler contre-intuitif, car en général, on s'attend à ce que l'activité antioxydante augmente proportionnellement avec la concentration.

Toutefois, plusieurs phénomènes biochimiques ou techniques peuvent expliquer ce résultat.

L'explication de ce phénomène a été abordée par de nombreux travaux antérieurs :

- Les extraits concentrés riches en caroténoïdes et en anthocyanes, peuvent absorber la lumière à 517 nm, ce qui interfère avec la lecture du DPPH. Par conséquent, cela peut faussement diminuer l'absorbance mesurée et donc l'estimation du pouvoir antioxydant (**Apak et al., 2004**).

- À des concentrations élevées, la quantité d'antioxydants présents peut dépasser largement celle des radicaux DPPH disponibles dans la solution. Par conséquent, l'excès d'antioxydants n'a plus d'effet mesurable, et l'activité antiradicalaire semble stagner voire décroître en proportion (**Brand-Williams et al., 1995**).
- Certains composés riches en polyphénols peuvent se comporter comme **pro-oxydants** à des concentrations élevées, en générant des radicaux libres secondaires (**Halliwell, 2008**).

Ainsi, la suggestion que nous proposons, pour soulever le problème de la réponse anti-radicalaire décroissante de l'extrait éthanolique des feuilles, consiste à élargir la gamme des concentrations en effectuant des dilutions inférieures à 0,2 mg/ml afin de contourner le problème de saturation. L'utilisation d'un blanc d'extrait sans DPPH peut également corriger les interférences d'absorbance lors de la lecture spectrophotométrique

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressées à étudier quelques propriétés morpho-anatomiques, physico-chimiques, phytochimiques et biochimiques des feuilles et des fruits du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.), appartenant la famille des *Lythraceae*, collecté à la région de Mouzaïa-Wilaya de Blida.

Les résultats morphologiques nous ont permis de mettre en relief les caractères morphométriques des feuilles et des fruits en prenant en considération différents paramètres. Les feuilles se caractérisent par un limbe persistant elliptique à oblongue, opposé ou rarement verticillé, leur taille moyenne est estimée à $4,97 \pm 0,07$ cm de long et $1,8 \pm 0,4$ cm de large. Le fruit est rond cortiqué à peau lisse jaunâtre, dure et souvent brillante. Ce fruit est multigrain et non déhiscent, contenant de nombreuses loges (ou carpelles) séparées par des membranes blanches. Les arilles sont ovoïdes à légèrement polyédriques, de type exalbuminées et chaque arille est composée d'une pulpe qui entoure un pépin.

Suite à l'étude histo-anatomique des tiges ligneuses et semi-ligneuses ainsi que des feuilles de cette espèce, la partie périphérique des tiges ligneuses se caractérise par la présence du suber. Les tiges semi-ligneuses présentent un revêtement périphérique caractérisé par la présence d'une ou plusieurs lenticelles. Les feuilles se caractérisent par une disposition compacte du mésophylle et la présence de fibres renforçant les tissus conducteurs.

La détermination des caractéristiques physico-chimiques nous a permis de confirmer la bonne qualité des poudres végétales utilisées. Elles se distinguent par des taux d'humidité égales à 7,22% et 8,07% pour les feuilles et les épicarpes respectivement. Cependant, les taux des substances extractibles dans l'eau et dans l'éthanol au niveau des épicarpes (20% et 30% respectivement) se sont avérés largement supérieurs à ceux des feuilles (20%), et de jus (6,83% et 1,85% respectivement). Le pH s'est avéré acide pour les feuilles (5), et très acide dans le jus (2,95) et l'épicarpe (3,64). Les teneurs en eau étaient estimées à 77,81% pour les arilles et 68% pour les feuilles fraîches.

Le screening phytochimique réalisé sur les feuilles, les épicarpes et le jus des arilles de *Punica protopunica* a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs métabolites primaires, notamment les sucres réducteurs et les lipides. En revanche, les protéines étaient absentes dans le jus, bien qu'elles aient été identifiées dans les feuilles et les épicarpes. L'analyse a également confirmé la présence de divers métabolites secondaires dans l'ensemble des parties étudiées, tels que les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, les terpénoïdes, les glucosides et les saponosides. À l'inverse, certains composés tels que les alcaloïdes, les mucilages, les stéroïdes, les dérivés anthracéniques libres, les anthocyanes et les leucoanthocyanes étaient absents dans les feuilles. Les mucilages, les stéroïdes et les anthocyanes étaient absents dans les épicarpes ; tandis que les saponines n'existaient pas dans le jus. L'ensemble de ces tests s'est révélé précieux pour orienter la sélection des classes de métabolites soumises ultérieurement aux analyses quantitatives.

Les extraits éthanoliques des feuilles, des épicarpes et du jus analysés par des tests spectrophotométriques ont approuvé la présence des polyphénols totaux (5180 ; 4767,51 ; 7496 $\mu\text{g eq ac gal/mg ES}$ respectivement) et des flavonols (808,4 ; 1237,56 ; 303,83 $\mu\text{g eq rut/mg ES}$ respectivement). Par contre, les flavonoïdes totaux avaient présenté de faibles teneurs (100,66 ; 94,61 ; 83,83 $\mu\text{g eq quer/mg ES}$ respectivement). Les pigments photosynthétiques dans les feuilles fraîches avaient présenté également des teneurs intéressantes (5,08 $\mu\text{g/ml}$ pour la chlorophylle *a* et 4,39 $\mu\text{g/ml}$ pour la chlorophylle *b*).

