

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Blida 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie des Populations des Organismes**  
**Mémoire de Fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de**  
**Master en Biologie**

**Option : Phytothérapie et Santé**

**THEME**

**Etude phytochimique et évaluation de quelques activités  
biologiques de l'écorce du fruit de Grenadier**

**(*Punicagranatum L.*)**

**Présenté par :**

**Mlle : Aissabrahim Amel**

**Date de Soutenance : 20/09 /2017**

**Mlle : Moucer Yasmine**

**Devant le jury composé de :**

---

<b>Mme Amara N</b>	<b>MAA</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme Takarli S</b>	<b>MAA</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Chérif H. S</b>	<b>MCB</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mme Douaouri N.H</b>	<b>Doctorante</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Co-Promotrice</b>

---

**Promotions 2016 /2017**

# Remerciements

*En premier lieu nous remercions **DIEU « ALLAH »** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la force de réaliser ce projet de fin d'étude. Nous tenons tout d'abord à exprimer nos profonds remerciements à notre promotrice **Mme Cherif H.S** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Dans un deuxième temps, nous remercions notre Co-promotrice **Mme Douaouri N-H.** qui a bien voulu nous encadrer et nous aider par ces conseils pendant ce projet.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme Amara N.** d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à remercier **Mme TEKARLI S.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire d'analyses physico-chimiques du groupe SAIDAL. Nous remercions tous nos collègues et amis, pour les conseils, les services et plus particulièrement pour l'amitié qu'ils nous ont témoignés. Nous vous souhaitons à tous bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.*

*En terminant, nous souhaitons exprimer notre grande gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin et plus particulièrement à nos familles à la réalisation de ce projet.*

## Merci à tous

## *Dédicace*

*Nous dédions ce travail à :*

*Ceux qui sont les plus chers au monde, Nos parents, auxquels nous n'arriverons jamais à exprimer suffisamment notre gratitude et notre reconnaissance, pour leurs amours, leurs soutiens tout au long de nos études afin qu'on puisse atteindre ce stade.*

*Que DIEU les protège toujours.*

*A nos frères et nos sœurs.*

*A nos camarades et nos amis.*

*A nos oncles.*

*A toute la famille.*

*A tous les étudiants du Master II Phytothérapie et Santé*

*A tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

*Amel et Yasmine*

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Souches bactériennes utilisées.....	16
<b>Tableau II</b> : Appareillage, Verreries et Réactifs.....	Annexe I
<b>Tableau III</b> : Répartition des lots de l'activité anti-inflammatoire de <i>Punicagranatum</i> L.....	24
<b>Tableau IV</b> : Taux d'humidité de la poudre de <i>Punicagranatum</i> L.....	31
<b>Tableau V</b> : Résultats du test phytochimique de <i>Punicagranatum</i> L.....	32
<b>Tableau VI</b> : Résultats de l'activité antioxydante par la méthode DPPH vis à vis les différentes concentrations de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Punicagranatum</i> L. et la vitamine C.....	Annexe II
<b>Tableau VII</b> : Activité antioxydante de l'extrait aqueux de <i>Punicagranatum</i> L. vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH exprimée par la valeur d'IC50.....	35
<b>Tableau VIII</b> : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait aqueux et de la vitamine C dans le mélange du test FRAP.....	36
<b>Tableau IX</b> : Evolution moyenne des pattes postérieures gauches des souris de chaque lot. .....	Annexe II
<b>Tableau X</b> : Test anti-inflammatoire pour les trois lots testé (témoin, référence, extrait aqueux) .....	Annexe II
<b>Tableau XI</b> : Activité antispasmodique de l'extrait aqueux de <i>Punicagranatum</i> L.....	39
<b>Tableau XII</b> : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes testés vis-à-vis des différentes concentrations de l'extrait aqueux de <i>Punicagranatum</i> L .....	41

## Liste des figures

<b>Figure 01.</b> Aspect général du fruit de <i>Punicagranatum L.</i> .....	09
<b>Figure 02 :</b> Lot de souris <i>Albinos</i> , de souche <i>Swissrace NMRI</i> .....	Annexe I
<b>Figure 03 :</b> Infusion de l'écorce de grenadier.....	Annexe I
<b>Figure 04 :</b> Forme libre et réduite du radical DPPH.....	21
<b>Figure 05 :</b> Préparation des solutions d'activité anti oxydante.....	Annexe I
<b>Figure 06 :</b> Lecture avec un spectrophotomètre .....	Annexe I
<b>Figure 07 :</b> Injection de lacarraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire Des pattes Postérieures gauches des souris.....	25
<b>Figure 08 :</b> Coupure de pattes postérieures à hauteur de l'articulation.....	25
<b>Figure 09 :</b> Pesage des pattes droites et gauches sur d'une Balance analytique.....	26
<b>Figure 10 :</b> Mise à jeun des souris pendant 16h.....	28
<b>Figure 11 :</b> Administration des solutions préparées par voie orale.....	28
<b>Figure 12 :</b> Injection de l'acide acétique par voie intra parentérale.....	28
<b>Figure 13 :</b> Comptage du nombre de spasme.....	28
<b>Figure 14 :</b> Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH par l'extrait aqueux de <i>Punica granatum L.</i> et La vitamine C.....	34
<b>Figure 15 :</b> Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et du contrôle positif (Vit C) testé par la Méthode FRAP.....	37
<b>Figure 16 :</b> Histogramme représentant les pourcentages d'augmentation et de réduction de L'œdème pour les quatre lots traités : Lot témoin, lot de référence, lots d'essais.....	38
<b>Figure 17 :</b> Moyenne du nombre de crampes pour chaque lot pendant 10 minutes.....	40
<b>Figure 18 :</b> pourcentage de protection de la douleur pour chaque lot.....	40
<b>Figure 19 :</b> Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait de L'écorce du fruit de <i>Punicagranatum L.</i> .....	Annexe II

## Résumé

La présente étude contribue à la valorisation d'une plante médicinale appartenant à la famille des Lythracées, « *Punicagranatum* L. ». Le travail consiste en la caractérisation phytochimique de l'extrait aqueux de l'écorce du fruit et l'évaluation des activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-spasmodiques.

Le criblage phytochimique réalisé sur l'infusé de l'écorce du fruit de grenadier, a révélé la présence des plusieurs métabolites secondaires telle que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins.

L'évaluation in vitro de l'activité anti-oxydante réalisée par deux méthodes : piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP de l'extrait aqueux d'écorce de *Punicagranatum* L. a montré que ce dernier est doté d'un pouvoir antioxydant important par rapport à l'acide ascorbique.

Les effets anti inflammatoires et antispasmodiques ont montré que l'administration orale de l'extrait aqueux de *Punicagranatum* L. à une dose de 500mg/ml induit d'une part, la réduction du pourcentage d'œdème de (42.83%) et d'autre part, un pourcentage de protection de (38.78%).

En outre, le test antimicrobien a révélé la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de l'extrait testé. Les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) sont les plus sensibles avec des diamètres des zones d'inhibition importants (26-18mm, respectivement) par rapport aux bactéries Gram- (*E.coli*, 15 mm). L'extrait aqueux a révélé un effet antifongique important vis-à-vis de *candida albicans* (31mm) et *Aspergillus brasiliensis* (21mm).

**Mots clés :** *Punicagranatum* L., extrait aqueux, criblage phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antispasmodiques.

## Abstract

The present study contributes to the valorisation of medicinal plants, belonging to the Lythraceae family «*punicagranatum* L. ». This work consists in the phytochemical characterization of fruit's bark of the aqueous extract and the evaluation of antioxidants, antimicrobial, anti-inflammatory and spasmodic activities.

The phytochemical screening is realized by the infusion of Grenadier fruit's bark, revealed with the presence of several and secondary metabolites such as flavonoids, alkaloids and tannins

In vitro evaluation, the antioxidant activity is realized through two methods: trapping of radical free DPPH and the reducing of iron FRAP, which is found in the bark of aqueous extract in aqueous extract of *Punicagranatum* L.'s bark. It showed that this latter had an important antioxidant power in relation with ascorbic acid.

The anti-inflammatory and antispasmodic effects in the oral administration had shown that the aqueous' extract of *Punicagranatum* L. at a dose of (500 mg/ ml) induced in one part a reduction in percentage of edema (42.83%) and in another part a protection in percentage (38.78%).

In addition, the antimicrobial test revealed the sensitivity of the microbial strains to the extract tested. Gram + bacteria (*staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) are the most sensitive with large inhibition zone diameters (26-18mm), respectively compared to Gram- (*E. coli*, 15mm) bacteria. The aqueous extract revealed an important antifungal effect against *candida albicans* (31) and *Aspergillus brasiliensis* (21mm).

**Key words:** *Punicagranatum* L., aqueous extract, phytochemical screening, antioxidant activities, antimicrobial, anti-inflammatory, antispasmodic.

## ملخص

تساهم هذه الدراسة في تبيين نبات طبي ينتمي إلى عائلة Lythracées (*Punicagranatum L.*), يقوم هذا العمل على المواصفات الكيميائية النباتية للمستخلص المائي للحاء الفاكهة وتقييم مضادات الأكسدة مضادات الالتهابات ومضادات التشنجات ومضادات الميكروبات.

تحقق الفحص الكيميائي النباتي الذي تم إجراؤه على الحاء المغمور لثمرة الرمان عن وجود عدة عمليات الأيض الثانوية مثل Flavonoïdes, alcaloïdes, tanins .

أظهر التقييم المخبري للنشاط المضاد للأكسدة الذي أقيم بمي طريقتين هما Dpph و Frape الذي يوجد في المستخلص المائي من لحاء الرمان هذا الأخير أظهر قوة هامة لمضادة الأكسدة مقارنة مع حمض الاسكوربيك.

أظهرت الآثار المضادة للالتهابات ومضادات التشنج أن تناول المستخلص المائي للرمان عن طريق الفم بجرعة 500ملغ/مل. تساهم من جهة في انخفاض الوزن بنسبة 42.83 ومن ناحية أخرى نسبة حماية بلغت 38.78 بالإضافة إلى ذلك كشف اختبار مضادات الميكروبات حساسية السلالات الميكروبية بالنسبة للمستخلص المدروس إن الكتيريا ذوات غرام (+) (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*) 18-26مم على التوالي هي الأكثر حساسية مع مناطق واسعة من تثبيط مقارنة مع البكتيريا غرام (-) (*E. coli*, 15مم). كشف المستخلص المائي تأثير مضاد للفطريات مهمضد (*candida albicans* 31مم) و

(*Aspergillus brasiliensis*) 21مم

:الكلمات المفتاحية

*Punicagranatum L.*

مستخلص مائي. فحص نباتي. أنشطة مضادات الأكسدة. مضادات الميكروبات. مضاد الالتهابات. مضاد التشنج



## Table de matière

Introduction.....	01
-------------------	----

### **Chapitre I : Rappels bibliographiques**

I.1. Phytothérapie.....	02
I.1.3. Types de phytothérapie.....	03
I.1.4. La place de la phytothérapie.....	03
I.2. Plantes médicinales.....	05
I.2.1. Définition des plantes médicinales.....	05
I.2.2. Principaux composés actifs des plantes.....	05
I.2.3. Pouvoir des plantes médicinales.....	06
I.3. Plante étudiée.....	07
I.3.1. Historique.....	07
I.3.2. Description botanique de grenadier.....	07
I.3.4. classification.....	10
I.3.6. Composition chimique des différents organes du grenadier... ..	11
I.3.7 Activités thérapeutiques de <i>Punicagranatum</i> L.....	13

### **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

II.1. Matériel.....	16
II.1.1. Matériel biologique.....	16
II.1.1.1. Matériel végétal.....	16
II.1.1.2. Matériels Animal.....	16
II.1.1.3. Microorganismes étudiées.....	17
II.1.2. Matériel non biologique.....	17

II.2. Méthodes.....	18
II.2.1. Etude phytochimique.....	18
II.2.2. Préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de <i>Punicagranatum</i> L.....	22
II.2.3. Evaluation des activités biologiques.....	23

### **Chapitre III : Résultats et Discussion**

III.1. Résultats de l'étude phytochimique.....	31
III.1.1 Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale.....	31
III.1.4 Screening phytochimique.....	31
III.2. Evaluation des activités biologiques.....	33
III.2.1. Activité antioxydante.....	33
III.2.2. Résultat de l'activité anti-inflammatoire .....	36
III.2.3. Résultats de l'activité antispasmodique.....	39
III.2.4. Résultat de l'activité antimicrobienne .....	41
Conclusion.....	44

Références bibliographiques

Annexes

## Références bibliographiques :

**Afaq F., Saleem M., Krueger CG., Reed JD., et Mukhtar H., (2005).** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- $\kappa$ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice .J. Cancer .113(3), p 433. pp 423-33.

**Al –Said F.A., Opara L.U., Al-Yahia R.A .,(2009).** Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars ( *Punicagranatum L.*) grown in the sultanate of Oman .j. Food Eng ,pp 129-134.

**Al-Zoreky N.S. (2009).** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*) fruit peels. International Journal of Food Microbiology; 134 : pp244–248.

**APGIII .,(2009) :** Tela botanica *Punicagranatum L.* et Flor, la Flore électronique de telabotanica ,BDTFX V.3.00 .

**Bellakhdar J .,(2006) .** « Plantes médicinales au Magareb et soins de base » (Précis de phytothérapie moderne )..Edition : Le Fennec . Maroc .p 385.

**Benhouhou S., (2015).** “A brief overview on the historical use of medicinal plants in Algeria,. Consulté:03/04/2017.

[http://www.uicnmed.org/nabp/web/documents/med\\_plant/overview.html](http://www.uicnmed.org/nabp/web/documents/med_plant/overview.html)

**Benoit B.,( 2013).** Tela Botanica : Base de données Nomenclature de la flore en France. BDNFF, pp 4.

**Blois, M.S., (1958)** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 181, 1199-1200.<http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.

**Boudraa H.,(2015).** Présence of aflatoxin in raw, reconstituted ,and powdered milk samples collected in Algéria. Frech National institute for Agricultural Recherch .Paris.p375.

**Bougandoura N., Bendimerad N., (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. (9): 15p

**Boussetta T., Raad H., Letteron P., Gougerot-Pocidal M.A., Marie J.C., (2009).** Punicic acid, a conjugated linolenic acid, inhibits TNF-induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *J. Plos one* 4(7) p6458.

**Bridel F., Bailly C., Dion N., Patiny A., Guimarães O., Geirnaert E., (2004).** Guide visual des espèces. ABCorpus. GNU F.D.L. 85.

**Butler MS., (2004).** The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. Volume( 67), p 2141 – 2153.

**Calin S. A., Carboneli B. A., (2005).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine antioxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les aliments fonctionnelle du fruit. Livre. *Natural ontioxydant granatum+* et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, pp 77.

**Catier O., Roux D., (2004).** « Botanique, pharmacognosie, phytothérapie » : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3eme ed. France : Wolters Kluwer, pp111-114.

**Chebaibi A., Rgazi F., (2013)** .(Bactericidal activity and phytochemical scening of Moroccan pomergnate (*punicagranatum* L) peel aqueousextracts *J of Medicinal Plants Research* .p 891.

**Chevallier A., (2007).** « Les plantes médicinales », ed : grund pour l'édition Francaise, WWW.grund.fr-60 rue mazarine – 75006 paris, Isbn 978-2-324-00318.

**Choi J.G., Kang O.H., Lee Y.S, Chae H.s ., (2009).** In vitro and in vivo antibacterial activity of *Punicagranatum* L. peels ethanol extract against salmonella. *Evid Based Compl Alter Med* 17, pp 1-8.

**Cuendet, M., Hostetmann, K., Potterat, O., (1997).** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, 80, pp 1144-1152.

**Curtay, J.P., Jacob, L., Jung, R.R., & Kaplan, M.(2008).** Jus de grenade fermenté, la grenade, “aliment-plus” un nouvel outil puissamment cardiovasculaire et anti-cancer dans l’arsenal de la nutrithérapie. Macro pietteur (EDS), Paris, p73.

**Dheeshs.,S, Vijayalakshmi.,N.R. (2005).**Flavonoied from PunicagranatumL.Potential and antiperoxidat agents .Fitoterapia.N°76. pp181.

**Diarra M.N., (2003).** Etude phytochimique d’une plante antipaludique : Spilanthesoleracea. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. pp78.

**Encyclopédie visuelle des aliment , grenade .(1996).**Edition :Quibec .P 250.

**Evreinoff VA., (1957).** Le grenadier. Fruits d’outre-Mer. 4 (5) ,pp 161-170.

**Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010).**Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against Candida albicans. J.Research in Microbiology, 161(7),pp 534-540.

**Esmailzadeh A., Tahbaz F., Gaieni I., Alavi-Majd H., AzadbakhtL.,(2006).**Cholesterollowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. Int J VitamNutr Res.76(3), pp147-51.

**Gil M.L.,Tomas –BarberanF.A.,Hess B.,(2000).**Antioxidant activity of pomegranate juice and its relation ship with phenolic composition and processing .J Agric Food Chem 48,pp 4581-4589.

**Grunwald J.,Jarick CH.,(2006).** « Guide de la phytothérapie » , Ed : Marabout, pp24.

**Havsteen BH.,( 2002).**The biochemistry and medical significance of the flavonoids. PharmacolTherap; 96 . p 202.pp 67.

**Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., (2004)** .Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress.

**Holetz, F.B., G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura and B.P.D. Filho.,( 2002)**. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: pp1027- 1031

**Holland D.,Hatib K.,Ya'akov I.,(2009)** .Pomegrante : Botany , Horticulture Breeding. Section of Deciduous Fruit Trees Sciences .NeweYa'ar Research Center, Agricultural Research Organization. Israel. pp 150.

**Hong M.Y.,Seeram N.P.,(2008)**. Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells over –expressing the androgen receptor. *J Nut Biochem* 19,pp848-855.

**Iserin., (2001)**. Larousse des plantes medicinales : Identification, préparation, soins. Edition.: Larousse, pp 10.

**Jones WP., Chin YW., KinghornAD.,(2006)**. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Curr Drug Targets*.volume( 7),p 247 – 264.

**Jurenka J.MT., (ASCP) ,(2008)**.Therapeutic application of permagnate (*punicagranatum* L.) ,*Alternative Medicine Review* ,edition :volume 13 .Number 2, pp 140.

**Kadi, H., Moussaoui, A., Benmehdi, H., Lazouni, H. A., Benayahia, A., &Bouderba, N. N., (2011)**.Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Punicagranatum* L. bark.

**KanounKh., Bouziane A., Bénine M.L., Benmahdi F.Z. et Marouf B., (2014)**.Etude de l'efficacité de l'extrait ethanolic d'ecorces de *Punicagranatum*Linn sur deux souches phytopathogenes : *Ascocyhtarabiei*( Pass.) Labr. Et *Fusarium oxysporum*F.spRadicis -

lycopersici. European Scientific Journal. Edition vol.10, No.12 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431.

**Khalil E.M.,(2004).**Antidiabetic effect of an aqueous extract of *Punicagranatum*L.peels in normal and alloxan diabetic rats .Egypt JHosp Med 6,pp92-99.

**Kerguelen M.,( 1993).** Index synonymique de la Flore de France - Secrétariat de la faune et dela flore, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

**Khatale PN, Manikrao AM, Vijabaskar M, Shivkumar T, Sabale PM.** Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *PseudoarthriaViscida* (L) Roots. Pharmacologyonline; 1 :pp 1153-1159.

**KhalilE.A.M.,(2004).** Antidiabetic effect of aqueous extract of pomegranate (*Punicagranatum*L.) peels in normal and alloxan diabetic rats. The Egyptian Journal of Hospital Medecine,16: pp 92-99.

**Kim N. D., Mehtar., et al.,(2002).**Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punicagranatum*L.) for human breast cancer. Breast cancer research and treatment. N°71. pp203-217.

**LarrosaM.,Tomas-Barberan F.A.,Espin J.C.,(2006).**The dietary hydrolysable tannin punicalgin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma by using the mitochondrial pathway .JNutrBiochem 17,pp 611-625.

**Larousse B .,(2001)** , Larousse des plantes médicinales , Encyclopédia Of Medecinale Plants .2 em édition ,London ,p321.

**Lansky E.P., Newman R. A., Reddy A.,(2007)** .*Punicagranatum*L (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology. N°109. pp 177-206.

**Lee C.J.,Chen L.G.,Liabg W.L.,(2010).** Anti-inflammatory effects of *Punicagranatum* L.in vitro and in vivo .J Food Chem 118,pp315-322.

**Levy, L. (1969).** Carrageenan paw edema in the mouse. *Life sciences*, 8(11),pp 601-606.

**LhosteJ.,( 1980) .** Le grand livre de la Phytothérapie . Ed. Michel Lafon-Conseil +, Paris,

**Lim YY, Lim TT, Tee JJ.,(2007).** Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *J.FoodChem* ,pp103-1003-1008

**Machado, T., A. Pinto, M. Pinto, I. Leal, M. Silva, A. Amaral, R. Kuster and K. Nettodos Santos.,( 2003).** In-vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International. Journal of Antimicrobial Agents*, 21: pp 279-284.

**Macheix J-J., Fleuriet A., Jay-Allemand C.,(2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes.

**Manich .,D.S .N.A.Jaaffery .R.B.Gupta.,(2014) .**Moisture dependent Physical proprieties of dried pomegranate arils.*Food Measure* .New York .

**Meier B.,Fach B., Etbogen R., Kashyap., (2013).**Health Technology Assessment (HTA) phytothérapie , pp15-24.

**MercanA.,(2014).**Le meilleur de la Science, de la Nature et de la Tradition .*J Ethnographie des enseignements de phytothérapie en France*. Edition : Aln Vol. 4 N°2 , Paris. p 156.

**Moliyneux P., SongklanakarinJ.,(2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology* .Vol 26 (2):pp 211-219

**MohammediS.,(2013).**Phytothérapie ,la premieremedicine du monde .Bien –être and santé.Edition :Santé-Mag N°18 .pp 37.



**Monnier C., (2002).** Les plantes médicinales - vertus et traditions, Ed. Privat.

**Mutahar. ,S,Shiban ,Mutlag .,M, Al –otbi ,Najjbs (2012).**Antioxydant activity of pomegranate (*Punicagranatum*L.).Fruit peels .J- Food nutrition Sciences pp 90-91.

**Navarro P.,NicolasT.S,GabaldonJ.A.,Calin-Sanchez A.,(2011).**Effects of cyclodextrin type on vtaminC,antioxidant activity ,and senory attributes of a mandarin juice enriched with pomegranate.J Food Sci 76,pp 319-324.

**NigrisF.,BalestrieriM.L.,Williams S.,(2007).**The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese zucker rats .J Nitric oxide 17,pp50-54.

**Nikaido, H., &Vaara, M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological reviews, 49(1), pp1.

**NizamulH.,Gulamuddin S.,Waris A.,MarhR.,Malik I.,(2015).**Acomprenhensive review of phytochemical and pharmacological profil of Anar (*Punicagranatum* L.):Aheaven’s fruit .journal of Ayredic and Herbal Medicinal . Volume ( 1 ).p 26, pp22-24.

**Orak, H. H., Yagar, H., &Isbilir, S. S. (2012).** Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punicagranatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. J.Food Science and Biotechnology, 21(2),pp 373-387.

**Oukabli, A., Bellaji, M., Chahbar, A., Elkacemi, A., Lahlou, M., Allabou, M.,(2004).**Comportement de clones locaux et de varietesetrangeres de grenadier (*Punicagranatum* L.) conduits dans la region de Meknes. Al Awama. 3, p111.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, pp307–315.

**Pharmacopée européenne., (2002).** 4eme Edition. Conseil de l'Europe. Strasbourg.p2060 .

**Pharmacopée européenne., (2005).** Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg. p3343 .

**Popovici C., Saykoval., Tylkowskib.,( 2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel. (4) :pp8

**Prashanth .,D, Asha .,M.K.,(2001).** Antibacterial activity of *Punicagranatum*L., Edition :Fitoterapia, N°72, pp171-173.

**Rahman I., (2005).** Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms . Cell BiochemBiophys., 43,pp 167 – 188.

**Rajan, S., Mahalakshmi, S., Deepa, V. M., Sathya, K., Shajitha, S., &Thirunalasundari, T., (2011).** Antioxidant potentials of *Punicagranatum*L.fruit rind extracts. Int j pharm pharm sci, 3(3),pp 82-88.

**Reddy , MK., Gupta, SK., Jacob ,MR., Khan ,SI y., Ferreira, D.,(2007).**Antioxidant ,antimalarial and antimicrobial activities of tannin – rich fraction ,ellagitanins and phenolic acids from *Punicagranatum*L.Planta Med. pp 461–467.

**Richard A.,BarbaraL.,Baer D.E.,(2006).** The incredible pomegranate plant and fruit ,Third millennium publishing .America .pp 3.

**Rios JL.,(2011).** Ethnomedicinal Plants: Progress and the Future of Drug Development. In : Rai M, Acharya D, Ríos JL. Ethnomedicinal Plants Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs. Etats-Unis : Science Publishers , pp 1 – 10.

**Saxena A., Vikram N.K.,( 2004).**Role of selected Indian plants in management of type diabetes: a review. Journal of Alternative and Complementary Medicine,10: pp369-378.

**SchauenbergP.,Ferdianand P .,(2001).**Guide des plantesmédicinales .4eme Edition :Delachaux and Niestlé .Paris. p 396. pp 8.

**Scherrer R, Gerhardt P.,(1971).**Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *Journal of Bacteriology*;107(3):pp 718-735.

**Seeram N.P., Adams L.S, Henning S.M.,(2005).** In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and total tannin extract. *J Nutr* 136, pp2481-2485.

**Seeram N., Schulman R., et al.(2006).**- Pomegranates. Ancient roots to modern medicine. Editions Taylor & Francis. P 244 .

**Sofowora A.,(2010).** « Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique », Académie Suisse des sciences naturelles. Edition : Karthala.

**Wald Elodie.,( 2009).** Le grenadier *Punicagranatum*L. : Plante historique et évolution thérapeutique récentes. Université Henri Poincaré. Thèse Doctorat. p 150. pp32- 59.

**Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), pp25-30.

**Wichtl M., Anton R.,( 2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. p636. pp 38- 41.

**Wolfgang H., (2007).** Les indispensables nature de Delachaux, 250 plantes médicinales, Edition Franckh-Kosmos Verlags-GmbH co-Stuttgart, p 420. pp12.

**Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH., (2014).** Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*. 3:100. doi:10.4103/2277-9175.129371.