Conclusion et perspectives

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a révélé des pourcentages moyens d'inhibition de 34,39 % pour l'extrait éthanolique des feuilles, 53,35 % pour celui des épicarpes, et 87,55 % pour le jus. Cette activité antiradicalaire élevée, en particulier dans le jus, pourrait être attribuée à sa richesse en composés polyphénoliques.

En perspective, nous suggérons d'approfondir dans les travaux futurs les points essentiels énumérés dans l'ordre suivant :

- ✓ Une étude morpho-anatomique et phytochimique des fleurs et des racines de cette plante tout en élargissant l'étude biochimique en vue de quantifier tous les métabolites détectés dans le screening phytochimique.
- ✓ Une étude de la composition chimique des feuilles et des fruits de cette plante par des méthodes chromatographiques.
- ✓ Une étude comparative de cette espèce avec d'autres espèces du même genre ou de la même famille.
- ✓ Une caractérisation moléculaire de l'espèce *P. protopunica*.
- ✓ Une étude de l'activité antioxydante par d'autres méthodes.
- ✓ Une étude de l'effet antimicrobien et antifongique de ses extraits sur un large spectre de bactéries phytopathogènes, de champignons et de moisissures.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Amin, M. M., Mir Sawhney, S.S., Jassal, M.M.S. (2013).** Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale* Wudpecker, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*,2(1):1-5.
2. **Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademi SE (2004)** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970–7981.
3. **APG IV (2016)** An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*.180:1-20.
4. **Badiaga M. (2012).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont. Bamako: Mali. 184p.
5. **Barros J, Serk H, Granlund I, Pesquet E (2015)** The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7):1053–1074.
6. **Bärtels A (1998)** Guide des plantes du bassin méditerranéen. Editions Ulmer. 352p.
7. **Bekro YA, Boua B, Fezan H, Ehouan E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*. 4(2) : 217 - 225.
8. **Benchagra L. (2022).** Effet de la grenade marocaine (*Punica granatum* L.) sur le processus oxydatif et le transport inverse du cholestérol. Application thérapeutique : traitement préventif de l'athérosclérose. Thèse de doctorat, Université Sultan Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques & Faculté Polydisciplinaire, Beni Mellal, Maroc. 229p.
9. **Berthod A, Billardello B, Geoffroy S. (1999).** Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analysis*. EDP Sciences. 27 :750-757.
10. **Bist HS, Srivastava AK, Sharma G. (1994).** Comparative studies on wild and cultivated pomegranate (*Punica granatum* L.) in Himachal Pradesh. *Indian Journal of Horticulture*, 51(3): 222-225.
11. **Bouabid B, El Yahyaoui O, Sammama A, Kerrouri S, Ould Abdellahi L, Ait-ouaaziz N, Lrhorfi A, Quayou A, Bengueddour R. (2016).** Screening phytochimique de deux variétés de pamplemousse : *Citrus paradisi* yellow et blood. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. Maroc. 17(2):506-512.
12. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25–30
13. **Carlquist S (2001)** Comparative wood anatomy: Systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood (2nd ed.). Springer. 484p
14. **Chakass MA, Carbonnier-Jarreau MC, Verhille AM, Reduron JP (2007)** Étude palynologique de trois variétés du grenadier (*Punica granatum*) au Liban. *Acta Botanica Gallica*, 154 (1) :27-42
15. **Cheurfa M, Achouche M, Azouzi A, Abdalbasit MA. (2020).** Antioxidant and anti-diabetic activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves extracts. *Foods and Raw Materials*. 8(2): 329-336.

Références bibliographiques

16. **Chew YL, Goh JK, Lim YY (2009)** *Antioxidant activity and phenolic content of selected edible wild mushrooms*. Food Chemistry, 113(2) : 578-583.
17. **Cortleven A, Schmülling T (2015)** Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 66(16): 4999–5013.
18. **Cowan M. (1999)**. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4) : 564-582.
19. **Daniell TJ, McNeilly T, Fitter AH (2001)** Morphological and molecular evidence for the evolution of *Punica protopunica*. *Acta Horticulturae*, 818:45–52.
20. **Diab RYA, Eltahir AS (2019)** Pharmacognostical Study of the Fruit Peels of *Punica granatum*. *Open Access Library Journal*, 6: e5687.
21. **Diallo A. (2005)**. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 99p.
22. **Diarra M N. (2003)**. Etude phytochimique d'une plante antipaludique : *Spilanthes oleracea*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 78p.
23. **Dossin AL (2019)** Produire des grenades en agriculture biologique en région Provence Alpes Côte d'Azur : fiche technique. Bio Provence – Filière Arboriculture. 12p.
24. **Douaouri NH (2018)**. Contribution à une étude phytothérapeutique, anti inflammatoire et antioxydante du grenadier (*Punica granatum* L.) – étude in vivo. Thèse doctorat en Plantes Médicinales et Phytothérapie. Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem. 159P
25. **Dowson A, Aten M. (1963)**. Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes". Collection F.A.O. Rome. 167p.
26. **Dukre TP, Sangale SS, Shelke AK (2022)** Review article: Pharmacognosy and pharmacological uses of *Punica protopunica*. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 7(7): 1678–1682.
27. **Dybka-Stępień K, Otlewska A, Gózdź P, Piotrowska M. (2021)**. The renaissance of plant mucilage in health promotion and industrial applications: A review. *Nutrients*. 13(10): 3354.
28. **Edeoga HO, Okwu DE, Edeoga BA (2005)** Phytochemical and pharmacological studies on the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2(2): 44-47.
29. **EL-Haoud H, Boufellous M, Berrani A, Tazougart H, Bengueddour R. (2018)**. Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. 7(4) : 226-233.
30. **Forkmann G, Heller W. (1999)**. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. In : *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol 1. Amsterdam : Elsevier. pp: 713-748.
31. **Fukumoto LR, Mazza G. (2000)**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3597–3604.
32. **Ghosh R, Singha PS, Das LK, Ghosh D, Firdaus SB. (2023)**. Anti-inflammatory activity of natural coumarin compounds from plants of the Indo-Gangetic plain. *Molecular Science*. 10 (2): 79–98.