# Annexe 1

## Matériel non biologique :

### 1.1. Appareillage, Verreries et Réactifs

**Tableau II. Appareillage, Verreries et Réactifs.**

Appareillages	Verreries et autres	Réactifs et solutions
- Balance analytique	- Bêchers	- Eau distillé
- Réfrigérant	- Ampoule a décantation	- Eau physiologique
- Hotte	- Pipettes graduées	- Diethyl éther
- Bain marie	- Poire - Flacon ombré	- Méthanol
- Bec bunzen	- Sonde de gavage	- Hydroxyde de potassium
- Etuve d'incubation	- Boîtes de pétri	- Réactif de Dragendroff –
- Plaque chauffante	- Disque en papier	Butanol
- Hydro distillateur de type	- Ecouvillons	- Acétate de plomb
clevenger	- Pince de laboratoire	- Ammoniaque
Balance pour animaux	- Pipette pasteur	- FeCl <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , AlCl <sub>3</sub>
, Agitateur magnétique,	- Tube à essai	- Propanol
Haute pour solvants	- Microplaques	- Acide chlorhydrique
, l'évaporateur rotatif,	- Micropipette	- Alcool isoamylique
Broyeur électrique	- Anse de platine	- Stiansy
	- Pied à coulisse	- Acide sulfurique
		- Acétate de plomb
		- Tween 80
		- Rouge de phénol
		- Dimethylsulfoxyde
		(DMSO)
		- Solution Héxoméline -
		Solution Glibenclamide

### 1.2. Les milieux de cultures : - Muller-Hinton (MH) -Gélose de Sabouraud (GS)



**Figure02 :** Lot de souris *Albinos*, de souche *Swiss race NMRI* (Originale, 2017)



**Figure 03 :** Infusion de l'écorce defruit de grenadier (Originale,2017)



**Figure05:** Préparation des solutions de DPPH de l'activité anti oxydante (Originale,2017)



**Figure 06 :** lecture avec un spectrophotomètre(Originale, 2017)

**Les calculs des doses utilisées dans activités anti-inflammatoires et antispasmodiques :**

**Les doses utilisées :**

- **300mg /kg :**

**On a utilisé 300mg de résidu**

300mg  $\longrightarrow$  1000g

7.8  $\longrightarrow$  26g (moyenne des poids des souris)

7.8  $\longrightarrow$  0.5

**X**  $\longrightarrow$  6ml

**6ml**  $\longrightarrow$  **93.6mg = 0.0936g**

- **500mg/kg:**

500mg  $\longrightarrow$  1000g

13  $\longrightarrow$  26

13mg  $\longrightarrow$  0.5ml

**X**  $\longrightarrow$  6ml

**156 dilué**  $\longrightarrow$  **6ml**

**Préparation de la dose de médicament (LIVOSPASME 8mg):**

160mg  $\longrightarrow$  60kg (60000g)

2.66  $\longrightarrow$  1000g

**Y**  $\longrightarrow$  26g

0.0676  $\longrightarrow$  0.5ml

**80mg**  $\longrightarrow$  **591ml**

## Annexe II

**Tableau VI:** Résultats de l'activité antioxydante par la méthode DPPHvis à vis les différents concentration de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punicagranatum*L. et la vitamine C.

C mg/ml	ABS	ABS	ABS	Moyenne	VITC
0	0	0	0	0,000	0,000
0,016	0,514	0,640	0,614	0,589	0,135
0,063	0,908	1,030	1,054	0,997	0,495
0,125	1,403	1,229	1,194	1,275	0,991
0,250	1,7	1,119	1,416	1,412	1,770
0,500	1,748	1,368	1,681	1,599	2,095

**Tableau IX :**Evolution moyenne des pattes postérieures gauches des souris de chaque lot

Souris/ lots	Témoin		Extrait aqueux 300 mg/kg		Extrait aqueux 500 mg/kg		Diclofenac	
	PPD	PPG	PPD	PPG	PPD	PPG	PPD	PPG
1	0,11	0,16	0,09	0,17	0,12	0,11	0,13	0,14
2	0,12	0,22	0,10	0,16	0,11	0,21	0,13	0,17
3	0,14	0,23	0,12	0,19	0,13	0,18	0,13	0,17
4	0,11	0,18	0,12	0,17	0,12	0,16	0,11	0,17
5	0,12	0,17	0,11	0,15	0,11	0,14	0,12	0,18
<b>Moyenne</b>	0,12	0,19	0,11	0,17	0,12	0,16	0,12	0,17
<b>Écart type</b>	0,013	0,028	0,011	0,014	0,010	0,038	0,010	0,015

PPD : Poids des pieds droits

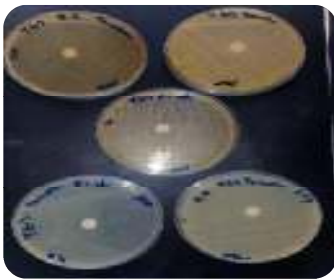
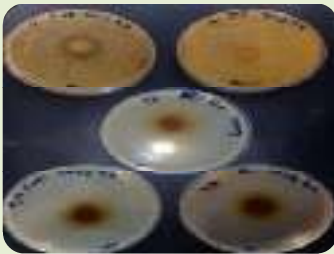
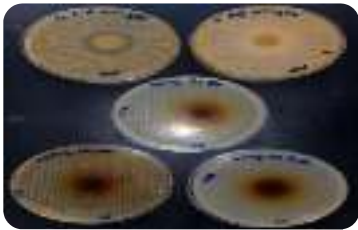
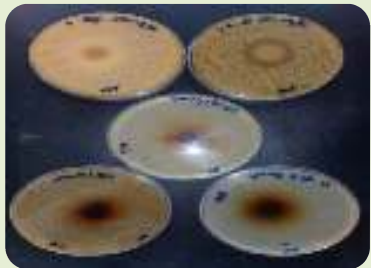
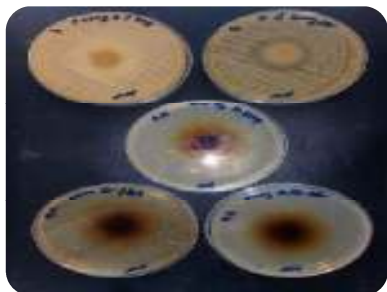
PPG : Poids des pieds gauches

**Tableau X:** Test anti-inflammatoire pour les trois lots testé(témoin, référence, extrait aqueux).

<b>Lots</b>	<b>% d'œdème</b>	<b>% de réduction d'œdème</b>
<b>Témoin</b>	58,25	0
<b>Extrait aqueux 300 mg/kg</b>	51,44	11,69
<b>Extrait aqueux 500mg/kg</b>	33,30	42,83
<b>Référence Déclofénac</b>	34,22	41,25



**Figure 19:** Zones d'inhibitions de la croissance de souches bactériennes testées vis-à-vis de l'extrait aqueux d'écorce de *Punicagranatum* L.

<p><b>Témoin</b></p>	
<p><b>Extrait aqueux à 50mg/ml</b></p>	
<p><b>Extrait aqueux à 100mg</b></p>	
<p><b>Extrait aqueux à 150mg</b></p>	
<p><b>Extrait aqueux à 200mg</b></p>	

# Chapitre I :

---

## *Rappels bibliographiques*

---

## Chapitre II :

---

# *Matériel et Méthodes*

---

## Chapitre III :

---

# *Résultats et Discussion*

---

## Introduction

Les fruits du Grenadier (*Punicagranatum*L.) ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales et thérapeutiques dans plusieurs régions d'où cet arbuste est originaire (bassin méditerranéen, Moyen-Orient, sud de l'Asie et Amérique latine) (Afaq *et al.*, 2005).

L'écorce de grenade montre également une puissante activité antioxydante et antiulcéreuse, également anti-inflammatoire liées à la présence de polyphénols, de tanins ellagiques et de tannins hydrolysables mais compte parmi les plantes médicinales les moins fréquemment employées dans notre pays à cause de l'ignorance de sa valeur thérapeutique.

Utilisé de façon empirique, dans les médecines traditionnelles, pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Il a été abandonné ensuite en raison de la toxicité de certains de ses principes actifs, le grenadier fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur un plan médical et pharmacologique que sur un plan cosmétologique, (WALD, 2009).

D'un point de vue pratique, la plupart des travaux de recherches se sont vus concrétisés dans des projets industriels. Plusieurs marques de produits cosmétiques (Archipelago, Ushuaïa, Tocophea etc.) incorporent les extraits de grenade dans leur gamme des produits, pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Curtay *et al.*, 2008).

A l'égard de ce qui précède, nous sommes intéressées, dans la présente étude les effets thérapeutiques de l'écorce du fruit de grenadier, pour ce faire ; l'objectif assigné à notre travail consiste à :

- Déterminer les caractères chimiques de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade.
- Déterminer la composition chimique de l'extrait aqueux de l'écorce de grenadier.
- Déterminer l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de l'écorce de grenadier
- Déterminer l'activité anti-inflammatoire de *Punicagranatum*L. sur des souris.
- Déterminer l'activité antispasmodique et mettre en évidence l'effet réducteur de spasmes de l'extrait aqueux chez les souris de laboratoires, provoqué par l'acide acétique.
- Déterminer l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de l'écorce de grenadier.

## I.1. Phytothérapie

### I.1.1 Définition de la phytothérapie :

La phytothérapie est fondée sur une somme d'expériences et de connaissances dont les origines remontent à plusieurs millénaires (**Grunwald et Janicke, 2006**). Littéralement, la thérapie à base de plantes ne décrit pas une spécialité unifiée mais plutôt un ensemble hétérogène de pratiques se rattachant dont le seul dénominateur commun est l'usage d'une pharmacopée à base végétale (**Mercan, 2014**).

La phytothérapie, du grec phyto et Therapeia, est l'art de se soigner par les plantes mais pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Sofowora, 2010**).

### I.1.2. Historique et évolution de la phytothérapie :

Selon **Catier et Roux (2004)**, la Phytothérapie peut revendiquer le titre de « plus ancienne des disciplines médicales », les plantes médicinales ayant été employées depuis la nuit des temps, et surtout, partout sur la planète.

Historiquement, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. Cette dernière compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité.

C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIX<sup>e</sup> siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules (**Meier et al., 2013**).

Depuis les années 80, les plantes médicinales ont fait un retour en force, s'appuyant sur des valeurs sûres testées depuis de longues années par nos ancêtres. Plusieurs facteurs sont derrière ce regain d'intérêts tels que, le coût moins élevé que les médicaments conventionnels, la relative disponibilité surtout dans les régions éloignées, la méfiance vis-à-vis des produits de synthèse ou tout simplement l'envie de consommer " Bio » (**WHO, 2004**).

Actuellement, la phytothérapie moderne s'efforce principalement de prouver scientifiquement l'efficacité des remèdes à base de plantes et d'en contrôler les risques.

Ces paramètres se mesurent selon des normes internationales et dans le respect des directives européennes, (**Grunwald et Janicke , 2006**).

### 1.1.3. Types de phytothérapie :

On distingue deux types de phytothérapie :

- ✓ La phytothérapie traditionnelle qui est une thérapie de substitution. Elle a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes, elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement (**Wichtl et Anton, 2009**).
- ✓ La phytothérapie moderne est basée sur les avancées scientifiques et les recherches des extraits actifs des plantes. Une fois identifiés ces extraits actifs des plantes sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation de ces derniers est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (**Monnier, 2002**).

### 1.1.4. La place de la phytothérapie :

#### 1.1.4.1. Dans le monde :

La pratique de la phytothérapie diffère selon les pays, car elle dépend des traditions médicinales et des enseignements donnés dans les différentes facultés de médecine, (**Schanenberg et Ferdinand, 2001**).

Cependant, la commercialisation des plantes chinoises ou indiennes pose un certain nombre de questions, liée à leur provenance, à leur identification et à leur innocuité.

Harmoniser les traitements thérapeutiques, les conditions de détention et de délivrance des plantes, tels sont les objectifs de l'Union européenne (**Schanenberg et Ferdinand, 2001**).

En Chine et en Inde, les universités enseignant la médecine traditionnelle fournissent une formation équivalente à celle de la médecine conventionnelle. En France, plusieurs universités proposent des cycles de phytothérapie (Paris V et Paris XII, Montpellier, etc.), mais ce n'est pas encore généralisé (**Chevallier, 2007**).

En Afrique, l'usage des plantes date de la nuit des temps, d'anciens textes égyptiens font état de l'emploi des plantes médicinales, en Afrique du Nord, depuis des millénaires.

Le papyrus égyptiens (environ 1500 avant J.C) mentionne environ 700 herbes et de nombreuses formules et indications (**Chevallier, 2007**).

#### 1.1.4.2. En Algérie :

En Algérie, l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été faits au IX<sup>ème</sup> siècle par Ishâ-Ben-Amran et Abdallah-Ben-Lounès, mais la plus grande production de livres a été réalisée au XVII<sup>ème</sup> et au XVIII<sup>ème</sup> siècle (**Benhouhou, 2015**).

Même pendant le colonialisme français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces médicinales. En 1942, Forment et Roques ont publiés un livre de 200 espèces végétales d'intérêt médicinale et aromatique, la plupart d'entre elles sont du Nord d'Algérie et seulement 6 espèces sont localisées au Sahara (**Benhouhou, 2015**).

La phytothérapie en Algérie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les pharmacopées régionales s'inspirent principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Elles reflètent à la fois l'histoire des Maghrébins et les spécificités de leur environnement naturel (**Bellakhder, 2006**).