Références bibliographiques

33. **Graça J (2015)** Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, 3 : 62. **Shilkina IA (1973)** On the xylem anatomy of the genus *Punica L.* *Botanicheskii Zhurnal*, 58: 1628–1630.
34. **Graham SA, Graham A (2014)** Ovary, fruit, and seed morphology of the Lythraceae. *International Journal of Plant Sciences*, 175(2) : 202–240.
35. **Guerrero-Solano JA, Jaramillo-Morales OA, Jiménez-Cabrera T, Urrutia-Hernández TA, Chehue-Romero A, Olvera-Hernández EG, Bautista M (2020)**. *Punica protopunica* Balf., the Forgotten Sister of the Common Pomegranate (*Punica granatum L.*): Features and Medicinal Properties—A Review. *Plants*, 9(9), 1214. <https://doi.org/10.3390/plants9091214>
36. **Halliwell B (2008)** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2) : 107–112.
37. **Hanelt P, Buttner R. (2001)** Encyclopédie des cultures agricoles et horticoles de Mansfeld. Springer, Berlin, New York, vol. 6v, 3645 p.
38. **Hassaine A (2020)**. Les hétérosides ou glucosides. Support pédagogique de la matière Biomolécules d'intérêts pharmaceutiques et cosmétiques Université Badji Mokhtar Annaba Algérie. 6p.
39. **HASSEN A (2022)**. Importance des propriétés physico-chimiques du sol et la nature du climat sur la valeur alimentaire de la grenade (fruit du grenadier - *Punica granatum*). Thèse de doctorat en biologie végétale Université Badji Mokhtar – Annaba. 118p
40. **Hikosaka K, Ishikawa K, Borjigidai A, Muller O, Onoda Y. (2006)**. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany*, 57(2):291-302.
41. **Hodel, R. G. J., Zimmer, E. A., & Wen, J. (2021)**. Wild plants and their conservation: linking genetic resources and ecosystem services. *Plants*, 10(8), 1663.
42. **Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I (2009)**. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, 35:127- 191.
43. **Hörtensteiner S. (2006)**. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 55–77. **Romani A, Ieri F, Turchetti B, Mulinacci N, Vincieri F, Buzzini P. (2006)**. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 41(2) : 20.
44. **Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R (2008)** Morphological and anatomical characteristics of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Pakistan Journal of Botany*, 40(6): 2403–2410.
45. **Iserin P. (2007)**. Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins ; 2ème édition, Ellipses, Paris. 335p.
46. **Jean-Louis D, Amos S. (2024)**, Other plant metabolites. In: *Pharmacognosy* (2nd ed.). Amsterdam: Elsevier. pp: 295-309.
47. **Jokiæ S, Veliaë D, Biliaë M, Buciaë-Kojiaë AM, Plan I, Tomas S. (2010)**. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* 28 : 206-212.
48. **Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2008)** *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, (3^e édition pp. 410–416). Chapitre sur les Myrtales – Lythraceae (famille contiguë à Combretaceae et Onagraceae). Sunderland, MA: Sinauer Associates. (Tot. 611 pp.)

Références bibliographiques

49. **Judith MD. (2005).** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. 135p.
50. **Kaci-Meziane, Z., Boutakrabt, L., Laidoudi, D., Moussaoui, T., Melahi, N., Ait Ouarab, D., Djeghboub, M., & Meguetaoui, A. (2017).** Évaluation phytochimique, et potentiel antioxydant, antibactérien de trois cultivars de fruit de grenadier *Punica granatum* L. du Nord Est d'Algérie. *Revue Agrobiologia*, 7(2), 589-602.
51. **Kim D, Chun O, Kim Y, Moon H, Lee C. (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(22) : 6509-6515.
52. **Kim H U. (2020).** Plant lipids: Metabolism, biosynthesis and industrial applications. *Plant Biotechnology Reports*. 14(4): 345-348.
53. **Koffi E, Sea T, Dodehe Y, Soro S. (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.* 5 :550-558.
54. **Lahsissene, H., Kahouadji, A., Hseini, S., & Tijane, M. (2009).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Rabat (Maroc). *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 148, 7–20.
55. **Levin GM (2006)** Pomegranate roads: a Soviet botanist's exile from Eden /Gregory Moiseyevich Levin; translated from the Russian by Margaret Hopstein; edited by Barbara L. Baer. 181p
56. **Levin GM (2006).** Pomegranate roads: A Soviet botanist's exile from Eden. Floreant Press. Forestville, Californie, États-Unis. 183p
57. **Li Z, Ahammed GJ. (2023).** Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review. *Plant Stress*. 10: 100230.
58. **Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP (2008)** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8) : 1732–1738.
59. **Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*.; 69 (8):1732-1738.
60. **Lozano L. (2006).** Chemical Composition of Fruits and its Technical Importance, In: *Fruit Manufacturing*, (eds.), 133-161
61. **Mars M (2000)** Pomegranate (*Punica granatum* L.) genetic resources: Conservation and use. In *Report of a Working Group on Minor Fruit and Berries* (pp. 81–88). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Séminaires Méditerranéens 42:55–62
62. **Mbaveng AT, Hamm R, Kuete V. (2014).** Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants. In: *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Amsterdam: Elsevier. pp: 557-576.
63. **Metcalf CR, et Chalk L (2004)** Anatomy of the dicotyledons (2nd ed., Vol. 1). Oxford University Press. 243-245
64. **Milla, R., Osborne, C. P., Turcotte, M. M., Violle, C., Violle, C., & Alonso-Blanco, C. (2021).** Plant domestication through an ecological lens. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(4), 292–304.
65. **Milošević M, Vulić J, Kukrić Z, Lazić B, Četojević-Simin D, Čanadanović-Brunet J. (2023).** Polyphenolic composition, antioxidant and antiproliferative

Références bibliographiques

- activity of edible and inedible parts of cultivated and wild pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Technology and Biotechnology*. 61(4): 433-444.
66. **Morton JF (1987)** *Fruits of warm climates*. Creative Resource Systems, Inc. pp: 352–355.
 67. **Morton JF (1987)** *Fruits of warm climates*. Miami, FL: Florida Flair Books. North Fort Myers, Floride (FL 33917), États-Unis. 1135p.
 68. **Moufid A, Eddouks M (2012)**. Pharmacological effects of pomegranate (*Punica granatum*) on metabolic syndrome components. *Phytotherapy Research*, 26(4) : 429-436.
 69. **Nawaz H, Janbaz KH, Saeed SA (2022)** Comparative evaluation of proximate composition and biological activities of peel extracts of three commonly consumed fruits. *Food Science and Technology (Campinas)*. 42: e61021.
 70. **Ouédraogo S, Traoré S, Sombié B C, Traoré T K, Nitiéma M, Belemnaba L, Ouédraogo N, Tiendrébéogo A, LOMPO M, Ouédraogo S, Semdé R, Guissou I P. (2018)**. *Science et technique, Sciences de la santé*. 41 (2) : 93-101.
 71. **Özcan M, Yilmaz S (2020)** Foliar Micromorphology and Anatomy of Five Mediterranean Enclaves in Artvin (Turkey). *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 20(2):107-132.
 72. **Pande G, Akoh CC (2016)** Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Chapter 26, pp : 667-689.
 73. **Pharmacopée européenne. (2002)**. 4^{ème} édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 2060
 74. **Pharmacopée européenne. (2005)**. Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 3343 p.
 75. **Pharmacopée URSS. (1991)**. Tome II. 11ème édition. Moscou. 250p.
 76. **Plassard C, Mousain D, Salsac L. (2011)**. Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: évaluation de la masse mycelienne et de la mycorhization. *Canadian Journal of Botany*.691-669
 77. **Pourcel L, Routaboul J-M, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. (2007)**. Flavonoid Oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trend Plant Sci*. 12(1) : 29-36.
 78. **Rajaei H, Yazdanpanah P (2015)** Buds and leaves in pomegranate (*Punica granatum* L.): Phenology and anatomy. *Flora*, 214 : 61–69. 69
 79. Rawat JMS, Tomar YK, Rawat SS (2012) Characterization of wild pomegranate (*Punica protopunica* L.) of Garhwal Himalaya. *Progressive Horticulture*.
 80. **Ribereau P. (1968)**. Les composés phénoliques des végétaux. Ed: Gayon Dunod. Paris. 254p.
 81. **Safer S. (2018)**. Teneur en polyphénols, tannins et flavonoïdes et capacité antioxydante d'extrait méthanolique d'une plante. Mémoire de Master en Chimie. Université Abdelhamid ibn badis - Mostaganem. Algérie. 32p.
 82. **Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013)**. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanolic extract of *Punica granatum* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7), 2451–2456.
 83. **Senhaji O, Nemattalab S, Boudabous A (2005)** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9(4): 247-253.
 84. **Shahsavari S, Noormohammadi Z, Sheidai M, Farahani F, Vazifeshenas MR (2021)** Genetic structure, clonality and diversity in commercial pomegranate

Références bibliographiques

- (*Punica granatum* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(8): 2943–2957.
85. **Shi J, Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G., & Jiang, Y. (2004).** Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *J Med Food*. 7(1): 67-78.
 86. **Singh A, Sharma A (2023)** A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmacological properties of plant metabolites. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 32(1): 15–30.
 87. **Singleton VL, Rossi JA. (1965).** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3): 144-158.
 88. **Sinjare A, Abdulrahman A (2025)** Molecular characterization and cuticular stomatal anatomy of *Punica granatum* L. *Journal of Plant Sciences*, 15(2): 123–135.
 89. **Smith AM, Zeeman SC (2006)** Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols*, 1(3): 1342–1345.
 90. **Smith AM, Zeeman SC. (2006).** Quantification of starch in plants tissus. *Nature Protocols*. 1: 1342-1345.
 91. **Solovchenko A. (2010).** Photoprotection in Plants: Optical Screening-Based Mechanisms; Edition Springer Science & Business Media. Berlin. Almagne. 168p.
 92. **Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat-Hug M, Jeanmonod D, Perret M. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, 3^e édition revue et corrigée. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (Lausanne), avec la collaboration de M. Perret. 413p.
 93. **Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2015)** *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Associates, CT 8 (5)
 94. **Togola A. (2002).** Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia* Schmach. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali.100p
 95. **Touati L, Hamel T, Meddad-Hamza A, Bélaïr G. (2021).** Analysis of rare and endemic flora in northeastern Algeria: the case of the wilaya of Souk Ahras. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 90, 213–240.
 96. **Vercauteren J, Chèze C, Triaud J. (1998).** Polyphenols 96: 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18, 1996. Editions Quae.
 97. **Vriet C, Russinova E, Reuzeau C. (2012).** Boosting crop yields with plant steroids. *The Plant Cell*. 24(3): 842-857.
 98. **Wald E (2009)** Le grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. These d doctorat en sciences pharmaceutiques. University Henri Poincare - Nancy 1. France. 159p.
 99. **Wang H, Dixon RA (2022)** On lignin variation in plants: A review of mechanisms and relevance to growth and stress. *Plant Physiology*, 189(1): 5–18.
 100. **Wang Q, Zhao X, Jiang Y, Jin B, Wang L. (2023).** Functions of representative terpenoids and their biosynthesis mechanisms in medicinal plants. *Biomolecules*. 13(12): 1725.
 101. **Yermakov AI, Arasimov V, Yarosh NP (2004).** Methods of biochemical analysis of plants. Agropromizdat. Leningrad. In: Miliuskasa G, Venskutonis PR,