La phytothérapie est très populaire, en Algérie. Elle gagne, de plus en plus, d'adeptes, comme partout dans le monde. Nombreux sont ceux qui croient à la grâce de la nature, pour guérir. En réalité, la phytothérapie, ou, plus exactement, l'herboristerie a toujours, existé en Algérie. En 2003, une filiale des laboratoires Magpharm a créé une ligne de phytothérapie « phytopharm », qui est l'une des premières entreprises à avoir introduit la phytothérapie en Algérie, avec des produits naturels, au service du bien-être, de la beauté et de la santé de tout un chacun (**Mohammedi, 2013**).

Elle importe presque la totalité de ses besoins en plantes aromatiques, médicinales et huiles essentielles. Aussi, la matière brute de ces plantes est vendue à des prix dérisoires, par contre le produit fini est importé à des prix exorbitants. C'est pour cela que l'Algérie devrait rendre le marché des plantes médicinales une filière à part entière afin de tirer profit de son riche potentiel, à l'instar des autres pays du Maghreb (**Boudraa, 2015**).



## **I.2. Plantes médicinales :**

### **I.2.1. Définition des plantes médicinales :**

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schaunenberg et Ferdinand, 2001**).

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées telles que les racines, feuilles, et fleurs.

### **I.2.2. Principaux composés actifs des plantes :**

#### **A. Les phénols :**

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (**Hennebelle et al., 2004**).

Les phénols sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques (**Wolfgang, 2007**).

#### **B. Les Flavonoïdes :**

Le terme flavonoïde (de flavus, « jaune » en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havasteen, 2002**).

Ceux-ci présentent des actions antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et protectrices du foie (**Wolfgang, 2007**).

#### **C. Les Tanins :**

Utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une grande importance économique et écologique et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (**Macheix et al., 2005**).

Leurs principaux bienfaits pour l'organisme sont l'apaisement des brûlures, le renouvellement des cellules cutanées, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma (**Wolfgang, 2007**).

#### **D. Les Alcaloïdes :**

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique), on les trouve dans plusieurs familles des plantes, la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques (**Wichtl et Anton, 2009**).

#### **E. Les Anthocyanes :**

Ils dérivent de l'acide cyanhydrique (produit de la combinaison de l'hydrogène avec le cyanogène). Ceux-ci présentent une action antiseptique (**Wofgang, 2007**).

### **I.2.3. Pouvoir des plantes médicinales :**

On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels (**Iserin, 2001**).

Les plantes médicinales représentent non seulement une source naturelle de nouvelles molécules bioactives ; mais aussi une source de produits naturels qui pourraient être utilisés comme agents médicamenteux.

La recherche des plantes médicinales se base sur quatre domaines : l'ethnobotanique, pour rechercher et répondre aux questions concernant la plante et son utilisation traditionnelle ; l'ethnopharmacie, pour explorer tous les aspects en rapport avec la préparation de médicaments à partir d'extraits bruts de plantes ; l'ethnopharmacologie, pour résoudre les questions concernant les phénomènes biologiques, pharmacologiques et thérapeutiques; et en fin, l'ethnomédecine, pour évaluer toutes les données en respectant la maladie et les traitements (**Butler, 2004 ; Jones et al., 2006 ; Rios, 2011**).

Les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (**Iserin, 2001**).

### I.3. Plante étudiée :

#### I.3.1. Historique :

La grenade est originaire d'Asie centrale et de Perse où son histoire commence. Elle a d'abord été découverte et exploitée comme plante sauvage ; seulement plus tard, les gens qui vivaient dans les collines et les vallées de la région ont appris à domestiquer les fruits (**Richard et al., 2006**).

De l'orient jusqu'en Chine le grenadier symbolise la vitalité et la fertilité à cause de ses nombreuses graines (**Bartels, 1998**).

La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires (**Calin et al., 2005**). Dans les écrits sacrés de l'islam, la grenade a également été mentionnée dans le Coran, et s'appelle "Fruit of Paradise" (**Richard et al., 2006**).

Au 1300 ans av. J.-C., les Phéniciens ont commencé à cultiver la grenade. Ils étaient de grands commerçants qui ont envoyé de nombreux navires à ports dans le bassin méditerranéen.

Selon des écrits égyptiens datant des alentours de 1500 ans av. J.-C., les fruits du grenadier étaient utilisés comme remède contre le ver solitaire. Attribué aux divinités des Enfers dans l'Antiquité, à Aphrodite, déesse de la beauté, dans la Grèce antique et considéré comme symbole de fertilité, le grenadier est apparu sous des jours très différents au fil des siècles. C'est ainsi que l'on aurait combattu la stérilité en mangeant une grenade. On dit également que le premier roi d'Israël, Saül, cherchait la tranquillité à l'ombre d'un grenadier (**Wald, 2009**).

#### I.3.2. Description botanique de grenadier :

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses. La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de

chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre (**Benoît Bock, 2013**)

### **A. Les feuilles :**

Le Grenadier possède un feuillage pérenne constitué par des feuilles opposées, lancéolées rigides et coriaces, elles sont luisantes, de 3 à 7 cm de long sur 2 cm de large selon les cultivars (**Bridel et al., 2004**). Au stade juvénile, les feuilles sont de couleur rougeâtre puis à la maturité, elles deviennent verdâtres (**Hollande et al., 2009**).

### **B. Les fleurs :**

Les fleurs du grenadier sont d'un rouge éclatant ou grenat selon les variétés mesurent 3 cm de diamètre et d'une longueur de 3.8 à 5 cm. Elles se trouvent soit, solitaire à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches (**Nizamul et al., 2015**).

Le réceptacle floral turbiné ou campanulé est surmonté de quatre à huit sépales rouges, les pétales en même nombre sont insérés en dedans des sépales et alternent avec eux ; ils sont minces et chiffonnés dans le bouton, les étamines, en grand nombre, sont insérées sur la face interne du réceptacle au-dessous de la corolle.

Le gynécée, qui comprend huit à neuf carpelles disposés sur deux verticilles, ne possède qu'un seul style surmonté d'un renflement stigmatique (**Kerguelen, 1993**).



**A : Feuille**



**B : Fleur**

**Figure 01.** Aspect générale de la plante *Punicagranatum* L. (**Originale, 2016**).

**C.Les fruits :**

Le fruit du grenadier, la grenade, est une drupe sphérique d'environ 12 cm de large alors que le poids varie entre 200 et 650 grammes, couronnée par un calice persistant (**Holland et al., 2009**).

Le péricarpe du fruit est une coque épaisse, de consistance dure, de saveur amère et astringente. Il est très coloré, généralement de teinte orange-marron à rougeâtre, tandis que l'intérieur est rempli de graines enchâssées dans une gangue jaunâtre et enveloppées par une pulpe rose comestible, très juteuse, au goût acidulé et doux à la fois (**Lhoste, 1989**).

La baie renferme de nombreuses graines angulaires ou arilles. Le fruit contient en moyenne 600 graines pulpeuses, contenus dans des loges, séparées par des cloisons ténues et nombreuses. Ces graines sont de couleur rouge et de teinte variable et possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (**Everinoff, 1957**).

**D.Ecorce :**

L'écorce de grenadier est irrégulière, dure, et coriace.Plutôt épaisse de (2-3) mm de couleur rouge ou jaune beige chez certaines variétés, qui renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge.

Cependant, un goût vraiment astringent et faiblement amère. (**Nizamul et al.,2015**).

**C : Fruit****D : Fleur****Figure 01.**Aspect générale de la plante *Punicagranatum* L.(**Originale, 2016**).

### I.3.3. Etymologie :

Le grenadier a d'abord été connu sous deux appellations latines ; *Malumgranatum*, qui signifie pomme à graines et *Malumpunicum* qui signifie pomme de Phénicie. Linnaeus a appelé plus tard le grenadier « *Punicagranatum* ». Le nom conserve encore un dérivé du mot **Punicase** référant à la ville de Carthage, ancienne ville dans la banlieue nord de la Tunisie. Et celui spécifique **granatum**, qui signifie granuleux faisant référence à la multiplicité des grains contenus dans le fruit (**Richarde et al., 2006 ; Wald, 2009**).

### I.3.4. Classification :

D'après **APG III (2009)** *Punicagranatum*L. est classée comme suit :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Myrtales
- **Famille** : Lythracée
- **Genre** : *Punica*
- **Espèce** : *Punicagranatum*.

### I.3.5. Origine géographique, production mondiale et Exigences édaphiques :

#### I.3.5.1. Origine géographique :

Le grenadier est fortement représenté au Moyen-Orient, sa terre d'origine. Ainsi, il se trouve fréquemment en Afghanistan, Turquie, Transcaucasie, et en Inde. Il est aussi beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc (**Wald, 2009**). La culture du Grenadier a commencé en Asie occidentale à l'époque préhistorique, son extension dans l'antiquité vers l'Occident d'abord, puis vers l'Inde et la Chine, a été suivie d'une naturalisation très fréquente et très ancienne qui peut induire en erreur sur sa véritable origine (**Everinoff, 1957**).

### **I.3.5.2. Production de grenadier dans le monde :**

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76 % sont repartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA) **(Melgarejo et Valero, 2012)** Pour la production mondiale, il n'y a pas des données précises, car cette espèce est probablement considérée comme une culture secondaire **(Melgarejo et Valero, 2012)** ont estimé la production mondiale à environ 3 086 000 tonnes tout en se basant sur les données élaborées par différents chercheurs et des associations à travers le monde.

### **I.3.5.3. Exigences édaphiques du grenadier :**

Le grenadier est un petit arbuste à longue durée de vie, bien adapté au climat méditerranéen et aux zones arides. Le grenadier s'adapte à de nombreux climats, des tropiques aux régions tempérées chaudes. Cependant, c'est un climat austral subtropical voire tropical qui lui convient le mieux **(Melgarejo et Valero., 2012)**.

Les meilleurs fruits sont obtenus dans les régions subtropicales, où la période des températures élevées correspond au moment de la maturité des grenades **(Afaque et al., 2005)**.

Le grenadier est une espèce connue pour sa tolérance au calcaire et à la salinité, elle peut supporter des températures extrêmes allant de -10 et +40C° **(Oukabli, 2004)**.

### **I.3.6. Composition chimique des différents organes du grenadier :**

Au XIXème siècle, le grenadier suscitait un intérêt chez les chercheurs qui, avec des moyens très rudimentaires, ont ainsi mis en évidence certains principes actifs de cet arbre, tel que la pelletierine. Grâce aux récents procédés d'analyse chimique, comme les techniques de chromatographie, de résonance magnétique ou encore de spectrométrie de masse, il a été possible d'identifier avec précision la composition des différents organes du grenadier **(Wald, 2009)**.

L'étude phytochimique de *Punicagranatum*L.révèle sa richesse en polyphénols : (tanins, flavonoïdes, anthocyanes ...) et d'autres composés tels que les alcaloïdes ainsi que la présence des sucres (10%), des acides organiques (1,5%), des acides aminés, des stéroïdes, et des sels minéraux selon la partie de la plante (**Gil et al.,2000 ; Kim et al.,2002**).

L'écorce du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique (**Curtay et al.,2010**).

### **I.3.7. Activités thérapeutiques de *Punicagranatum*L.**

#### **A. Propriétés antioxydantes :**

Des études in vitro ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux(**Jurenka, 2008**).

Dans le jus de grenade, les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (**Seeram et al., 2005**).

Ainsi, toutes les parties du grenadier contiennent des polyphénols, les tiges et l'écorce étant les plus riches en tanins. Parallèlement, ces deux organes démontrent des propriétés antioxydantes plus marquées pour lutter contre l'oxydation des LDL. La capacité de lutte contre la peroxydation du grenadier semble donc être liée, à la présence de tanins antioxydants(**Seeram et al., 2006**).

#### **B. Propriétés anti inflammatoire :**

L'inflammation, la première défense physiologique du corps humain, peut nous protéger des lésions causées par les blessures ou les empoisonnements (**Lee et al.,2010**). De nombreuses preuves scientifiques qui démontrent clairement les propriétés anti-inflammatoires de grenadier (**Lansky et Newman,2007 ; Larrosa et al.,2010**), ont prouvé que l'acide punique, qui est un acide gras conjugué présent dans l'huile de pépins de grenade, possède un effet anti-inflammatoire, qui a été démontré in vivo et limitant par conséquent la peroxydation lipidique.**Boussetta et al. (2009)**



Par la suite, **Nigris et al.(2007)** ont démontré que l'administration du jus de grenade et l'extrait de grenade à des rats obèses diminue de manière significative l'expression de certains marqueurs génétiques ayant une influence sur l'inflammation cardiovasculaire.

Enfin, **Larrosa et al. (2010)** ont observé que l'administration des extraits de grenade diminue les niveaux de prostaglandines dans la muqueuse du colon dû au niveau élevés d'acide ellagique dans la grenade.

### **C. Propriété antimicrobienne :**

L'activité antimicrobienne du grenadier a été démontré dans de nombreuses études qui ont constaté l'inhibition de la croissance de nombreux microorganismes (**Reddy et al .,2007 ; Al-zoreky,2009**).

**Reddy et al. (2007)** ont démontré que les différents extraits de grenade préparés dans différents solvants (eau, éthanol, méthanol) présent une activité antimicrobienne significatif contre plusieurs souches tels que *Candidat albicans*, *E.coli*, *Pseudomonas aeryginosa*.

**Choi et al. (2009)** ont quant à eux étudié l'effet in vitro et in vivo de l'application de différentes concentrations de l'extrait d'écorce de grenadier pour inhiber la croissance de Salmonelle. Ils ont constaté que la dose minimale était de 62.5mg /L.

En général, le fort pouvoir inhibiteur de *Punicagranatum*L. est dû à la concentration élevée en composés bioactifs tels que les polyphénols, les tanins et les flavonoïdes qui possèdent la capacité d'inhibition de l'activité des micro-organismes provoquant la détérioration des aliments (**Navarro et al.,2011**).

### **D. Propriété anticancéreuse:**

Nombreuses sont les études réalisées pour évaluer l'efficacité de *Punicagranatum*L., dotée d'une grande activité antioxydante et agit en tant que facteur antiprolifératif, pro-apoptique sur les cellules malades (**Lansky et Newman.2007 ; Hong et al., 2008**).

**Hong et al. (2008)** ont démontré que le jus de grenade constitue un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire, et il est même plus puissant que certains polyphénols. Ils suggèrent ainsi un effet synergique des composés phytochimiques présents dans le grenadier et dans ses extraits.

**Seeram et al. (2005)** ont décrit l'activité antiproliférative du jus de grenade sur diverses lignes cellulaires tumorales, avec une grande inhibition de l'ordre de 30% jusqu'à 100% dû à la présence de l'acide ellagique et la punicalagine.

### **E. Propriété antidiabétique :**

A l'origine, des remèdes traditionnels à travers quelques pays du monde depuis des centaines d'années, montrent que les fleurs de *Punicagranatum*L. sont la seule partie utilisée dans le traitement du diabète sucré (**Saxena et Vikram, 2004**).

Dans notre pays et principalement dans la région de Tlemcen, *Punicagranatum*L. (épicarpe) est parmi les plantes utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète sucré d'après les informations ethnobotaniques recueillies par **Khalil (2004)**, qui montrent que l'extrait aqueux de l'épicarpe de *Punicagranatum*L. provoque une diminution de la glycémie chez les rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane.

La consommation de grenadier par les patients diabétiques de type 2 ayant une hyperlipidémie provoque une diminution du taux de cholestérol total. Cette activité a été démontrée par les travaux d'**Esmailzadeh et al. (2006)**.

## Lieu de stage

Notre travail a été réalisé durant la période de trois mois allant du mois de Février jusqu'au mois d'Avril 2017, au niveau de trois laboratoires de SAIDAL- Filial Biotic-Saidal d'Oued Smar :

- Au niveau du laboratoire des analyses physico-chimiques : réalisation de l'extraction, les paramètres physico-chimiques, le screening phytochimique ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante
- Au niveau du laboratoire de pharmacotoxicologie : l'évaluation des études pharmacologiques
- Au niveau du laboratoire de microbiologie : l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

### II.1. Matériel :

#### II.1.1. Matériel biologique :

##### II.1.1.1. Matériel végétal:

Notre choix a porté sur l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. La récolte de la plante a été effectuée durant le mois de Novembre 2016 au niveau de la région de Sidi- Amer (wilaya de Tipaza).

Les fruits une fois récoltés, ont été soumis à un nettoyage à la main afin d'éliminer toute trace de poussière, puis ils ont été soumis à un pelage manuel. Les écorces sont mises aux conditions de séchages à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante pendant 3 semaines. Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un broyeur maison. La poudre obtenue est conservée dans un bocal hermétiquement fermé à l'abri de lumière et de l'humidité au congélateur à basse température de 4°C jusqu'à son utilisation.

##### II.1.1.2 Matériel Animal:

Les animaux utilisés proviennent de l'animalerie du laboratoire de pharmacotoxicologie de la Filiale Biotic (Saidal) d'Oued Smar. **Figure 02 (Annexe II)**

Nous avons utilisés 40 souris *Albinos*, de souche *Swiss* race NMRI (Naval Médical Research Institut), sexe mâle et femelle, de 26 à 28g de poids corporel 20 souris pour l'activité anti-inflammatoire et 20 souris pour l'activité antispasmodique).

❖ **Conditions d'élevage :**

- Température ambiante : 20 °C à 24 °C.
- Taux d'humidité : 50%
- Eclairage : 10h/j.

❖ **Régime alimentaire :**

- Nourriture : Tourteaux agglomères, composés de maïs, son, remoulage, Soja, CMV, Granulés (ONAB)
- Boisson : eau du robinet (eau potable).

### II.1.1.3 Microorganismes étudiés :

Les germes testés proviennent de la collection du laboratoire de Microbiologie de SAIDAL d'Oued Smar, identifiés avec une référence ATCC (*American Type Culture Collection*), et présentés dans le **Tableau I**

**Tableau I :** Souches microbiennes utilisées dans l'activité antimicrobienne.

Souches utilisées		ATCC
<b>Bactéries à Gram (-)</b>	<i>Escherichia coli</i>	16404
<b>Bactéries à Gram (+)</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<b>Levure</b>	<i>Candida albicans</i>	10231
<b>Moisissure</b>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	14028

### II.1.2 Matériel non biologique :

L'appareillage, la verrerie, les réactifs ainsi que les divers produits chimiques utilisés sont mentionnés en (**Tableau II, Annexe I**).

**II.2. Méthodes :****II.2 .1 Etude phytochimique****II.2.1 Détermination du taux d'humidité:**

Le taux d'humidité dans la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci.

D'après la (**pharmacopée Européenne,2002**), 1g de poudre végétale est mis dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé ; l'ensemble est placé dans une étuve réglée à une température entre 100 et 105°C durant deux heures. Le pourcentage d'eau contenue dans la poudre est calculé par la formule suivante (**Pharmacopée européenne, 2005**) :

$$X\% = \frac{M - M'}{M} \times 100$$

Où :

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.2.3Screening phytochimique :**

Nous avons caractérisé les différents groupes chimiques en nous référant aux techniques décrites par **Bruneton (1999)**.

**❖ Préparation de l'infusé :**

Nous avons infusé pendant 15min 20g de la poudre sèche dans 200 ml d'eau distillée bouillante. L'infusé a été filtré pour produire l'extrait aqueux. **Figure 03(Annexe I)**

**II.1.5Identification des principaux constituants chimiques:****➤ Les anthocyanes :**

A 5 ml d'infusé sont introduit dans un tube à essai auquel quelques gouttes d'ammoniaque ½ sont ajoutés. La réaction donne une coloration bleue en présence des anthocyanes.

➤ **Les leucoanthocyanes :**

Introduire 2 g de poudre végétale et 20 ml d'un mélange de propanol /acide chlorhydrique (1/1), dans un bécher de 20 ml. Puis porter en bain marie bouillant pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

➤ **Les tanins :**

A 5 ml d'infusé on rajoute quelques gouttes d'une solution de  $\text{Fe Cl}_3$  à 5%.

La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des tanins.

- **Les tanins catéchiques :**

Dans un bécher, 15ml d'infusé sont additionnés à 7 ml de réactif de Stiasny. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchétiques.

- **Les tanins galliques :**

A l'aide d'une pipette graduée 5 ml d'infusé sont introduit dans une fiole auxquels 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de  $\text{Fe Cl}_3$  sont ajoutés.

Après agitation, une coloration bleue foncée apparait en présence des tanins galliques.

➤ **Les alcaloïdes :**

Faire macérer dans une bouteille en verre (Duran SCHOTT) 5g de poudre humectés avec de l'ammoniaque $\frac{1}{2}$  pendant 24h dans 50ml d'un mélange éther chloroforme (3/1). Le mélange obtenu est filtré. Ainsi, le filtrat est épuisé par 2 ml d'acide chlorhydrique 2N.

Après adjonction de quelques gouttes du réactif de DRAGENDORFF, la présence d'alcaloïdes se manifeste par le développement d'un trouble ou d'un précipité dans la bouteille.

➤ **flavonoïdes :**

Introduire dans une fiole 5 ml d'infusé ,5 ml d'Hcl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique. L'ensemble est agité pendant quelques minutes. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

➤ **Les saponosides :**

Dans un tube à essai, on introduit 2 ml d'infusé auxquels, on rajoute quelques gouttes d'acétate de plomb. La formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

➤ **Les quinones :**

- **Les quinones libres :**

Dans un bécher, 2g de poudre humectés par 2ml d'acide chlorhydrique 1N sont mis en contact pendant 3heures dans 20 ml de chloroforme. Le mélange est filtré puis agité avec 5 ml d'ammoniaque ½. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

- **Les quinones combinées :**

A 2g de poudre on additionne 5 ml d'acide sulfurique 2N et porter à reflux pendant 2h.

La solution extractive est filtrée puis épuisée par 20 ml de chloroforme. Cette solution chloroformique est évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis épuisée par l'ammoniaque ½. Une coloration rouge apparaît en présence des quinones combinées.

➤ **Les sénosides:**

Dans une fiole conique, on introduit 2.5 g de poudre végétale, puis on rajoute 50 ml d'eau distillée et 2ml d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est chauffé dans un bain-marie pendant 15 min.

Après refroidissement, l'ensemble est agité avec 40 ml d'éther. La couche étherée est séparée et séchée avec le sulfate de sodium anhydre, ensuite évaporer à siccité.

Au résidu refroidi, on rajoute 5 ml d'ammoniaque diluée ½. Une coloration jaune ou orangé se développe.

Le chauffage de cette solution au bain-marie pendant 2 mn, donne une coloration violette rouge en présence de sénosides.

➤ **Les coumarines :**

La préparation de l'extrait se fait comme suit :

- Faire bouillir à reflux 2g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min puis filtrer.
- A 5ml du filtrat, rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'Hcl à 10%.
- La formation d'un trouble indique la présence de coumarines.

➤ **L'Amidon:**

A 2g de poudre végétale on rajoute quelques gouttes d'Iode (I<sub>2</sub>). Une coloration bleue violette est obtenue en présence de l'amidon.

➤ **Les glycosides :**

A 2 g de poudre végétale on rajoute 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glycosides.

### **II.2.2. Préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. :**

Nous avons procédé à une décoction aqueuse pour l'obtention de l'extrait aqueux suivant le protocole de (Kadi *et al.*, (2011) ; Kanoun *et al.*, (2014). Vingt grammes (20 g) de poudre végétale ont été mis en décoction dans 200 ml d'eau distillée pendant 20 minutes. Au terme de cette opération, le décocté obtenu après refroidissement a été filtré avec du papier Whatman n°1. Le filtrat a été concentré en procédant à une évaporation sous étuve à 40° L'extrait sec a été ensuite conservé, à une température de 4°C.



## II.2.3 Evaluation des activités biologiques :

### II.3.1 Activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait aqueux (EA) de l'écorce de fruit de *Punica granatum* L. et pour mieux l'estimer, deux méthodes basées sur deux principes différents pour l'évaluation de cette activité sont réalisées, à savoir : la méthode de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur FRAP. Le pouvoir antioxydant de l'EA a été estimé par comparaison avec l'acide ascorbique.

#### A. Activité de piégeage du radical DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl) :

##### ➤ Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Williams et al., 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm (Popovici et al., 2009).

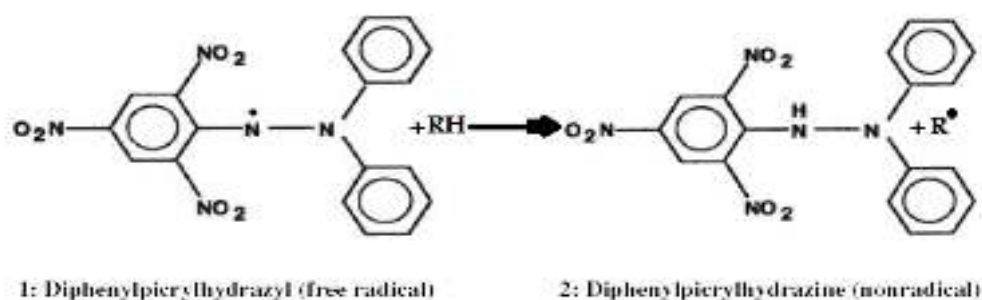


Figure 04: Forme libre et réduite du radical DPPH (Molyneux, 2004).

#### ❖ Mode opératoire :

Le protocole expérimental suivi est celui de Cuendet et al. (1997).

- Préparation de la solution DPPH

La solution de DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu.

- **Préparation des solutions mères et des dilutions de chaque extrait:**

Comme première étape, une solution mère à une concentration de 0,5 mg/ml est préparée, en faisant dissoudre 2,5 mg d'extrait dans 5 ml de méthanol.

Cette solution subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de mg par ml ; 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.0312 mg/ml, 0.0156 mg/ml et 0.0078 mg/ml.

En parallèle, une solution méthanolique d'antioxydant de référence ; l'acide ascorbique a été préparée par dissolution de 2.5 mg de la vitamine C dans 5 ml de méthanol.

Dans des tubes secs et stériles, 1ml de l'échantillon à différentes concentrations, sont ajoutés à 2 ml de la solution de DPPH. Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C) pendant 30 min. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. **Figure 05 (Annexe II)**

Le contrôle négatif contient uniquement la solution méthanolique de DPPH.

L'expérimentation a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde de 517nm. **Annexe II**

- **Calcul :**

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100$$

$A_C$  : Absorbance du contrôle négatif.

$A_T$  : Absorbance du test effectué.

- **Calcul des IC<sub>50</sub>**

L'IC<sub>50</sub> ou concentration inhibitrice de 50% est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH•.

**B. Pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) :****➤ Principe :**

L'activité réductrice du fer de l'extrait aqueux est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**, basée sur la réduction du fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ . La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux. Par conséquent,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évaluée en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Bougandoura et al., 2012**).