Références bibliographiques

- Van Beek TA. 1987. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*. 85 : 231-237.
102. **Youssef M, Alhammadi AS, Ramírez-Prado JH, Sánchez-Teyer LF, Escobedo-GraciaMedrano RM (2018)** Remarks on genetic diversity and relationship of *Punica protopunica* and *P. granatum* assessed by molecular analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(3) : 577–590.
103. **Zaouay F, Mena P, Garcia-Viguera C, Mars M. (2012)** Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, *Industrial Crops and Products*. 40: 81-89.
104. **Zohary D, Hopf M (2000)**. Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley (3rd ed.). Oxford University Press. Oxford, 316.

Références électroniques :

1. **Bernard C. (2020)**. Mucilages : définition, propriétés et plantes riches en mucilages. AlthéaProvence. Disponible sur : <https://www.altheaprovence.com/mucilages/>.
2. **Bouvet E, Michel S. (2023)**. Alcaloïdes : entre vertus thérapeutiques et risques toxiques. Doctissimo. Disponible sur : https://www.doctissimo.fr/medicaments/tout-sur-les-medicaments/alcaloïdes-entre-vertus-therapeutiques-et-risques-toxiques/1104b9_ar.html.
3. **Doukani K, Chahda K, Tabak S, Bouhenni H. (2018)**. Profil phytochimique et activité anti *Helicobacter pylori* de la grenade (*Punica granatum* L.) (fruit et écorce) dans la région de Tiaret. *Algerian Journal of Natural Products*, 6(1), 618-629. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2556414>
4. <https://www.dreamstime.com/photos-images/punica-protopunica.html>
5. https://www.shutterstock.com/fr/search/feuilles-de-punica-protopunica?image_type=photo
6. **Jaume St.Hil. (2025)**. Plantes et botanique : Famille Lythraceae. Disponible sur : https://www.plantes-botanique.org/famille_lythraceae.
7. **Le Dem H. (2023)**. Rôle des protéines. Walter Learning. Disponible sur : <https://walter-learning.com/blog/restauration/dietetique/role-des-proteines>.
8. **Stevens PF (2001)**. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [et mises à jour continues]. Récupéré le 20 avril 2025, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
9. **Wu S, Chen Y, Hao C, Liu K, Zhang W, Zhang L. (2022)**. Promoting biodiversity conservation requires a better understanding of the relationships between ecosystem services and multiple biodiversity dimensions. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 891627. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.891627>
10. **York L. (2021)**. Manage belowground starch for healthy pastures. Hay & Forage Grower. Disponible sur : <https://hayandforage.com/article-3469-Manage-belowground-starch-for-healthy-pastures.html>

Annexes

Annexe A

A.1. La verrerie utilisée au laboratoire



Bécher



Erlenmeyer



Entonnoir



Tube à essai



Fiole



Mortier

Annexes

Annexe A

A.2. Instruments et consommables utilisés au laboratoire



Pince



Pipette



Spatule métallique



Pissette



Micropipette



Papier filtre



Cuve en plastique



Boîte stérile



Boîte de pétri



Portoir

Annexes

Annexe A

A.3. Appareillages utilisés au laboratoire



pH mètre



Plaque chauffante



Agitateur vortex



Etuve de séchage



Spectrophotomètre UV visible



Loupe binoculaire



Balance analytique



Microscope optique

Annexes

Annexe A

A.4. Liste des produits chimiques et réactifs utilisés :

1	Acétate de sodium ($C_2H_3NaO_2$)
2	Acide acétique (CH_3COOH)
3	Acide chlorhydrique (HCl)
4	Ammoniaque (NH_4OH)
5	Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
6	Chloroforme ($CHCl_3$)
7	DPPH
8	Ethanol (C_2H_6O)
9	Ether (C_2H_5) ₂ O
10	Formaldéhyde (CH_2O)
11	Hydroxyde de potassium (KOH)
12	Hydroxyde de sodium (NaOH)
13	Iode (I ₂)
14	Iodure de potassium (KI)
15	Magnésium (Mg)
16	Nitrite de sodium ($NaNO_2$)
17	Propanol
18	Réactif de dragendorff
19	Réactif Fehling
20	Réactif Folin-Ciocalteu
21	Sulfate de cuivre ($CuSO_4$)
22	Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$)
23	Trichlorure de fer ($FeCl_3$)
24	Vitamine C

Annexe B

Préparation des deux colorants utilisés pour la coloration des coupes destinées à L'observation microscopique

1. Vert de méthyle :

Mélanger bien 100 ml d'eau distillée et 5 g de vert de méthyle et ajouter 1 ml d'acide acétique glacial, puis les mettre dans un flacon sombre bien fermé, son utilisation est possible après 24h de sa préparation.