**❖ Mode opératoire :**

- Dans des tubes à essais, un millilitre de l'extrait à des concentrations croissantes est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1 %.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50 ° C pendant 20 minutes.
- Ensuite, 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 300 tours/min pendant 10 minutes
- 2.5 ml du surnageant sont prélevés et mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution de chlorure ferrique ( $\text{Fe Cl}_3$ ) fraîchement préparé à 0.1 %.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée.

Le control positif est représenté par une solution d'un antioxydant : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon.

**II.3.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire**

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Punica granatum* L. un modèle expérimental d'inflammation aiguë de la patte de la souris induite par la carraghénine a été sélectionné.

❖ **Principe**

Des œdèmes au niveau des pattes de souris sont induits après injection sub-plantaire (intra-articulaire) d'une solution de carraghénine au niveau de la patte arrière gauche des souris, 30 min après administration des extraits par voie orale. L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (**Levy, 1969**).

❖ **Mode opératoire :**

Afin de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire, les souris sont réparties en 4 lots de 06 souris chacun, à savoir trois lots traités, et un lot témoin. Les souris utilisées sont privées de nourriture et d'eau pendant 18 heures avant la période d'expérimentation.

• **Au temps  $T_0$  :**

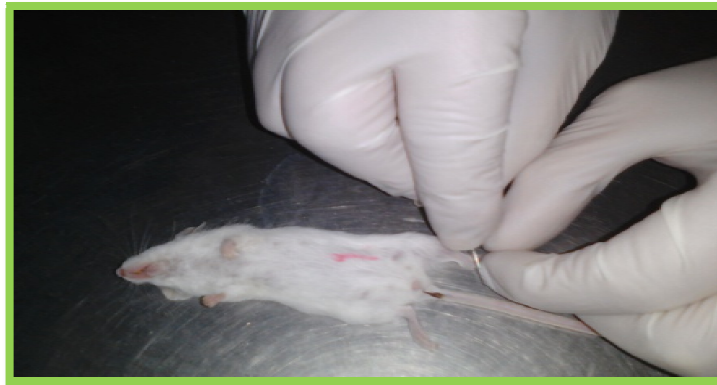
Les solutions (eau physiologique, Diclofenac®, extrait aqueux à 300 et 500 mg/kg) sont administrées par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique :

**Tableau III** : La répartition des lots est faite selon le tableau suivant :

	N° Lot	Essai	Objetifs
Témoin	01	chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau physiologique à 0,9%.	Vérification de l'action inflammatoire de carraghénine
Essais de produit de référence et de l'extrait aqueux d'écorce de <i>Punica granatum</i> L.	02	Les souris reçoivent 0.5 ml d'un produit anti-inflammatoire (Diclofenac®) ; 1 comprimé de 75mg dans 750 ml d'eau physiologique	-Vérification l'effet anti-inflammatoire de référence
	03	Les souris reçoivent 0.5 ml de l'extrait aqueux à une dose de 300mg/kg.	-Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire et de la relation entre la dose et l'effet
	04	Les souris reçoivent 0.5 ml de l'extrait aqueux à une dose de 500 mg/kg.	

- **Au temps  $T_0 + 30$  min**

L'inflammation est provoquée par l'injection de 0.025 ml d'une solution de carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de chaque souris 30 min après administration du traitement (**Figure 07**).



**Figure 07:** Injection de la carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire des pattes postérieures gauches (**Originale, 2017**)

- **Au temps ( $T_4$ )**

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait a été évaluée en sacrifiant les souris par asphyxie en utilisant l'éther diéthylique, puis en coupant les pattes postérieures au niveau de l'articulation tarso-métatarsienne (**Figure 08 et 09**) et les pesées sur une balance analytique.



**Figure 08 :** Coupure des pattes postérieures à hauteur de l'articulation (**Originale, 2017**)



**Figure 09** :Pesage des pattes droites et gauches sur d'une Balance analytique(Originale,2017)

#### ❖ Expression des résultats

Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ de l'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{Moyenne de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin est calculé comme suit

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

### II.3.3 Evaluation de l'activité antispasmodique :

Pour mettre en évidence l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux de *Punica granatum* L. un modèle expérimental de l'effet réducteur de spasme chez les souris de laboratoires provoqués par l'acide acétique a été sélectionné(Rahman, 2005).

**❖ Principe**

L'injection d'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale provoque chez les souris une réaction douloureuse, cette douleur se manifeste par des spasmes sous forme de mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures (**Rahman, 2005**).

**❖ Mode opératoire :**

La mise en évidence de l'effet antispasmodique sur les souris a été réalisé selon la méthode de **Rahman et al (2005)**.

Les souris albinos sont réparties en quatre lots de 05 souris dont le poids corporel est compris entre 26 g et 28 g.

**➤ Au temps  $T_0$  :**

Les 03 solutions (eau physiologique, Livospasme 80mg, l'extrait aqueux à 300mg et 500mg/kg) sont administré par voie orale :

- **Lot témoin :** Chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau physiologique.
- **Lot essai 01 :** Chaque souris reçoit 0,5 ml du produit de référence (Livospasme 80mg).
- **Lot essai 02 :** Chaque souris reçoit 0,5 ml de l'extrait à 300mg.
- **Lot essai 03 :** Chaque souris reçoit 0,5 ml de l'extrait à 500mg.

**➤ Au temps  $T^0 +30$  minute :**

Injection de l'acide acétique à 1% par voie intra-péritonéale sous volume de 0,2ml à toutes les souris mises en expérience.

**➤ Après 5minute :**

Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5min, nous avons compté le nombre de spasmes durant 10minutes.

Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale (**Rahman, 2005**).

## ❖ Expression des résultats :

Selon **Rahman, (2005)**, l'activité antispasmodique est exprimée par le pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport au témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{\text{moy des spasmes du lot T} - \text{moy des spasmes du lot E}}{\text{moy des spasmes du lot T}} \times 100$$

- **Lot T:** Lot témoin.
- **Lot E :** Lot Essai



**Figure 10:** Mise à jeun les souris pendant 16h (Originale, 2017)



**Figure 11 :** Administration des solutions préparées par voie orale (Originale, 2017)



**Figure 12 :** Injection de l'acide acétique par voie intra parentérale (Originale, 2017)



**Figure 13 :** Comptage du nombre de spasme (Originale, 2017)



### II.3.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'objectif de l'étude de l'activité antimicrobienne est de déterminer le taux d'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *punica granatum* L. ceci par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme).

#### ❖ Principe :

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne et antifongique ou les deux en mm temps, en les mettant en présence des germes testés dont la concentration est ajustée à  $10^7$ - $10^8$  germes/ml avec le spectrophotomètre à UV visible.

Des disques de 9mm de diamètre, avec une capacité d'absorption de 2 à 3  $\mu$ l sont déposés sur la gélose ensemencée en nappe à partir des souches à tester.

La diffusion de l'extrait aqueux, dans la gélose va permettre l'inhibition de la croissance des germes, tout au tour des disques, dans le cas d'une éventuelle activité antimicrobienne positive qui se traduira après incubation par une auréole claire et distincte autour du disque appelée Halo ou zone d'inhibition.

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse, pour chacune des souches (**Pharmacopée européenne, 2002**).

#### ❖ Protocole expérimental :

##### A. Préparation de la première couche du milieu :

- Faire fondre les milieux Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures dans un bain marie réglé à 95°C.
- Verser aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boites de Pétrie de 90mm de diamètre à raison de 15ml par boite avec 3 répétitions par souches.
- Laisser refroidir et solidifier sur paillasse.

##### B. Préparation de l'inoculum :

La préparation de l'inoculum s'est fait à partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures).

- Réaliser des suspensions microbiennes qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- Agiter au vortex.
- Réaliser une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm + 20 en estimant la transmittance entre 22 et 32% pour les bactéries et entre 2 à 3 pour les levures.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml, si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste soit, en ajoutant de l'eau physiologique si elle est supérieure à la valeur maximale soit en ajoutant les colonies si elle est inférieure à la valeur minimale.

A chaque fois, une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées.

- L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

### **C. Préparation de la deuxième couche du milieu :**

- Faire fondre les deux milieux MH et SAB.
- Laisser refroidir jusqu'à une température de 45°C.
- Mettre dans des flacons de 50 ml le milieu correspondant pour chacune des souches.
- Ensemencer les milieux avec 100µl de la suspension.
- Agiter manuellement puis déposer rapidement 4ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme.
- Laisser solidifier sur la paillasse.

### **D. Dépôt des disques :**

- Prélever à l'aide d'une pince stérile
- Imbiber les avec l'extrait aqueux brut en mettant en contact seulement le bout des disques. L'absorption se fait progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Disposer les sur la surface de la gélose.
- Laisser diffuser pendant 30 min.
- Incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

#### **Lecture :**

- Présence de zone claire autour du disque : Présence d'activité inhibitrice.
- Présence de zone claire autour du disque : absence d'activité inhibitrice (**Al-Zoreky, 2009**).



### III.1. Etude phytochimique

#### III.1.1 Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale

Le résultat du taux d'humidité de la matière végétale est représenté dans le tableau III :

**Tableau IV** : Taux d'humidité de la poudre de *Punicagranatum*L.

<b>Poids de la matière végétale avant séchage Pi(g)</b>	1,002
<b>Poids de la matière végétale après séchage P(g)</b>	0,899
<b>Le taux d'humidité de la matière végétale H (%)</b>	10 ,27

D'après les résultats affichés dans le tableau I, le taux d'humidité de *Punicagranatum* L. est de 10,27 %.

Nos résultats concordent avec ceux de **Manish et al. (2014)**, où le taux d'humidité est entre 7-28%.

Le taux d'humidité nous donne une idée sur la dégradation des principes actifs de la plante. la quantité du résidu sec nous renseigne sur la quantité de la poudre présente de l'extrait alcoolique, Ce résultat démontre que notre matériel végétal a été séché et conservé dans de bonnes conditions, ce qui rend, par conséquent le résultat de nos analyses phytochimiques fiables.

#### III.1.2. Screening phytochimique :

Ces tests ont été effectués pour mettre en évidence la présence de certains groupements chimiques qui peuvent être responsables des activités biologiques étudiées. Les résultats sont indiqués dans le **tableau V** :

**Tableau V:** Résultats du screening phytochimique

Composés	coloration	Reaction
Anthocyanes	Bleu	–
Leuco-anthocyanes	Rouge	+++
Tanins	Bleue noir	+++
Taninscatéchiques	Rouge	+++
Taninsgalliques	Bleu foncée	+++
Quinones libres	Rouge	++
Quinines combines	Rouge	–
Saponosides	Précipité blanc	++
Alcaloïdes	Trouble	+++
Sennosides	Jaune	–
Coumarines	Trouble	+++
Flavonoïdes	Rouge orangé	+++
Glucosides	Rouge en suite violette	–
Amidon	Bleueviolette	–

(+ + +): Réaction très positive / (+ +): Réaction moyennement positive / (+) : Réaction faiblement positive / (-): Réaction négative

Le test phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé de *Punicagranatum*L. révèle la présence de plusieurs familles de composé chimiques. Les substances polyphénoliques telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins existent à des fortes teneurs parmi ces derniers on note les tanins catéchiques et galliques (réaction très positive). La plante est également riche en leuco-Anthocyanes. Cependant les saponosides, les quinones libres et les coumarines existent à des teneurs moyennes.

Alors que les anthocyanes, l'amidon et les glucosides ne sont pas présents (réaction négative) dans notre échantillon.

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Chebaibi et Rhazi (2013)**, qui ont révélé la présence de tritérpénoïdes, de stéroïdes, de flavonoïdes, de tanins, de glycosides et de saponines dans l'extrait aqueux d'écorces de fruit de *Punicagranatum* L.

Les métabolites secondaires précisément les polyphénols fournissent des propriétés pour la santé humaine. Les composés appartenant aux terpénoïdes, alcaloïdes et les flavonoïdes sont utilisés comme médicaments ou comme compléments

Alimentaires pour guérir ou prévenir diverses maladies et en particulier certains de ces composés semblent compétents dans la prévention et l'inhibition de divers types de cancer. Ils sont doués d'un pouvoir antioxydant, antimicrobien et représentent une bonne alternative aux antibiotiques et aux conservant chimiques (**Jurenka, 2008, Lansky et al., 2009 ; Nizamul, 2015**).