2. Rouge Congo :

Mélanger bien 1 g de rouge Congo et ajouter 99 ml d'ammoniaque, et les mettre dans un flacon sombre bien fermé, son utilisation est possible après 24h de sa préparation.

Annexes

Annexe C

Préparation du réactif de Stiasny utilisés dans la caractérisation phytochimique

Réactifs	Préparation	Référence
Réactif de Stiasny	Dissoudre 40 g de formaldéhyde dans 100 ml eau distillée. Ajouter un volume égal d'acide chlorhydrique 1 N pour avoir une solution de formol chlorhydrique.	(Iserin, 2007)

Annexes

Annexe D

D.1. Résultats de l'étude physico-chimique



pH des feuilles



pH de jus

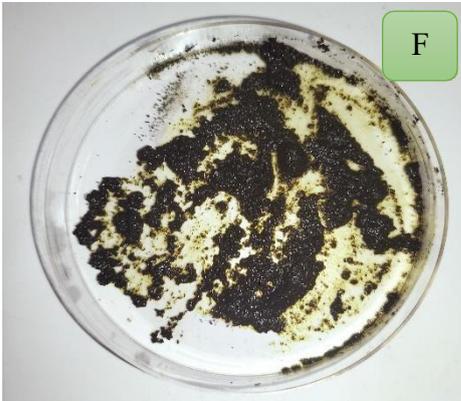


pH des épicarpes

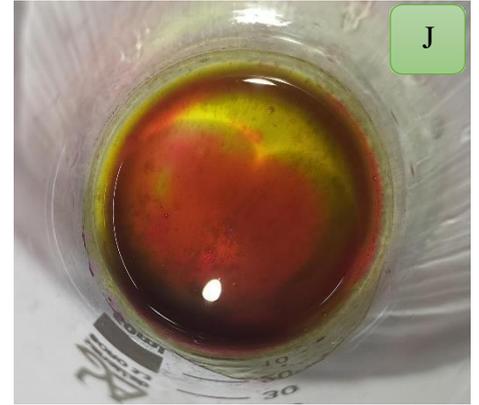
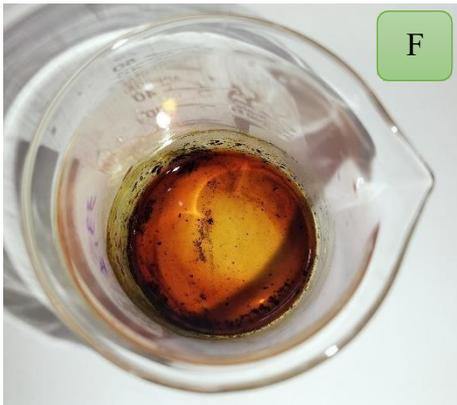
Annexes

Annexe D

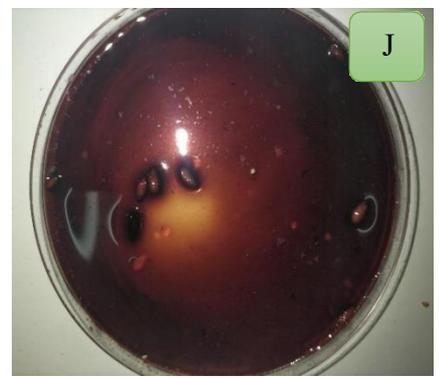
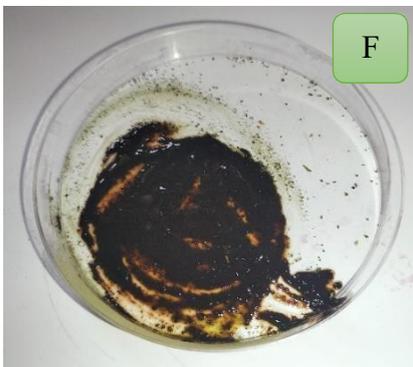
D.2. Résultats du screening phytochimique



Recherche de l'amidon



Recherche des sucres réducteurs

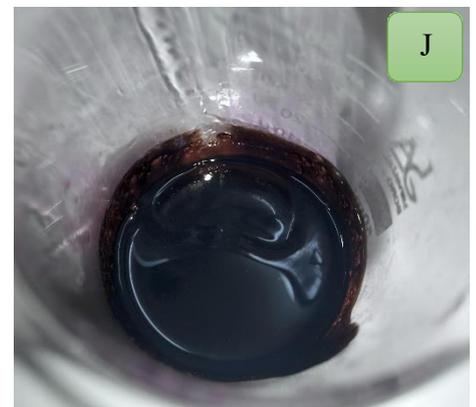
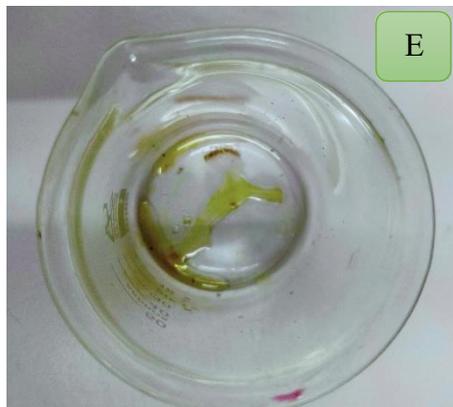
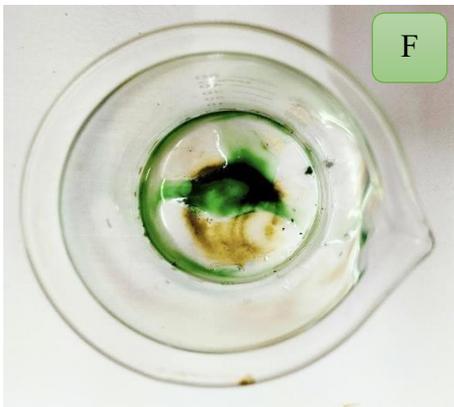