### **III.2. Evaluation des activités biologiques :**

#### **III.2.1. Résultats de l'activité antioxydante**

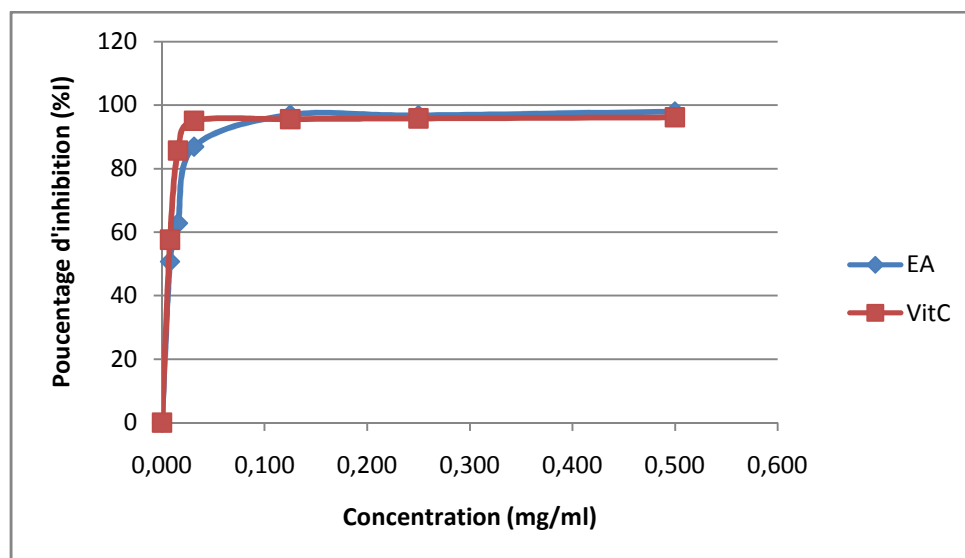
La mise en évidence du pouvoir antioxydant de notre échantillon est réalisée par deux tests chimiques, chacun de ces tests correspond à un des deux mécanismes de réaction qui sont :

- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode de FRAP « FerricRéducing Antioxydant ».
- Mécanisme de réaction HAT « Transfert d'atome d'hydrogène » et SET à la fois réalisé par la méthode de DPPH « 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole »

#### **Evaluation de la méthode de DPPH**

La **figure 14** illustre l'efficacité de l'extrait aqueux d'écorce de fruit de *Punicagranatum* L. à piéger le radical DPPH traduite par le taux d'inhibition (%I) en fonction des différentes concentrations. Ces résultats montrent que l'activité anti-radicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel

**Tableau VI, Annexe II.**



**Figure 14:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait aqueux de *Punicagranatum* L. et la vitamine C

A partir de ces résultats obtenus, nous avons remarqué que l'extrait aqueux a montré une activité antioxydante importante vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>, ceci est traduit par le graphe tracé qui a une allure exponentielle qui se termine par une phase stationnaire, phase dans laquelle le radical DPPH est réduit totalement en sa forme non radicalaire, l'extrait aqueux a enregistré une valeur importante en pourcentage d'inhibition du DPPH de l'ordre de  $97.94 \pm 1.41\%$  à une concentration de 0.5 mg/ml.

Quant au contrôle positif utilisé, nous avons remarqué une forte activité antioxydante qui se traduit par des pourcentages d'inhibition élevés, de l'ordre de  $95.06 \pm 0.20\%$ ,  $95.59 \pm 0.54\%$ ,  $95.83 \pm 0.61\%$ ,  $96.16 \pm 0.68\%$  à des concentrations de 0.031, 0.125, 0.250, 0.500 mg/ml, respectivement.

**Mutahar et ses collaborateurs (2012)** rapportent que les écorces de grenades sont riches en composés phénoliques et présentent une puissante activité du piégeage du radical libre DPPH ainsi qu'un pouvoir de réduction. Ils rapportent également que les antioxydants contenus dans les fruits et les légumes, tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les tanins, sont supposés jouer un rôle très important dans la prévention des maladies.

A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux et du contrôle positif (VitC). La valeur de l'IC<sub>50</sub> est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète

la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable. Le **tableau VII** rapporte les valeurs de l'IC<sub>50</sub> de chaque échantillon.

**Tableau VII :** Activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Punicagranatum*L.vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH exprimée par la valeur d'IC<sub>50</sub>

Extraits	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Extrait aqueux (EA)	0.008
Contrôle positif (VitC)	0.006

Du tableau, nous remarquons clairement le fort pouvoir antioxydant du contrôle positif utilisé (Vitamine C), qui est de l'ordre de 0.006 mg/ml.

**Rajan et al. (2011)** indiquent que les extraits aqueux et alcooliques des écorces de fruit de *Punicagranatum*L.ont eu des effets significatifs de balayage du radical DPPH. Comme le DPPH est considéré comme un radical lipophile, il accepte facilement l'électron du composé antioxydant et convertit sa couleur du violet au jaune qui est détecté à 517nm. La valeur de l'IC<sub>50</sub>de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade était de  $13.527 \pm 39,30$  mg / ml (**Rajan et al.,2011**) . Cette valeur est nettement supérieure à celle trouvée dans cette actuelle étude (0.008mg/ml).

Bien que la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux d'écorce de fruit *Punicagranatum*L. était inférieur, elle est comparable à d'autres fruits tropicaux qui sont considérés comme ayant une puissante activité antioxydante (IC<sub>50</sub>Goyave  $2,1 \pm 0,63$  mg / ml, IC<sub>50</sub> papaye  $3,5 \pm 0,9$  mg / ml) (**Lim et al., 2007**).

Par ailleurs, **Orak et ses collaborateurs (2012)** ont effectué une étude comparative des activités antioxydantes du jus, de l'écorce et des graines de grenade (*Punicagranatum* L.) et l'inter-relations avec les composés phénoliques, tannins, anthocyanés et flavonoïdes totaux. Cette recherche a soutenu que les extraits de grenade ont une capacité antioxydante puissante, et les extraits d'écorce du fruit sont plus efficaces que le jus et les extraits de graines comme sources potentielles d'antioxydants naturels. Les résultats de la recherche montrent que le niveau de contribution des différents composés bioactifs dans les parties ; écorces, jus et les



graines de grenade diffère différemment selon le niveau d'activité antioxydante et les caractéristiques antioxydantes.

### Méthode de réduction du Fer : FRAP (FerricReducingAntioxidant Power)

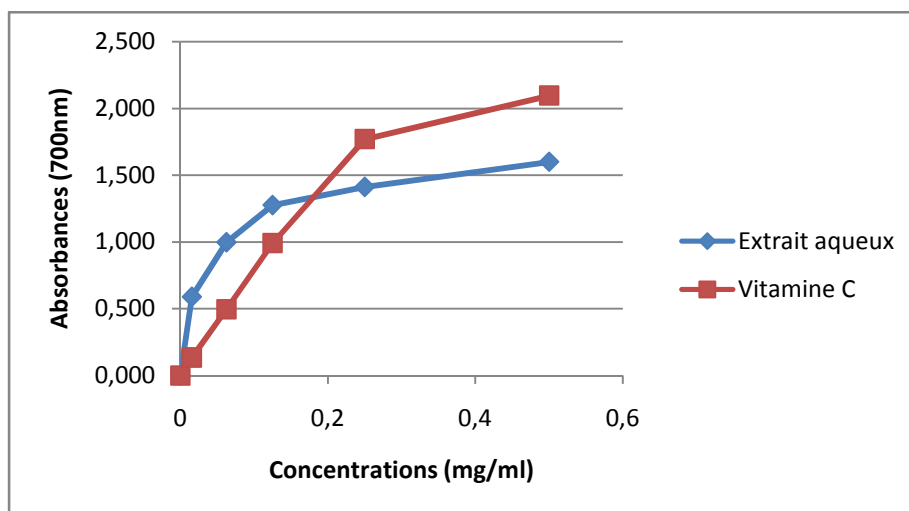
Pour ce test, une gamme de concentration a été préparée. Les valeurs des densités optiques obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations. Ces résultats ont permis de tracer deux courbes (**Figure 05**) à partir des valeurs d'absorptions calculées et présentées dans le **tableau VIII**

**Tableau VIII:** Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait aqueux de *punicagranatum* L. et de la vitamine C dans le mélange du test FRAP.

C (mg/ml)	Abs <sub>moy</sub> EA	Abs <sub>moy</sub> VitC
0	0	0
0.01	0.58 ± 0.07	0.13 ± 0.14
0.06	0.99 ± 0.08	0.49 ± 0.10
0.12	1.27 ± 0.11	0.99 ± 0.50
0.25	1.41 ± 0.29	1.77 ± 0.33
0.50	1.59 ± 0.20	2.09 ± 1.09

Selon **Mutahar et al .,(2012 )** la présence de composés réducteurs dans l'extrait de la plante provoque la réduction du fer ferreux ( $Fe^{+3}$ ) en fer ferrique ( $Fe^{+2}$ ). Par conséquent l'évaluation du  $Fe^{+2}$  est faite en mesurant l'intensité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm.

La **figure** ci-dessous indique que le pouvoir réducteur du fer ferrique  $Fe^{+++}$  en fer ferreux  $Fe^{++}$  varie linéairement avec la variation de la concentration de l'extrait. Cela est en accord avec les résultats de la méthode précédente.



**Figure 15:** Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux et du contrôle positif (Vit C) testé par la méthode FRAP

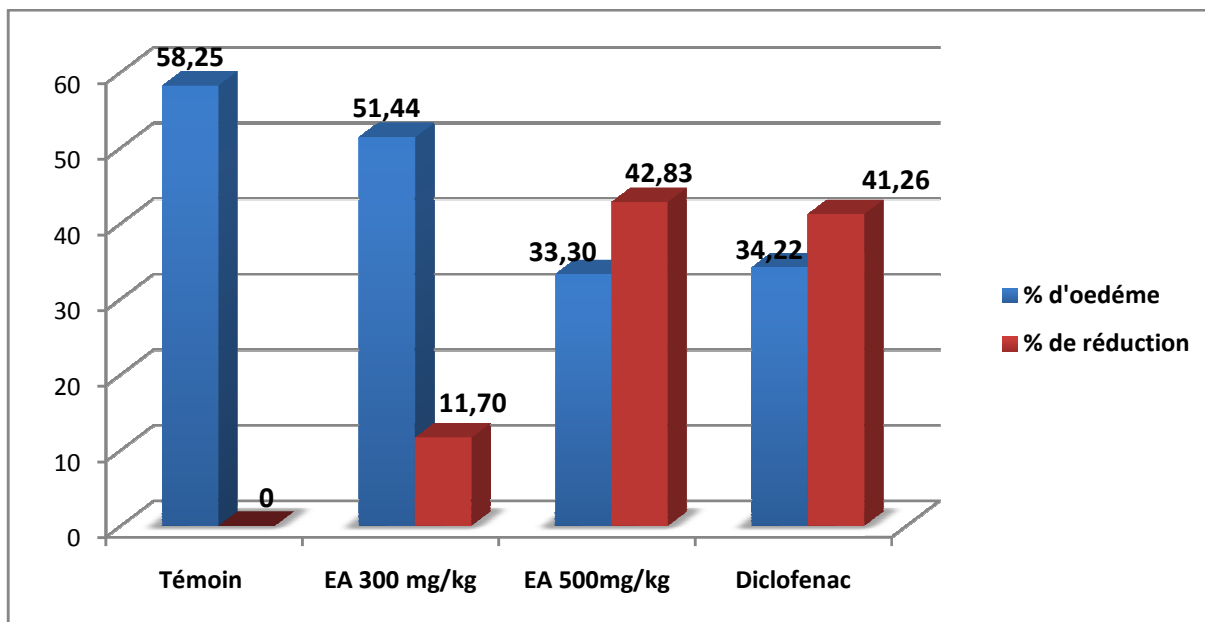
L'analyse des courbes de la **figure 15**, montre une augmentation de l'activité de l'extrait aqueux des écorces de fruit de *Punicagranatum* L. avec l'augmentation de la concentration. D'autre part, nous constatons que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux est loin de celui du contrôle positif (Vit C), une concentration de 0.250 mg/ml correspond à une absorbance de l'ordre de 1.770 pour la vitamine C alors qu'elle était de 1.412 pour l'extrait aqueux.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Dheeshs et al., (2005)** ; **Mutahar et al. (2012)** qui ont mentionné un fort pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux des écorces de fruit de *Punicagranatum* L.

**Gil et al. (2000)** rapportent que la capacité antioxydante de la grenade est due au moins en partie à la présence des polyphénols. Les principaux polyphénols antioxydants de la grenade sont les anthocyanes et les ellagitanins. Ces derniers comptent pour plus de 90 % de l'activité antioxydante du fruit et sont concentrés dans le péricarpe et les membranes.

### III.2.2. Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo :

Les résultats des moyennes et de la réduction de l'inflammation sont compilés dans les **tableaux (IX et X)** en (**Annexe II**) et la figure ci- dessous :



**Figure 16:** Histogramme représentant les pourcentages d'augmentation et de réduction de l'œdème pour les quatre lots traités : Lot témoin, lot de référence, lots d'essais.

Après 30 minutes de l'administration des traitements (Témoin, produit de référence, extrait aqueux à 300 et 500mg/ml), nous avons injecté la carraghénine à 1%. Dans les quatre heures qui ont suivi le traitement, nous avons remarqué que l'extrait aqueux à 500 mg/kg a induit un taux de réduction d'œdème de 42.83%. Ce taux est plus au moins important que celui obtenu suite au traitement à base de produit de référence (Diclofenac), provoquant ainsi une réduction d'œdème de 41.26%.

Quant à l'extrait aqueux à 300 mg/kg, nous avons constaté que le pourcentage de réduction d'œdème de cette dernière (11.70%) est inférieur à celui enregistré pour la dose à 500mg/kg et à celui du produit de référence.

Au regard de ces résultats, nous pouvons déduire qu'à de fortes doses, l'extrait aqueux d'écorces de fruit *Punicagranatum* L. possède un effet anti-inflammatoire.

Le pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait aqueux d'écorce de *Punicagranatum* L. à la dose de (500 mg/ kg) peut être expliqué par la présence des tanins, des flavonoïdes et des saponosides qui ont été révélé par le screening phytochimique. Les résultats obtenus concordent avec plusieurs recherches qui montrent que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux peut s'expliquer en partie par la présence dans le fruit des composés

polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes (Zarfeshany et al., 2014). Ces derniers sont des constituants bien connus des plantes anti-inflammatoires.

Selon Mutahar et al. (2012), les polyphénols de grenade présentent une activité anti-inflammatoire probablement en modulant le métabolisme des eicosanoïdes et en inhibant la synthèse de nombreux médiateurs pro-inflammatoires intracellulaires, comme le NF-kB.