Recherche des glucosides

Annexes



Recherche des protéines



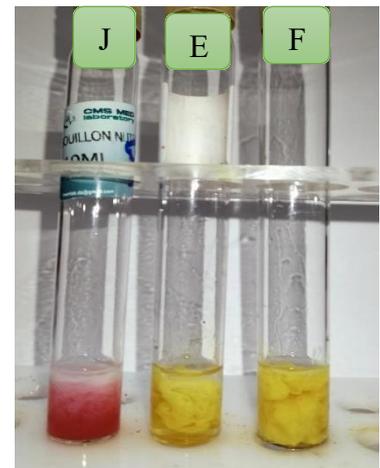
Recherche des lipides



Recherche des alcaloïdes

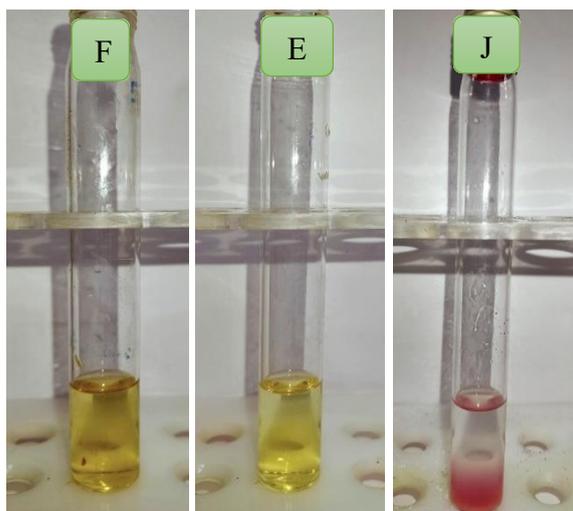


Recherche des saponines



Recherche des saponosides

Annexes



Recherche des mucilages



Recherche des Dérivés anthracéniques libres



Recherche des terpénoïdes



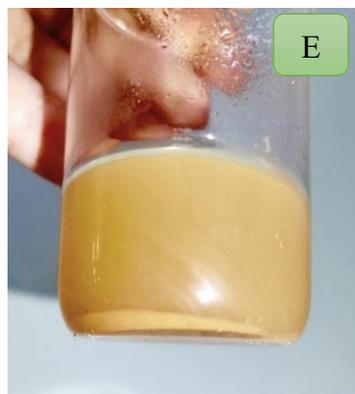
Recherche des stéroïdes



Recherche des coumarines

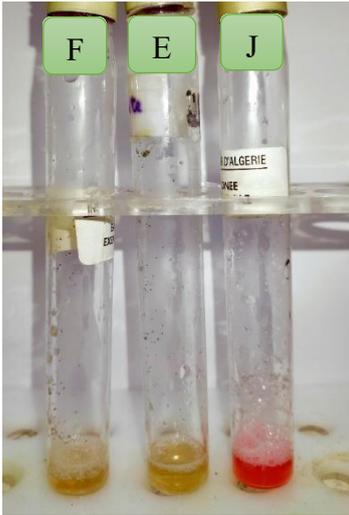


Recherche les tanins galliques

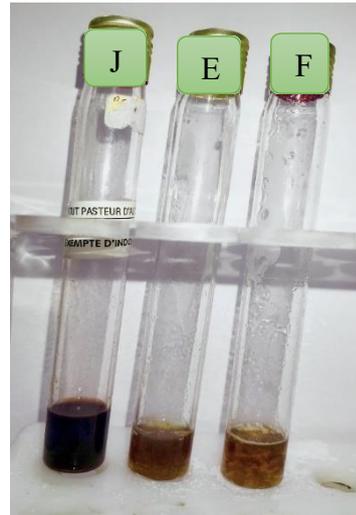


Recherche des tanins cathéchiques

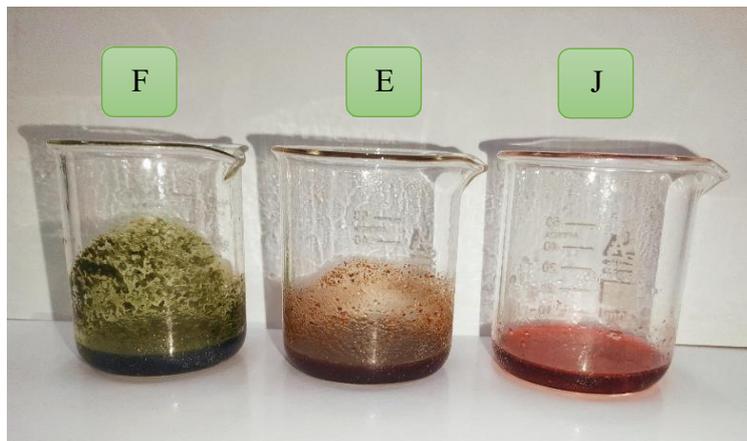
Annexes



Recherche des flavonoïdes



Recherche des anthocyanes



Recherche des leuco-anthocyanes

Annexes

Annexe E

E.1. Les répétitions des dosages biochimiques

Dosages	Echantillons analysés	Absorbance	Concentration	La moyenne
Dosage des polyphénols totaux (Dilué 5 fois)	Extrait éthanolique des feuilles	1,2939	5185	5180
		1,2870	5158,75	
		1,2960	5196,25	
	Extrait éthanolique des épicarpes	1,1696	4669,55	4767,51
		1,1549	4608	
		1,2550	5025	
	Extrait éthanolique de jus	1,9740	8021,25	7496
		1,8268	7407,5	
		1,7437	7060	
Dosage des flavonoïdes totaux	Extrait éthanolique des feuilles	0,3171	93,16	100,66
		0,3267	101,16	
		0,3345	107,66	
	Extrait éthanolique des épicarpes	0,3274	101,75	94,61
		0,3041	82,33	
		0,3250	99,75	
	Extrait éthanolique de jus	0,2983	77,5	83,83
		0,2950	74,75	
		0,3244	99,25	
Dosage des flavonols (Dilué 3 fois)	Extrait éthanolique des feuilles	0,7744	739,8	808,4
		0,8190	768,9	
		1,0457	916,5	
	Extrait éthanolique des épicarpes	1,5365	1236,84	1237,56
		1,5403	1239	
		1,5365	1236,84	
	Extrait éthanolique de jus	0,0983	298,89	303,83
		0,0950	296,7	
		0,1244	315,9	
Dosage des pigments photosynthétiques	Extrait des feuilles (A663)	0,4583	/	/
		0,4591		
		0,4600		
	Extrait des feuilles (A645)	0,3309		
		0,2911		
		0,2356		

Annexes

Annexe E

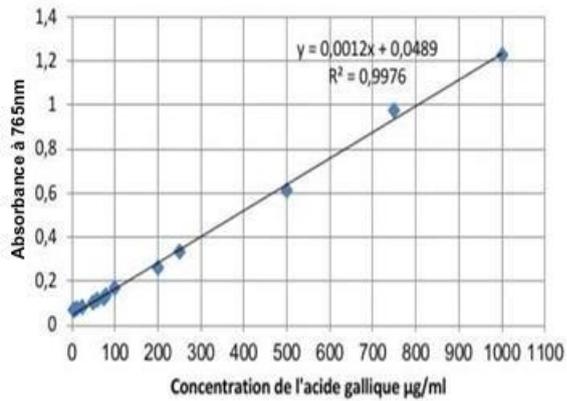
E.2. Les DO des différentes dilutions préparées à partir des extraits analysés

Les concentrations		Les DO
Extrait éthanolique des feuilles (EEF)	0,2 mg/ml	0,3438
	0,4 mg/ml	0,3634
	0,6 mg/ml	0,4338
Extrait éthanolique des épicarpes (EEE)	0,2 mg/ml	0,2764
	0,4 mg/ml	0,2667
	0,6 mg/ml	0,2444
Extrait éthanolique des jus des arilles (EEJA)	0,2 mg/ml	0,0770
	0,4 mg/ml	0,0737
	0,6 mg/ml	0,0652
Contrôle positif (Solution éthanolique d'acide ascorbique)	0,2 mg/ml	0,0497
	0,4 mg/ml	0,0370
	0,6 mg/ml	0,0322

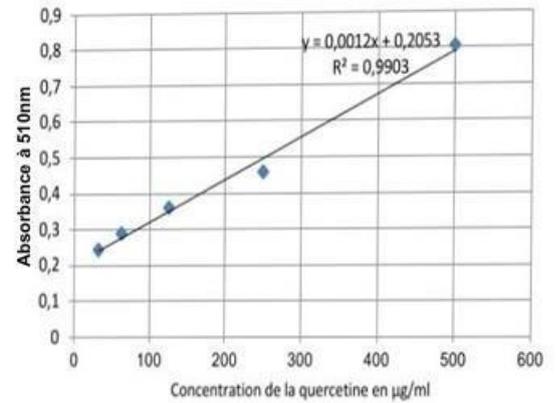
Annexes

Annexe F

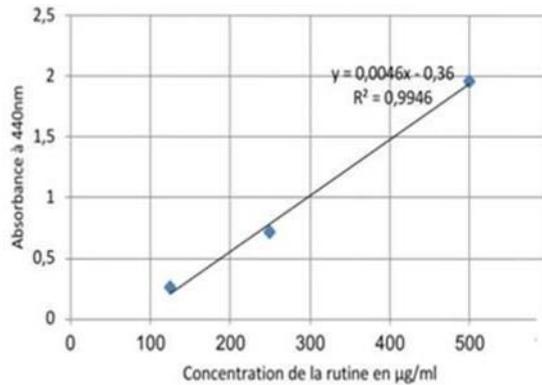
Les courbes d'étalonnage utilisées



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



Courbe d'étalonnage de la quercétine.



Courbe d'étalonnage de la rutine.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البلدية (1)
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biodiversité et Physiologie Végétale

Thème

Caractérisation phytochimique et biochimique des feuilles et des fruits du grenadier sauvage (*Punica protopunica* Balf.)

Présenté par :

Soutenu le : 01/07/2025

- Fkair Imene
- Mekhaneg Lina

Devant le jury :

Nom	Grade/Lieu	Qualité
Mme Melouani N.	MAA /USDB1	Présidente
Mme Kadir N.	MAB/USDB1	Examinatrice
Mme Touaibia M.	MCA/USDB1	Promotrice

Année universitaire : 2024/2025