Par ailleurs, les tanins sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine et des leucotriènes qui sont des intermédiaires dans la réaction inflammatoire (Kim et al., 1998).

Les flavonoïdes trouvés lors des criblages photochimiques (Holland et al, 2009) peuvent expliquer cet effet anti-inflammatoire. En effet, l'application topique de la quercétine et la myricétine exerce une forte inhibition sur la cyclooxygénase (COX) et la lipooxygénase (Kim et al., 1998).

### III.2.3. Résultats de l'activité antispasmodique in vivo

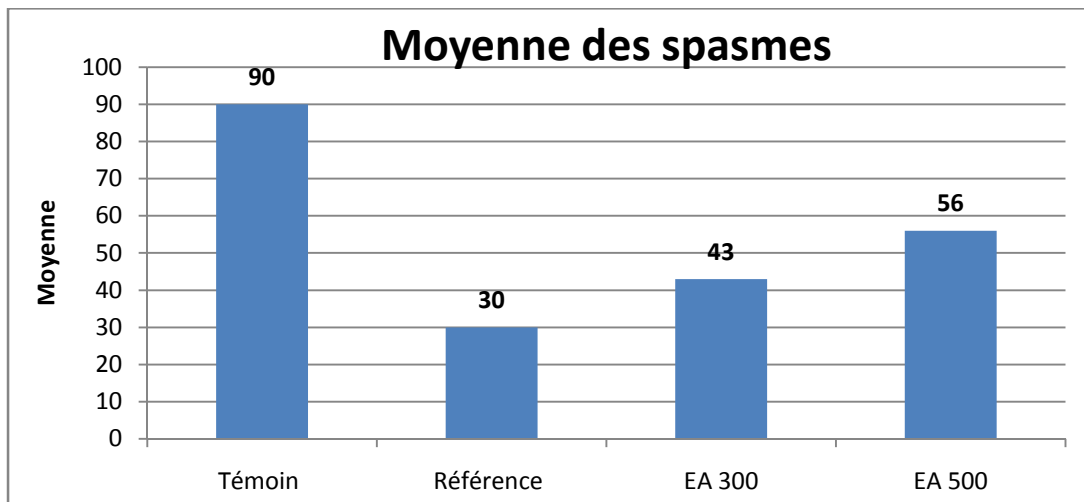
L'activité antispasmodique de l'extrait aqueux de *Punicagranatum*L.a été évaluée par le dénombrement des spasmes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 1%. Les résultats obtenus sont indiqués dans le **tableau XI**.

**Tableau XI:** Activité antispasmodique de l'extrait aqueux de *Punicagranatum*L.

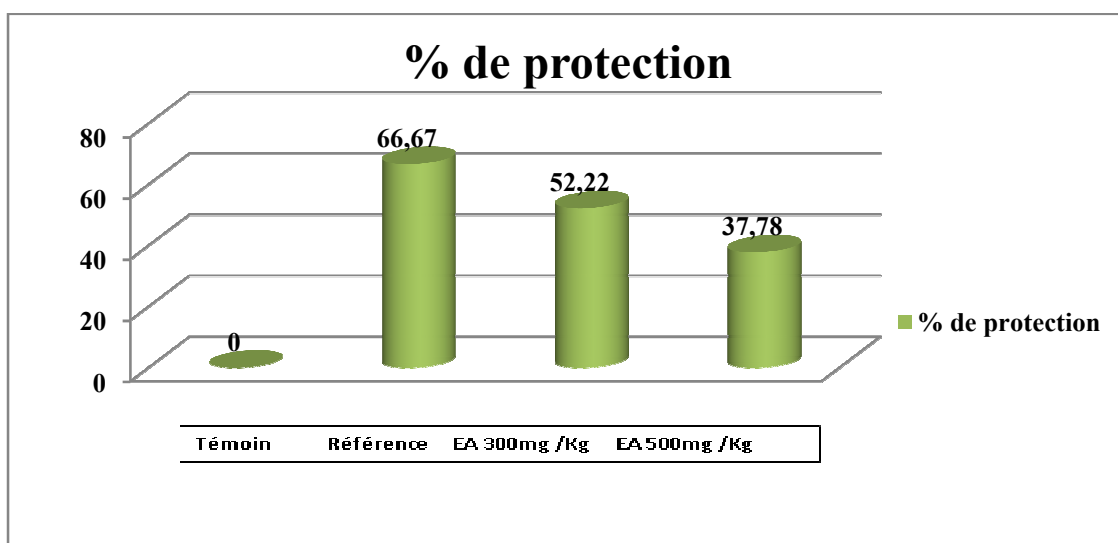
Nombre de souris	Témoin	Référence	EA 300 mg/kg	EA 500 mg/kg
1	85	28	39	58
2	101	32	47	55
3	90	26	39	57
4	94	29	46	51
5	80	35	44	59
<b>Moyenne ± écart type</b>	90 ± 8,09	30 ± 3,54	43 ± 3,81	56 ± 3,16
<b>% protection</b>	-	66.67	52.22	37.78

Les **figures** ci-dessous rapportent les résultats de l'activité antispasmodiques de l'extrait aqueux en comparaison avec un antispasmodique de référence (Livospasme)

L'activité antispasmodique a été exprimée par le nombre de contraction en dix minutes. Le pourcentage de diminution des contractions pour chaque lot a été calculé par la formule citée précédemment.



**Figure 17 :** Moyenne du nombre de crampes pour chaque lot pendant 10 minutes.



**Figure 18:** pourcentage de protection de la douleur pour chaque lot.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il apparaît que le lot de souris traitées avec le médicament de référence (Livospasme) a présenté le nombre de contractions le plus faible (30 spasmes par 10 minutes). En revanche le lot traité avec de l'eau physiologique (Témoin) a présenté le nombre de contractions le plus élevées (90 spasmes par 10 minutes).

En ce qui concerne l'extrait aqueux, le nombre de contractions pour la dose 300 mg/kg est égale à 43 et 56 pour la dose 500mg/ml (**Figure 17**).

Nous constatons également que l'extrait aqueux à 300 et 500 mg/kg a induit un pourcentage de protection égale respectivement à 52.22 % et 37.78% par rapport à celui présenté par le traitement à base du produit de référence (66.67%) (**Figure 18**), ce qui démontre que l'extrait aqueux étudié présente un pouvoir de protection important contre les douleurs provoquées.

L'écorce de fruit de *Punicagranatum*L. est traditionnellement utilisée dans le traitement des crampes abdominales et de divers troubles gastro-intestinaux. Jusqu'à présent, l'activité spasmolytique de l'écorce de *Punicagranatum*L. a été rapportée en utilisant un modèle in vitro. Cependant, son mode d'action n'est pas encore exploré. Par ailleurs, des études élaborées par **Khatale et al. (2011)**, sur les différents extraits aqueux et alcooliques de l'écorce de *Punicagranatum*L. où le produit de référence était le Spasfon ont montré un effet anti-spasmodique comparable à nos résultats.

#### III.2.4. Résultat de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'écorce de fruit *Punicagranatum* L. est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les différentes concentrations à tester vis-à-vis des six germes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C pour les bactéries et 48 heures pour les levures et champignons. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau XII. (Figure 19, Annexe II)**

**Tableau XII:** Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes testés vis-à-vis des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Punicagranatum*L.

Germes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	Concentrations	200mg/ml	150mg/ml	100mg/ml	50mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>		18	15	16	11
<i>Staphylococcus aureus</i>		26	22	23	23
<i>Echerichia coli</i>		15	13	22	12
<i>Candida albicans</i>		31	28	26	27
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		21	18	17	17

Les résultats du test de diffusion sur la gélose ont indiqué que l'extrait aqueux d'écorce *Punicagranatum* L. a montré différents degrés d'inhibition de la croissance, selon les souches bactériennes.

A partir du **tableau XII**, les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux ont démontré clairement qu'avec des doses croissantes, le diamètre de la zone d'inhibition augmente. Nous avons constaté également de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenus, allant de 11 mm à 31 mm pour l'extrait aqueux d'écorce du fruit *Punicagranatum*L.

Nous pouvons déduire que les souches utilisées sont sensibles à l'extrait aqueux d'écorce de grenade, et que plus le diamètre de la zone d'inhibition augmente, plus la résistance des microorganismes testés diminue.

Pour *candida albicans*, nous avons enregistré une zone d'inhibition importante de 31mm avec une dose de 200mg /ml d'extrait aqueux (**Figure 19, AnnexeII**).

D'après les résultats du **tableau XII**, pour une dose de 200mg/ml d'extrait aqueux, les trois espèces (*Bacillus et Staphylococcus*) montre une sensibilité importante. Toute fois pour *Echerichia Coli*, nous avons enregistré une zone d'inhibition plus importante 22mm avec une dose de 100 mg/ml.

Nos résultats ont été confirmés par ceux obtenus ; **Prashanth et al., 2001 ; Holetz et al., 2002 et Machado et al., 2003** qui ont montré que *Punicagranatum*L. est efficace pour inhiber la croissance bactérienne Gram-positive, spécialement *Staphylococcus aureus*.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que l'extrait aqueux d'écorce de fruit de *Punicagranatum*L. a présenté une action antibactérienne importante vis-à-vis des trois souches testées dès la première dose testée (50mg/ml) ; 11 mm pour *B. subtilis*, 12mm pour *E. coli* et 23mm pour *S. aureus*.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Kadi et ses collaborateurs (2011)**. Ces derniers ont rapporté que le test de diffusion du disque a montré que l'extrait aqueux a la plus grande activité contre toutes les bactéries Gram (+) et ils ont également montré une bonne activité contre les bactéries Gram (-). La raison de cette sensibilité entre les bactéries Gram (+) et Gram (-) est attribuée aux différences morphologiques entre ces microorganismes. Les bactéries à Gram (-) ont une membrane phospholipidique externe portant les composants lipopolysaccharides structuraux.

Cela rend la paroi cellulaire imperméable aux solutés lipophiles, tandis que les porines constituent une barrière sélective aux solutés hydrophiles avec une limite d'exclusion d'environ 600 Da (**Nikaido et Vaara, 1985**). Les bactéries Gram (+) devraient être plus sensibles car elles ne possèdent qu'une couche externe de peptidoglycane qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (**Scherrer et Gerhardt, 1971**).

Pour l'activité antifongique, nous avons constaté que l'extrait aqueux est très efficace, avec des zones d'inhibition de 27-26-28-31mm pour les doses 50- 100- 150 -200 mg/ml, respectivement.

**Endo et al. (2010)** rapportent que l'activité antifongique des extraits de plantes est attribuée à leur composition chimique fondée sur des analyses spectrales ; tels que les composés extraits d'écorces de grenade qui présentent une forte activité antifongique, comme le punicalagine qui possède une forte activité contre *Candida albicans*.

Par ailleurs ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur montré par l'extrait aqueux d'écorce de *Punicagranatum* L. peut être attribuable aux tanins qui représentent 28% des constituants d'écorces (**lansky et Newman, 2007**). Il a été trouvé qu'*in vitro*, cette famille de composés peut avoir diverses propriétés pharmacologiques telles que ; antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires.

En outre, l'activité antibactérienne observée peut également être due à d'autres métabolites secondaires comme les composés phénoliques et les saponines.



## Conclusion

Par l'actuelle étude, nous avons contribué à la mise en valeur des propriétés thérapeutiques d'une plante très répandue dans le bassin méditerranéen, *Punicagranatum* L.

Pour ce faire, nous avons, au préalable, effectué un criblage phytochimiques des différentes familles de métabolites secondaires contenues dans l'écorce du fruit de *Punicagranatum* L., Il s'agit essentiellement des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes.

Vu sa richesse en polyphénols surtout en flavonoïdes, la plante représente une source prometteuse d'antioxydants importants, et peut être utilisées dans le cas des stress oxydatifs et de prévenir les différentes pathologies survenues suite à une attaque radicalaire.

Les résultats obtenus à l'issu de l'activité anti-inflammatoire ont montré que l'extrait aqueux aréduit de façon appréciable l'œdème induit par la carragénine. L'inhibition de l'œdème de l'extrait aqueux est comparable, à celle du Diclofenac®.

D'autre part, l'extrait aqueux à une dose de 300 mg/ml, a présenté une activité antispasmodique importante égale à 52.22 % par rapport à celui présenté par le produit de référence (66.67%). Ceci est en relation avec la richesse de l'extrait aqueux de l'écorce de grenade en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes. Ces derniers sont connus par leur pouvoir anti-inflammatoire dans les phases prolifératives et exsudatives de l'inflammation.

L'étude de l'activité antimicrobienne de notre extrait arévéélé un pouvoir inhibiteur sur les différentes souches testées.

Comme perspective, Malgré les découvertes intéressantes sur les nombreuses vertus du grenadier, aucun médicament à base de grenade n'a, à l'heure actuelle, été mis sur le marché. En effet, de nouvelles expérimentations s'avèrent nécessaires pour compléter les résultats obtenus et éventuellement développer un médicament. Seuls quelques compléments alimentaires sont déjà commercialisés, essentiellement à visée antioxydante.

Nous souhaitons pouvoir compléter cette étude par la caractérisation et identification des molécules antioxydantes du grenadier par des techniques plus performantes comme la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie de masse (CG-MS).

La détermination des effets thérapeutiques de cette plante par des études cliniques approfondies (effet hypoglycémiant, anticancéreux) pourrait enrichir les travaux sur cette plante.

Le grenadier reste donc toujours une plante fascinante et mystérieuse qui n'a sûrement pas encore livré tous ses pouvoirs thérapeutiques.